



## $\alpha$ - AMILASA - SL

Números de catálogo: 341-10  
341-40

Presentación: 10 x 10 mL  
4 x 100 mL

### USO

Para la determinación cuantitativa *in vitro* de  $\alpha$ -amilasa en suero.

### PRECAUCIONES

Evite la ingestión y el contacto con la piel y los ojos. Vea la Hoja de Seguridad del Producto. La saliva contiene amilasa. Evite la contaminación con saliva de los materiales o recipientes de análisis.

### REACTIVOS

Reactivo de  $\alpha$ -Amilasa: solución que contiene al menos 2.25 mmol/L de CNPG3, amortiguador (pH 6.0 a 25°C), activadores y estabilizadores.

### ANTECEDENTES

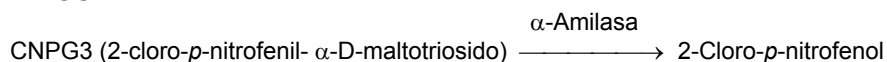
La  $\alpha$ -amilasa (1,4-  $\alpha$ -D-Glucan glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1) es una enzima del aparato digestivo. Hidroliza el almidón de los alimentos y el glicógeno para formar maltosa al fragmentar sus cadenas en los enlaces hemiacetal alternados. La enzima es normalmente secretada en el tubo digestivo a partir de las glándulas parótidas y el páncreas. En enfermedades que afectan estas glándulas y particularmente cuando el conducto pancreático está obstruido, disminuye la cantidad de la enzima en el suero.(1)

Los métodos empleados para medir la actividad de la amilasa son:

1. Análisis sacarogénicos, donde la cantidad de azúcares reductores formados se determinan después de que son incubados el suero y un sustrato de almidón.
2. Métodos amiloclásticos, que sigue la disminución de la concentración del sustrato de almidón cuando se incuba con el suero.
3. Métodos enzimáticos en los cuales la maltosa formada es metabolizada (por lo general a través de la glucosa) en una serie de reacciones que generan NADH
- 4a. Métodos enzimáticos que cuantifican la liberación de p-nitrofenol a partir de maltopentaosido de p-nitrofenol y sustratos de hexaosido. (2)
- 4b. Métodos enzimáticos que cuantifican la liberación de 2-cloro-p-nitrofenol a partir del sustrato 2-cloro-p-nitrofenil-  $\alpha$ -D-maltotriosido (CNPG3). (3)

Este análisis de amilasa es un procedimiento de un paso que utiliza el sustrato CNPG3 (3). La ventaja está en que la  $\alpha$ -amilasa reacciona directamente, sin enzimas auxiliares, con el sustrato CNPG3 liberando 2-cloro-p-nitrofenol.

### PRINCIPIOS



La  $\alpha$ -amilasa reacciona directamente con el CNPG3 para liberar 2-cloro-p-nitrofenol que es medido a 405 nm. El incremento en absorbancia a 405 nm es proporcional a la cantidad de  $\alpha$ -amilasa en la muestra.

### PREPARACION DEL REACTIVO

El reactivo suministrado está listo para su uso.

## ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

El reactivo suministrado es estable hasta la fecha de caducidad especificada en la etiqueta a 2-8°C.

## DETERIORO DEL REACTIVO

Las soluciones de reactivo debe ser claras. La turbidez indicaría deterioro. La absorbancia inicial del reactivo, leída a 405 nm contra agua desionizada, no debe exceder de 0.300.

## INSTRUMENTOS

Puede usarse cualquier instrumento con control de temperatura de  $\pm 0.5^\circ\text{C}$  que sea capaz de leer la absorbancia con exactitud, con una sensibilidad de 0.001 de absorbancia a 405 nm. El ancho de banda deberá ser de 10 nm o menos, la desviación de luz de 0.5% o menos y la exactitud de longitud de onda dentro de 2 nm.

