

Uso previsto

Para la determinación cinética cuantitativa de la actividad de α -amilasa en suero humano utilizando los analizadores Yumizen C230 y Yumizen C240. **Rx Only.**

Importancia clínica

La determinación de la actividad de amilasa en suero se realiza con más frecuencia para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades del páncreas.

Historia del método

La amilasa se midió cuantitativamente por primera vez mediante un método yodométrico introducido por Wohlegemuth en 1908.¹ Somogyi introdujo un procedimiento en 1938 que estandarizó las cantidades de almidón y yodo.² Su trabajo se convirtió en la base para los métodos amilolíticos y sacarogénicos ampliamente utilizados e introducidos en 1956³ y 1960⁴ respectivamente. Las desventajas de estos métodos incluían largos tiempos de incubación, interferencia de glucosa endógena y colores de reacción inestables, lo que daba como resultado una pobre reproducibilidad y confiabilidad.

En 1967, Rinderknecht et al introdujeron un método de almidón acoplado a tinte⁵, que era relativamente simple de realizar. Sin embargo, el procedimiento usaba un sustrato insoluble, carecía de linealidad y aún requería centrifugación o filtración.

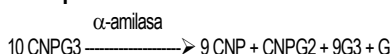
Se han introducido procedimientos turbidimétricos⁶ que son relativamente rápidos, pero requieren instrumentación especial y tienen dificultad para producir soluciones de almidón estables y reproducibles.

Se han sugerido varios procedimientos enzimáticos^{7,8}, incluido uno que utilizó el sustrato definido maltotetraosa.⁹ Estos métodos representaron una mejora significativa en la medición de la amilasa, pero aún estaban sujetos a tiempos de preincubación relativamente largos, la posible interferencia de la glucosa endógena y una serie de otras posibles interferencias con la formación de NADH.¹⁰

Wallenfels et al¹¹ introdujeron los p-nitrofenilglucósidos como sustratos definidos para la determinación de α -amilasa en un procedimiento que eliminó la interferencia de la glucosa y el piruvato endógenos. Se han utilizado una variedad de enzimas de acoplamiento para hidrolizar los oligosacáridos de cadena corta resultantes de la actividad de amilasa en la muestra. Desafortunadamente, estas enzimas de acoplamiento contenían actividad de amilasa residual que afectaba negativamente a la estabilidad de estos reactivos.

El presente método se basa en el uso de un sustrato cromogénico, 2-cloro-p-nitrofenol unido a la maltotriosa. La reacción de la amilasa con este sustrato da como resultado la formación de 2-cloro-p-nitrofenol, que se puede medir espectrofotométricamente a 405 nm. Esta reacción procede muy rápidamente, no se requieren enzimas de acoplamiento y los factores endógenos no inhiben fácilmente la reacción.

Principio



La α -amilasa hidroliza el 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido (CNPG3) para liberar 2-cloro-nitrofenol y formar 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltósido (CNPG2), maltotriosa (G3) y glucosa (G). La tasa de aumento de la absorbancia se mide a 405 nm y es proporcional a la actividad de α -amilasa en la muestra.

Reactivos

Disolución amortiguadora MES, pH 6,0+0,1, 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido 1,8 mM, cloruro de sodio 350 mM, acetato de calcio 6 mM, tiocianato de potasio 900 mM, azida sódica al 0,1% (Consulte "Precauciones").

Preparación de los reactivos

El reactivo se proporciona como un líquido listo para usar. No se requiere preparación.

Almacenamiento de reactivos

1. Guarde el reactivo a una temperatura de 2-8°C.
2. El reactivo es estable hasta la fecha de caducidad si se almacena según las instrucciones.

Deterioro de los reactivos

No lo use si:

1. La absorbancia del reactivo de trabajo es superior a 0,600 cuando se mide a 405 nm frente al agua en una cubeta con una longitud de paso de 1 cm.
2. El reactivo no cumple con los parámetros establecidos de rendimiento.
3. El reactivo está turbio o muestra otra evidencia de contaminación bacteriana.

Precauciones

1. Este kit de reactivos está diseñado exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.
2. Este reactivo contiene tiocianato de potasio. VENENO. No ingerir.
3. Este reactivo contiene azida sódica (0,1%) como conservante. No ingerir. Puede reaccionar con tuberías de plomo y cobre para formar azidas metálicas altamente explosivas. Al desecharlo, vierta grandes cantidades de agua para evitar la acumulación de azida.
4. Todas las muestras y controles deben manipularse como potencialmente infecciosos, utilizando procedimientos de laboratorio seguros. (NCCLS M29-T2)¹²

Extracción y manipulación de muestras

1. La muestra de elección es el suero no hemolizado. Las muestras deben extraerse de conformidad con el documento NCCLS H4-A3.¹³
2. Los anticoagulantes, como el citrato y el EDTA, se unen al calcio que se necesita para la actividad de la amilasa. No se debe utilizar plasma con estos anticoagulantes.
3. La amilasa en suero es estable durante una semana a temperatura ambiente (18-25°C) y durante dos meses cuando se almacena refrigerada a una temperatura de 2-8°C.¹⁴

