

ENZIMAS

AMILASA

Objetivos

- Determinación de AMS por método cinético.
- Interpretación de la información provista por el fabricante de métodos.

INTRODUCCION

AMILASA (EC 3.2.1.1) AMS = α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa; PM: 40000 – 60000 dalton

Se denomina alfa amilasa (endoglucosidasa) por romper los enlaces polisacarídicos alfa-1,4 al azar formando dextranos, maltosa y algunas moléculas de glucosa. Los enlaces alfa-1,6 de los puntos de ramificación no se alteran. Por ser una proteína relativamente pequeña es fácilmente filtrada y aparece en orina.

Es una metaloenzima que contiene un mínimo de 1 átomo de Ca por molécula y necesita un anión como activador: el Cl^- es el más importante en una concentración óptima de 10 mmol/l, también la activan los iones Br^- y I^- alostéricamente. El F^- es inhibidor.

PH óptimo: 6,9 – 7,0 (a pH ácido se inactiva irreversiblemente).

Isoenzimas: por lo menos 7 en tejidos humanos: páncreas, glándulas salivales y saliva, hígado, músculo (esquelético), tejido adiposo, sangre, orina, heces, leche (mamas), semen, riñón, cerebro, pulmón, trompas de Falopio, intestino, bazo y corazón. La amilasa presente en sangre y orina de individuos normales predominantemente tiene origen pancreático (40%) y salival (60%).

Macroenzimas: complejo de amilasa normal unida, en la mayoría de los casos, a una inmunoglobulina (IgG o IgA) y a polisacáridos en otros casos. El peso molecular estimado va de 150.000 a más de un millón y no puede filtrar en riñón. Son complejos inmunes circulantes que terminan depositándose y originando trastornos renales. Esta unión se produce cuando la amilasa entra en circulación, de manera que en su accionar digestivo no interfiere.

ETAPA PREANALITICA

1) Condiciones del paciente:

FUENTES NO PATOLOGICAS DE VARIACION: BIOLOGICAS Y PREANALITICAS

La actividad de amilasa no se ve afectada por las comidas ni por las horas del día por lo que el ayuno previo es aconsejable, aunque no imprescindible, para evitar un suero lipémico

Edad, sexo y actividad física: no hay diferencias significativas por edad y su actividad es igual tanto en hombres como en mujeres, tampoco se han descripto variaciones por ejercicio previo.

Embarazo: los valores se elevan hasta la 25ª semana y luego descienden gradualmente. Variación que justifica intervalos de referencia por semana de gestación.

Sustancias interferentes conocidas: hemólisis, anticoagulantes (citrato, oxalato y EDTA). En el caso de orina no debe agregarse HCl como conservador. No se observan interferencias por bilirrubina hasta 200 mg/l, hemoglobina hasta 0,5 g/dl y triglicéridos hasta 13 g/l.

Interferencias por drogas: in vivo aumentan la amilasemia aquellas drogas que causan constricción del esfínter de Oddi (ej. narcoanalgésicos, betanecol, secretina). Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

Hemólisis: los eritrocitos no contienen amilasa por lo que la hemólisis no genera interferencias en la mayoría de los métodos excepto aquellos que incluyan una reacción acoplada de la peroxidasa.

2) Toma de muestra:

TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION

Suero obtenido de la manera usual o plasma con heparina como anticoagulante, la amilasa se inactiva frente a EDTA, oxalato y citrato. Si se emplea orina, la determinación puede efectuarse en una muestra de orina ocasional.

En suero la amilasa es estable durante una semana a temperatura ambiente (si se evita la contaminación bacteriana) y, al menos, 6 meses refrigerada (2-10°C), en contenedores bien cerrados. Puede conservarse congelada mucho más tiempo sin pérdida apreciable de actividad. 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.

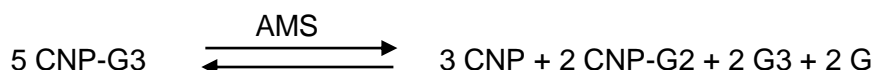
ETAPA ANALITICA

Se han desarrollado muchos métodos para la determinación de amilasa. Todos comienzan con la mezcla de la muestra del paciente con una solución de un polisacárido en un medio con pH regulado. El pH óptimo es 6,9 a 7,0 y es indispensable la presencia de iones calcio y cloruro. Luego de la incubación se mide la actividad de la amilasa mediante diversas técnicas (ver ANEXO I).