## RECOLECCION Y PREPARACION DE LA MUESTRA

La muestra de elección es suero fresco, claro y no hemolizado. La amilasa es estable en suero por al menos una semana cuando se almacena a temperatura ambiente o por varios meses a 4°C

## SUBSTANCIAS DE INTERFERENCIA

La amilasa en la saliva elevará falsamente los resultados de la prueba si los materiales utilizados están contaminados con saliva.

Se evaluaron las interferencias por ictericia, lipemia y hemólisis para este método de amilasa en un analizador Hitachi utilizando un criterio de significancia de variación >10% a partir del control.

No se encontró interferencia importante por ictericia a niveles de bilirrubina de 0-684  $\mu\text{mol/L}$  (0-40 mg/dL) en una muestra de amilasa de 121 U/L.

Se valuó la interferencia por lipemia utilizando muestras de intralípidos de 0-1000 mg/dL (0-3000 mg/dL de triglicéridos) con resultados aceptables a concentraciones de en una muestra de 600 mg/dL (~1800 mg/dL de triglicéridos). A concentraciones de intralípidos de 600 mg/dL (1800 mg/dL de triglicéridos) se reportó una interferencia negativa de 9% en una muestra de amilasa de 121 U/L.

Se estudiaron niveles de hemoglobina de 0-155  $\mu\text{mol/L}$  (0-1000 mg/dL) con resultados aceptables a una concentración de 31  $\mu\text{mol/L}$  (200 mg/dL). A una concentración de hemoglobina de 31  $\mu\text{mol/L}$  (200 mg/dL) se obtuvo una interferencia negativa de 101% con una muestra de amilasa de 121 U/L. Se puede encontrar un resumen de la influencia de drogas en pruebas de laboratorio clínico consultando a Young, D.S. (5).

## PROCEDIMIENTO

### Materiales Proporcionados

Se incluye el reactivo necesario para la determinación de  $\alpha$ -amilasa.

### Materiales Requeridos

1. Un instrumento que reúna los requisitos mencionados en la sección de Instrumentos.
2. Cubetas de 1 cm o una celda de flujo capaz de transmitir luz a 405 nm.
3. Tubos de ensayo de la capacidad adecuada
4. Pipetas de la capacidad adecuada
5. Agua desionizada
6. Un cronómetro adecuado

### Condiciones

	Genéricas	Analizador automatizado
Longitud de onda .....	405 nm	415/660 nm
Temperatura .....	37°C	37°C
Paso de luz .....	1 cm	1 cm
Tipo de reacción .....	Cinética	Cinética
Tiempo de reacción .....	1-3 minutos	1-2 minutos
Volumen de la muestra .....	25 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
Volumen de reactivo .....	1.0 mL	300 $\mu\text{L}$
Volumen total .....	1.025 mL	305 $\mu\text{L}$
Relación muestra/reactivo .....	1:40	1/60

## Procedimiento

1. Prepare el volumen requerido de reactivo de trabajo de  $\alpha$ -amilasa
2. En tubos de ensayo por separado pipetee 1.0 mL de reactivo y precaliente a 37°C
3. Agregue 2.5  $\mu$ L de agua desionizada o suero a ser analizado.
4. Registre el cambio en la absorbancia del blanco y de cada muestra desconocida, contra agua desionizada a 405 nm, a intervalos de 30 segundos hasta que el cambio de absorbancia sea constante.

## CALIBRACION

No se utiliza un estándar para calibrar el procedimiento de  $\alpha$ -amilasa. Los resultados son calculados usando el coeficiente de extinción molar y la fórmula dada. Véase Cálculos y Resultados.

## CONTROL DE CALIDAD

Se deben analizar sueros control de nivel normal y anormal con cada corrida de muestras y los resultados deben caer dentro de  $\pm 2$  desviaciones estándar del valor establecido. Los valores obtenidos para la actividad de  $\alpha$ -amilasa son especialmente dependientes del método

## CALCULO Y RESULTADOS

### Resultados

La actividad de la  $\alpha$ -amilasase expresa en unidades por litro (U/L).