Interferencias

1. Una serie de fármacos y sustancias afectan a la determinación de la amilasa.^{15,16} Young et al han publicado una lista completa de dichas sustancias.¹⁷
2. La macroamilasa en la muestra puede causar una hiperamilasemia medida, que podría conducir a un falso diagnóstico de pancreatitis aguda. Sin embargo, no suele asociarse ningún síntoma clínico a la macroamilasemia.¹⁸
3. Se ha determinado que la bilirrubina (30 mg/dL) y la hemoglobina (500 mg/dL) tienen un efecto no significativo en este procedimiento.
4. Se ha informado de que las muestras lipémicas de hasta 1000 mg/dL no tienen efecto en las determinaciones de amilasa sérica.¹⁹

Materiales suministrados

Reactivo de amilasa (CNPG3).

Materiales necesarios, pero no suministrados

1. Analizador Yumizen C230 / Yumizen C240
2. Manual de instrucciones de Yumizen C230 / Yumizen C240
3. Control químico, número de catálogo C7592-100

Parámetros de prueba

Test:	AMY	Química:	Amilasa
Nº. de química 204	Imprimir nombre:	Amilasa	
Tipo de reacción:	Cinética	Dirección de reacción:	Positivo
Onda Pri.:	405 nm	Onda Onda	
Decimal.:	0	Muestra Tipo:	Suero
Tiempo de blanco:		Tiempo de reacción:	3 11
Unidad:	U/L	Tiempo de incubación:	0

	Vol. de muestra	Aspirado	Diluyente	Vol. de reactivo	Diluyente
Estándar;	5 uL	uL	uL	R1: 200	uL uL
Reducido;	uL	uL	uL		
Aumentado;	uL	uL	uL		

Rango de linealidad (Estándar):	0-2000	Limite de linealidad:	0.3
Rango de linealidad (Reducido):		Agotamiento del sustrato:	25000
Rango de linealidad (aumentado):		Abs. de blanco mezclado:	- 40000 40000
Abs. de blanco de R1:	- 40000 40000	Estabilidad en el equipo:	30 Día(s)
Respuesta de blanco	- 40000 40000	Limite de alarma del reactivo:	5
Química idéntica:			

Comprobación de prozona:		
Q1:	Q2:	Q3:
Q4:	PC:	ABS:

Usar resultado cualitativo:	
Rango:	Aviso:

Compensación de pendiente:		
Unidad de	Compensación	de Pendiente
1	0	U/L

Conjunto de reactivos Amilasa (CNP3) Pointe

Pretratamiento:	Vol. de la muestra de pretratamiento: uL	Vol. del reactivo de pretratamiento: µl
-----------------	--	---

Rango de ref.:	Tipo de muestra:	Género:	Rango de edad:	Rango de ref.:	Rango crítico:	Unidad:
----------------	------------------	---------	----------------	----------------	----------------	---------

Parámetros de configuración de calibración

Quím: AMY	Calibrador	Conc.	Pos.	N° lote
Config. calibración	Agua	0,0	W	
Modelo mat: Factor K				
Factor: 3178,000 Réplicas: 2				
Límites de aceptación				
Tiempo Cal: 24 hr.				
Dif. Pendiente: SD:				
Sensibilidad: Repetibilidad:				* Definido por el usuario
Coef. Deter:				
Auto Calib.				
<input type="checkbox"/> Tiempo Cal				

Limitaciones

- Las muestras que excedan el límite de linealidad (2000 U/L) deben diluirse con un volumen igual de solución salina, volver a analizarse y se debe multiplicar el resultado por dos.
- La macroamilasa en la muestra puede causar una hiperamilasemia medida, que podría conducir a un falso diagnóstico de pancreatitis aguda. Sin embargo, no suele asociarse ningún síntoma clínico a la macroamilasemia.¹⁸

Calibración

El procedimiento se estandariza mediante la absorbividad milimolar del 2-cloro-p-nitrofenol que es de 12,9 a 405 nm en las condiciones de ensayo descritas.

Cálculos (Ejemplo)

$$\frac{\Delta \text{Abs./min} \times \text{TV} \times 1000}{\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}} = \text{U/L } \alpha\text{-amilasa en muestra}$$

Donde: $\Delta \text{Abs./min}$ = Diferencia de absorbancia por minuto
 TV = Volumen total de ensayo (1,025 mL)
 1000 = Conversión de U/mL a U/L
 MMA = Absortividad milimolar de 2-cloro-p-nitrofenol (12,9)
 SV = Volumen de la muestra (0,025 mL)
 LP = Paso de luz (1 cm)

$$\frac{\Delta \text{Abs./min} \times 1,025 \times 1000}{12,9 \times 0,025 \times 1,0} = \Delta \text{Abs./min} \times 3178 = \text{U/L } \alpha\text{-amilasa}$$

Ejemplo: Si $\Delta \text{Abs./min} = 0,03$, entonces $0,03 \times 3178 = 95 \text{ U/L}$

NOTA: Para convertir a unidades SI (nKat/L), multiplique el valor U/L por 16,67.