1) Metodología: Método cinético a 405 nm para la determinación de amilasa en suero, plasma y orina. Amilasa 405 *cinética unitest* y AA – WIENER Lab (Técnica cromolítica basada en la liberación de un cromógeno a partir de sustratos definidos solubles).

FUNDAMENTO

La α -amilasa cataliza la hidrólisis del sustrato definido 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido (CNP-G3) para liberar 2-cloro-p-nitrofenol (CNP), formándose 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltósido (CNP-G2), maltotriosa (G3) y glucosa según:



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 peso molecular conocido, posibilita la expresión de los resultados en U/l y no requiere enzimas auxiliares.

REACTIVOS

Buffer: MES pH 6; (100 mmol/l).

Sustrato: viales conteniendo CNP-G3 (concentración final 2,25 mmol/l) acetato de calcio (6 mmol/l) cloruro de sodio (70 mmol/l) tiocianato de potasio (900 mmol/l).

Reconstituir en el momento de usar cada vial de sustrato con el volumen de buffer indicado en el rótulo. Tapar y agitar hasta disolución completa.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro". El buffer contiene tiocianato de potasio, tóxico. Evitar su inhalación o el contacto con piel y mucosas.

Para reducir posibles contaminaciones del reactivo con amilasa salival, no debe pipetarse con la boca el buffer ni el sustrato reconstituido.

ESTABILIDAD

Los reactivos provistos son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. El sustrato reconstituido es estable 15 días a temperatura ambiente y 60 días refrigerado.

CONDICIONES DE REACCION (Aumento de absorbancia)

- Longitud de onda: 405 nm.
- Temperatura de reacción: 37°C (celda termostatzada $\pm 0,2^\circ$).
- Tiempo de reacción: 2 minutos.
- Volumen de muestra (50 μ l) y de sustrato reconstituido (2 ml). Si el volumen de lectura del espectrofotómetro lo permite, se pueden disminuir los volúmenes usando 1 ml de sustrato y 20 μ l de muestra utilizando un factor = 3.953 para los cálculos.

PROCEDIMIENTO

Reconstituir el reactivo liofilizado y preincubar a 37°C unos minutos. Agregar la muestra, mezclar por agitación y verter en la cubeta. Registrar la absorbancia disparando el cronómetro simultáneamente. Volver a leer luego de 1 y 2 minutos exactos. Determinar la diferencia entre la segunda y primera lectura ($\Delta A/\text{min}$). Utilizar este valor para los cálculos.

ACTIVIDAD de AMS (U/l) = $\Delta A/\text{min} \times \text{factor}$
Factor = 3.178 para estas condiciones de reacción.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Evitar contaminación con saliva debido a que su contenido en amilasa es unas 700 veces superior al del suero; no pipetear con la boca. Evitar el contacto con elementos de goma (tapones, contratapas) que deterioran el sustrato. Considerar sustancias interferentes conocidas en la muestra.

RENDIMIENTO ANALITICO DEL METODO

REPRODUCIBILIDAD: procesando simultáneamente replicados de una misma muestra en un mismo día: para un nivel de 50,6 U/l se obtuvo un C.V. de 3,48 % y para 417,3 U/l un C.V. de 1,51%. Procesando la misma muestra en días diferentes: para un nivel 48,0 U/l se obtuvo un C.V. de 5,53 % y para 389.9 U/l un C.V. de 1,95%.

RANGO DINAMICO: el rango útil de lectura se extiende hasta 0,250 D.O. Para valores superiores se debe repetir la determinación con muestra diluida (en caso de orina diluir 1:10) con solución fisiológica, corrigiendo los resultados.

VALORES DE REFERENCIA (U/l)

Temperatura 37°C
Suero (U/l) hasta 125 U/l
Orina ocasional hasta 680 U/l

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

ETAPA POSTANALITICA

Interpretación y validación del resultado:

La amilasa, producida principalmente en el páncreas exocrino y en las glándulas salivales, se encuentra elevada en el suero de pacientes con pancreatitis aguda alcanzando los valores más altos entre las 24 y 30 horas posteriores al ataque y declinando luego para volver a los niveles normales entre las 24 y 48 hs siguientes. También se ve aumentada en este caso la excreción urinaria, 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 se asocia también con elevaciones en los niveles de amilasa sérica.

