

Uso previsto

Para la determinación cinética cuantitativa de la actividad de α -amilasa en suero humano, utilizando el analizador Yumizen C560. **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.

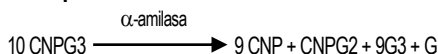
Se han sugerido varios procedimientos enzimáticos^{7,8}, incluido uno que utilizó el sustrato definido maltotetraosa.⁹ Estos métodos representaron una mejora significativa en la medición de la amilasa, pero aún estaban sujetos a tiempos de preincubación relativamente largos, la posible interferencia 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 (CNP3) para liberar 2-cloro-nitrofenol y formar 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltósido (CNP2), 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% (véase la sección "Precauciones").

Preparación de los reactivos

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

Estabilidad y almacenamiento de los reactivos

Guarde el reactivo a una temperatura de 2-8°C. El reactivo es estable hasta la fecha de caducidad si se almacena según las instrucciones. Una vez colocado en el carrusel de reactivos refrigerado (2-10°C), el reactivo es estable durante 30 días.

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 y peligros

1. Este kit de reactivos está diseñado exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.
2. 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.
3. Todas las muestras y controles deben manipularse como potencialmente infecciosos, utilizando procedimientos de laboratorio seguros. (NCCLS M29-T2)¹²

Peligros:

Clasificación de peligros: Peligroso para el medio ambiente acuático, peligro a largo plazo, Categoría 4

Indicaciones de peligro: H413: Puede causar efectos nocivos duraderos para la vida acuática.

Consejos de prudencia: **Prevención:** P273: Evitar su liberación al medio ambiente. P280: Use guantes protectores/ropa protectora/protección ocular. **Respuesta:** P391: Recoger los derrames.

Peligroso para el medio ambiente acuático. **Almacenamiento:** P404: Almacene en un recipiente cerrado. **Eliminación:** P501: Elimine el contenido en una planta de eliminación de desechos aprobada. Véase la ficha de datos de seguridad de este producto (SDS-A7564) disponible llamando al (+1)-734-487-8300.

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



Palabra de advertencia:
Advertencia

Conjunto de reactivos Amilasa Pointe (CNPG3)

- 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
- Se ha determinado que la bilirrubina (30 mg/dL) y la hemoglobina (500 mg/dL) tienen un efecto no significativo en este procedimiento.
- 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

- Analizador Yumizen C560 y manual de instrucciones
- Control químico, número de catálogo C7592-100

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.

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

- Rango del ensayo: 1-2000 U/L
- Comparación: Se realizó un estudio entre el Yumizen C560 y un analizador y método similar, que dio como resultado lo siguiente:

Método	Amilasa
N	85
Amilasa Media (U/L)	127,2
Rango (U/L)	9-1856
Desviación estándar	257,0
Análisis de regresión	$y = 0,964x - 6,5$
Coefficiente de correlación	0,9981

- Precisión: Los estudios de precisión se realizaron, utilizando el analizador Yumizen C560 siguiendo una modificación de las pautas del documento del NCCLS EP5-T2.²¹

Muestra	Intraserial		
	BAJO	MEDIO	ALTO
N	20	20	20
Media	237,9	679,9	1918,5
Desviación estándar	0,9	6,8	6,1
Coefficiente de variación (%)	0,4%	1,0%	0,3%

Muestra	Total		
	BAJO	MEDIO	ALTO
N	40	40	40
Media	242,9	558,6	1988,0
Desviación estándar	6,3	17,2	37,6
Coefficiente de variación (%)	2,6%	3,1%	1,9%

- Sensibilidad: Límite de detección 2SD (95% Conf) = 1 U/L

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., Chiamori, 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 Int'l 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. 26:7:851 (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", 2nd 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, 2nd Ed., AACC 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", 2nd Ed. (1992).

PARÁMETROS QUÍMICOS

Quím:	AMYL	N.º:	204	Tipo de muestra:	Suero
Química:	Amilasa			Imprimir nombre:	AMYL
Tipo de reacción:	Cinética			Dirección de reacción:	Positivo
Onda Pri:	412			Onda Sec:	
Unidad:	U/L			Decimal	0
Tiempo de blanco:	0 0			Tiempo de reacción:	19 33
	Vol. de la muestra	Aspirado	Diluyente	Vol. del reactivo	Diluyente
Estándar:	3,0 uL	-- uL	-- uL	R1: 120 uL	-- uL
Reducido:	-- uL	-- uL	-- uL	R2: -- uL	-- uL
Aumentado:	-- uL	-- uL	-- uL	R3: -- uL	-- uL
	<input type="checkbox"/> Muestra en blanco	<input checked="" type="checkbox"/> Reproceso automático		R4: -- uL	-- uL
Ajuste de pendiente/compensación					
Pendiente: 1		Compensación: 0			

Rango de linealidad (Estándar)	1	2000	Límite de linealidad:	0,3
Rango de linealidad (Reducido)	___	___	Agotamiento del sustrato:	25000
Rango de linealidad (aumentado)	___	___	Abs de blanco mixto:	
Abs de blanco de R1:	___	___	Hora de destape	
Respuesta de blanco:	___	___	Límite de alarma del reactivo:	
Química idéntica:			<input type="checkbox"/> Extensión lineal de enzimas	
<input type="checkbox"/> Comprobación de prozona		<input type="radio"/> Verificación de tasa	<input type="radio"/> Adición de antígeno	
Q1:	Q2:	Q3:	Q4:	
PC:	ABS:			

Conjunto de reactivos Amilasa Pointe (CNP3)

PARÁMETROS DE CALIBRACIÓN

Definición de calibrador						
Calibrador:	*	N.º de lote:			*	
Fecha caduc:	*					
Carrusel	Pos					
Carrusel de muestras 1	*					
Carrusel de muestras 2						
Carrusel de muestras 3						
Reactivo/Calibración						
<u>Calibrador</u>	<u>Pos.</u>	<u>N.º Lote</u>	<u>Fecha caduc</u>	<u>Quím</u>	<u>Conc</u>	<u>Unidad</u>
Agua	A	*	*	AMYL	0	U/L
Configuración de calibración						
Quím:	AMYL					
<u>Configuración de la calibración</u>						
Modelo Mat:	K Factor					
Factor:	3178	Réplicas:	1			
<u>Límites de aceptación</u>						
Tiempo Cal:	24	Hora				
Dif. Pendiente:	---	SD:	---			
Sensibilidad:	---	Repetibilidad:	---			
Coef. Deter:	---					
<u>Auto Calib.</u>						
<input type="checkbox"/> Frasco cambiado	<input type="checkbox"/> Lote cambiado	<input type="checkbox"/> Tiempo Cal				

Se recomienda analizar diariamente dos niveles de material de control.

* Indica el parámetro definido por el usuario.

REF 14-A7564-120



Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand
5449 Research Drive Canton, MI 48188



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.

Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

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



Clave de símbolo

Usar antes de (AAAA-MM-DD) **LOT** Lote y código de lote **REF** Número de catálogo

Fabricante Limitación de temperatura Consultar instrucciones de uso
IVD Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro* **Rx Only**: Venta exclusiva con receta médica