Control de calidad

La validez de la reacción debe controlarse mediante el uso de sueros de control con valores de amilasa normales y anormales conocidos. Estos controles deben realizarse, al menos, con cada turno de trabajo en el que se realicen ensayos de amilasa. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propia frecuencia de determinación de control. Los requisitos de control de calidad deben realizarse de conformidad con la normativa local, estatal y/o nacional o con los requisitos de acreditación.

Valores esperados

Suero: 25-125 U/L para un método cinético similar.²⁰ Dado que los valores esperados se ven afectados por la edad, el sexo, la dieta y la ubicación geográfica, se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia para este procedimiento.

Rendimiento

- Linealidad: 0-2000 U/L
- Comparación: Se realizó un estudio entre la serie Yumizen 200 y un analizador y método similar, que dio como resultado un coeficiente de correlación de 0,999 y la ecuación de regresión lineal fue $y=0,963x + 1,7$ (n=33).

- Precisión: Los estudios de precisión se realizaron, utilizando los analizadores de la serie Yumizen 200 siguiendo una modificación de las pautas del documento del NCCLS EP5-T2.²¹










Intraserial (n=20)			Día a Día (n=20)		
Media	D.S.	% C.V	Media	D.S.	% C.V
50,4	2,3	4,5	64,6	2,0	4,7
537,0	17,0	3,2	425,6	2,1	2,8

- Sensibilidad: La sensibilidad del reactivo de amilasa se investigó, leyendo el cambio de absorbancia por minuto a 405 nm para una muestra de solución salina y un suero con una concentración conocida. Se realizaron diez réplicas de cada muestra. Los resultados de esta investigación indicaron que, en el analizador utilizado, el reactivo líquido de amilasa mostró poca o ninguna desviación del reactivo en una muestra cero. En las condiciones de reacción descritas, 1 U/L de actividad de amilasa da una $\Delta \text{Abs./min}$ de 0,0003.


Referencias

- Wohlegemuth, J., Bio Chem. 29:1 (1908).
- Somogyi, M., J. Biol Chem. 125:399 (1938).
- Street, H.V., Close, J.R., Clin Chim Acta 1:256 (1956).
- Henry, R.J., Chiamon, N., Clin. Chem. 6:434 (1960).
- Rinderknecht, H.P., et al. Experientia 23:805 (1967).
- Zinterhofer, L., et al. Clin. Chem. Acta 43:5 (1973).
- Tietz, N.W., et al. Abs. of Proc. Of Intl Seminar and Workshop on Enzymology, Chicago, IL (May 1972).
- Schiwara, H.W., Arztl. Lab 17:340 (1971).
- Pierre, K.J., et al. Clin. Chem. 22:1219 (1976).
- Kaufman, R.A., Tietz, N.W., Clin. Chem. 26:7851 (1980).
- Wallenfels, K., et al. Carbohydrate Research 61:359 (1978).
- NCCLS document "Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue", 2^a Ed. (1991).
- Documento del NCCLS "Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Skin Puncture", 3^a Ed. (1991).
- Tietz, N.W. Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 725-734 (1986).
- Elking, M.P., Kabot, H.J., Amer. J. Hosp. Pharm. 25:485 (1968).
- Bogoch, A., et al. Gastroenterology 26:697 (1954).
- Young, D.S., et al. Clin Chem 21:1D (1975).
- Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p. 627 (1982).
- Young, D.S. and Friedman, D.S., Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests, 2^a Ed., AACCC Press (1989).
- Tietz, N.W., Clinical Guide to Laboratory Tests, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p. 54 (1983).
- NCCLS document "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2^a Ed. (1992).

Clave de símbolo

 Usar antes de (AAAA-MM-DD)	 LOT Lote y código de lote
 REF Número de catálogo	 Fabricante
 IVD Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	 Limitación de temperatura
 Consultar instrucciones de uso	Rx Only: Venta exclusiva con receta médica
 Marca CE	 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 12-A7564-120	 Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated - Marca Pointe 5449 Research Drive Canton, MI 48188	 
--	---	---

<p>Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand 5449 Research Drive, Canton, MI 48188</p> <p>Representante Europeo Autorizado: Obelis s.a. Boulevard Général Wahis 53 1030 Brussels, BÉLGICA Tel.: (+32)2.732.59.54 Fax: (+32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net</p>	
--	---

Certificado para emplear reactivos

Los reactivos Pointe están certificados para ser fabricados de acuerdo con los parámetros especificados. Cualquier producto de reactivo Pointe que no cumpla con las especificaciones hasta la fecha de vencimiento indicada se reparará de inmediato sin cargo.