La determinación periódica de isoamilasa pancreática en pacientes epilépticos tratados con ácido valproico y/o con inductores enzimáticos como fenitoína, fenobarbital y carbamazepina podría tener interés en la práctica clínica.

Aquellos casos con actividades séricas aumentadas de esta isoenzima, aún en ausencia de signos clínicos de pancreatitis aguda como vómitos o dolor abdominal, deberían ser especialmente monitorizados bioquímicamente.

Cuando da alta la amilasemia y normal la amilasuria, sospechar presencia de macroamilasa, aunque también puede darse un tipo de Macroamilasemia con actividad de amilasa normal en suero y orina. La mayoría de los pacientes no presentan manifestaciones clínicas.

Comparar esta guía con la guía del inserto provisto por Wiener del método a usar en el trabajo práctico y anotar las coincidencias o diferencias.

Buscar Valores de Referencia y citar la bibliografía.

BIBLIOGRAFIA

Gradwohl- Sonnerwirth- Jaret "Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico" 8ª edición 1983.

Capítulos 9 y 12. Editorial Panamericana.

Todd - Sanford "Diagnóstico clínico por el laboratorio" I. Davidson y J. B. Henry. 8ª edición (1988).

Editorial Salvat.

Kaplan, L. - Pesce, A. "Química Clínica. Técnicas de laboratorio. Fisiopatología. Métodos de Análisis".

Edición en inglés 1984. Editorial Panamericana.

Pesce, A. - Kaplan, L. "Química Clínica. Métodos" Edición 1990 (en inglés 1987). Editorial

Panamericana.

Balcells, Alfonso "La Clínica y el Laboratorio" 16ª edición. Editorial Masson S.A. Barcelona (España).

Clinical Chemistry. 1995. Chapter 20: Enzymes.

Luis Morán Villatoro "Obtención de muestras sanguíneas de calidad analítica" mejoría continua de la etapa preanalítica. Editorial Panamericana. 2001.

Henry, John Bernard M.D. "El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico" 20ª edición homenaje a Todd – Sanford y Davidsohn (2001). Ed. Marbán Libros (España) 2005.

Agregar bibliografía utilizada para estudiar el tema.

ANEXO I

Método	Principio	Uso	Comentarios
1.Viscosimétrico	La degradación del almidón por la amilasa disminuye la viscosidad de la solución; la variación de la viscosidad es proporcional a la actividad de amilasa	Histórico	No es preciso ni exacto
2.Turbidimétrico-nefelométrico	La disminución de la turbidez o de la dispersión de la luz (nefelometría) de una solución de almidón está directamente relacionada con la actividad de amilasa	Poco común	Con sustrato constante, la técnica automatizada es aceptable en precisión
3.Yodométrico (amiloclástico)	La degradación del almidón por la amilasa reduce la reacción del yodo con el almidón; la reducción del producto yodo-almidón azul (Amáx.=660 nm) está inversamente relacionada con la actividad de amilasa	Poco común	Fácilmente adaptable a la mayoría de los laboratorios La variabilidad del sustrato dificulta la estandarización
4.Sacarogénico	La glucosa liberada por el sustrato se determina cuantitativamente, en general mediante un procedimiento enzimático, como el de hexoquinasa o glucosa-oxidasa	Muy común	Puede ser adaptado fácilmente a muchos analizadores automatizados discretos
5.Cromolítico	a. Liberación de un colorante acoplado a un polisacárido insoluble	Común	Laborioso, no adecuado para su automatización
	b. Liberación de cromógeno a partir de sustratos definidos solubles (p-nitrofenilglucósidos)	Cada vez más frecuente	Adecuado para la automatización
6.Fluorescencia	La amilasa degrada el almidón marcado con fluoresceína en fragmentos más pequeños. Estos fragmentos, de rotación más rápida, provocan la despolarización de la fluorescencia emitida. El grado de despolarización está relacionado con la actividad de amilasa	Poco común	Disponible para un único instrumento (Abbott TDx), adecuado para uso como prueba stat