### Cálculo

$$\begin{aligned} \text{Creatina cinasa (U/L)} &= \frac{\Delta A/\text{min} \times \text{volumen del análisis (mL)} \times 1000}{12.9 \times \text{paso de luz (cm)} \times \text{volumen de la muestra (mL)}} \\ &= \Delta A/\text{min} \times 3178 \end{aligned}$$

$\Delta A$ /min	= cambio en absorbancia por minuto ( $\Delta A / 30$ seg x 2)
Volumen del análisis	= volumen total de la reacción expresado en mL
1000	= convierte las U/mL a U/L
12.9	= coeficiente de absorción del 2-cloro-p-nitrofenol a 405 nm
Paso de luz	= longitud del paso de luz expresada en cm (usualmente 1.0)
Volumen de la muestra	= volumen de la muestra expresado en mL
3178	= factor derivado de las constantes en la ecuación

### Ejemplo

$$\begin{aligned} \text{Creatina cinasa (U/L)} &= \frac{0.019 \times 2.050 \times 1000}{12.9 \times 1 \times 0.05} \\ &= 0.019 \times 3178 \\ &= 60.4 \text{ U/L} \end{aligned}$$

0.019	= cambio en absorbancia por minuto
2.050	= volumen de la reacción total expresada en mL
1000	= convierte las U/mL a U/L
12.9	= coeficiente de absorbancia del 2-cloro-p-nitrofenol a 405 nm
1	= paso de luz en cm
0.05	= volumen de la muestra en mL
3178	= factor derivado de las constantes en la ecuación

## Limitaciones

Una muestra con un valor de a-amilasa que exceda el límite de linealidad, deberá diluirse con solución salina a 0.9% y reanalizarse incorporando el factor de dilución en el cálculo del resultado.

## VALORES ESPERADOS (1)

Los valores esperados de a-amilasa se determinaron usando suero obtenido de 120 adultos aparentemente sanos siguiendo los procedimientos propuestos en la NCCLS, Documento C28-P-El rango determinado es de 18-87 U/L a 37°C.

Se sugieren estos valores como referencia. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales para el área donde está localizado.

## CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

Estas características de rendimiento se obtuvieron en laboratorios de DCL utilizando un analizador Hitachi.

### Rango Reportable (NCCLS EP6-P)

El rango reportable utilizando un procedimiento automatizado dependerá de la proporción muestra/reactivo utilizada. A una relación muestra / reactivo de 1:60 el rango reportable es de 3-2000 U/L.

### Estudios de Precisión (NCCLS EP5-T2)

Se recopilaron los datos de sueros control de dos niveles utilizando un solo lote de reactivo en 40 corridas llevadas a cabo durante 20 días.

Nivel U/L	DE Total	CV Total %	DE durante la corrida U/L	CV durante la corrida %
46	1.5	3.3	1.2	2.7
390	8.8	2.3	2.5	0.6

### Exactitud (NCCLS EP9-P)

Se comparó el rendimiento de este método (y) con el de un método de CNPG3 (x) en un analizador Hitachi. Las muestras de suero de 40 pacientes que oscilaron de 16-1779 U/L dieron un coeficiente de correlación de 0.9984. El análisis de regresión lineal dio la siguiente ecuación:

$$\text{Este método} = 0.9603 (\text{método de referencia}) + 4.5 \text{ U/L.}$$

## REFERENCIAS

1. Burtis, Carl A. and Ashwood, Edward, R. (Ed.), Tietz, Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Pennsylvania, 854-856 (1994).
2. Fenton, J., et.al., Clin. Chem. 28, 704 (1982).
3. Winn-Deen, Emily S., David H., Segler G., Chavex, R., Development of a Direct Assay for "-Amylase, Clin. Chem. 34/10, 2005-2008 (1988).
5. Kaplan, L.A. and Pesce A., Clinical Chemistry 3rd Edition, Mosby, St. Louis, 568, (1994).
4. Young, D.S., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, AACC Press, Third Edition, Washington, 1990.

IN34110-3

Diciembre 17, 2003