

34  
2ej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

MODIFICACION Y MEJORAMIENTO AL METODO DE  
LA MALTOSA PARA LA DETERMINACION DE AMILASA  
ASI COMO LA CORRELACION Y COMPARACION CON  
OTROS METODOS PARA DICHA DETERMINACION.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

GUDELIA MORENO RUIZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

	Pág.
ABREVIATURAS . . . . .	I
RESUMEN . . . . .	II
I INTRODUCCION . . . . .	1
II OBJETIVO . . . . .	19
III PARTE EXPERIMENTAL . . . . .	20
<i>Método Nefelométrico</i> . . . . .	22
<i>Método de Phadebas</i> . . . . .	25
<i>Método de Caraway</i> . . . . .	26
<i>Método de Maltosa</i> . . . . .	28
IV RESULTADOS . . . . .	35
<i>Método Nefelométrico</i> . . . . .	35
<i>Método de Phadebas</i> . . . . .	40
<i>Método de Caraway</i> . . . . .	40
<i>Método de Maltosa</i> . . . . .	40
V DISCUSION . . . . .	84
VI CONCLUSIONES . . . . .	101
VII BIBLIOGRAFIA . . . . .	103

ABREVIATURAS.

---

EDTA	Acido etilendiaminotetracetico
gr	gramos
hr	hora
IUB	International Union of Biochemistry
IUPAC	International Union Pure and Applied Chemistry
l	litro
lbs	libras
mg	miligramo
ml	mililitro
M	concentraci3n molar
min	minutos
mm	man3metros
N	concentraci3n normal
pH	concentraci3n de iones hidr3geno
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundos
Tris	Tris(hidroxiometil)aminometano
U	Unidades de enzima
U/l	Unidades de enzima/litro
UV	Ultravioleta
°C	Grados centigrados

---

## RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fué encontrar una técnica confiable para la determinación de Amilasa sérica en sayando 4 métodos, basados en los principios amiloclásticos y sacarogénicos. Estos son: el método nefelométrico [11], Phadebas [22], Caraway [9] y el método de Maltosa ó 3,5-dinitrosalicilato [29].

El método nefelométrico resultó afectado en sus resultados por la apariencia del suero (turbio, lipémico) así como la presencia en el sustrato de sustancias que producen en sí fluorescencia. El método de Phadebas es el método de referencia para el método de Maltosa a modificar y nos da resultados estadísticos confiables en cuanto a reproducibilidad - que nos ayudan a correlacionarlo con Maltosa. El método de rutina en este ensayo es el de Caraway aún con sus inconvenientes de verse afectado por la presencia en el suero de -- proteínas y triglicéridos que lo vuelven turbio; el sustrato es inestable y requiere chequearse constantemente. El método de Maltosa es modificado en varias de sus variables (volumen de suero, concentración de sustrato del 2.0% al 0.2%, conservadores, volumen de sustrato) logrando con esto obtener valores reproducibles y precisos así como una estabilidad del sustrato que es superior a los demás métodos con una duración de más de 4 meses si éste se esteriliza. Se eliminan - problemas en la preparación diaria de sustrato, en el costo y dificultad de la técnica.

## INTRODUCCION. (1,2)

Las enzimas son catalizadores naturales de origen proteico, universalmente presente en los organismos vivos donde realizan reacciones bioquímicas de gran especificidad.

Recordemos que las reacciones enzimáticas fueron usadas por el hombre mucho antes que la historia fuera escrita, y así se utilizaron estas en la fermentación alcohólica, la fabricación del queso, la manufactura del vinagre y la levadura en la elaboración del pan. Procesos enzimáticos conocidos desde la antigüedad.

Estas actividades prácticas han ocupado un lugar importante en la historia de lo que hoy se conoce como Enzimología. Un gran avance del Siglo XIX fue el reconocimiento de que las células vivas son las responsables de la fermentación alcohólica y de otro tipo.

Pasteur junto con sus colaboradores terminó con las creencias acerca de que la fermentación y putrefacción eran generadas espontáneamente y estableció que estos procesos eran debidos a la presencia de organismos microscópicos, sin embargo concluyó que sólo se realizaban sobre células intactas (en lo que hoy se ha determinado es la autodestrucción). Posteriormente en 1837 Berzelius reconociendo la naturaleza de la catálisis propuso el término "fermentos" para denominar los catalizadores producidos por células vivas

y más tarde en 1890 los hermanos Buchner dieron otro avance a este campo de la Enzimología mostrando que un extracto de levaduras libre de células fue capaz de fermentar azúcar -- con la producción de alcohol y  $CO_2$ . Con esto se deduce que las levaduras contienen una mezcla compleja de enzimas requeridas para efectuar estas transformaciones y además las enzimas pueden funcionar tanto extra como intracelularmente.

Las investigaciones a principio de siglo concluyeron -- en que una enzima es de naturaleza proteica cuando en 1926 J. B. Sumner aisló la Ureasa como proteína cristalina (ya -- que para entonces Fischer había realizado estudios acerca -- de los enlaces peptídicos entre aminoácidos para la formación de proteínas) y aunque fue tomado con algo de escepticismo, unos cuantos años después se obtuvieron en forma --- cristalina, la pepsina, tripsina, y quimotripsina por Kunitz y Northrop.

Hasta este tiempo sólo se estudiaban las enzimas de -- acuerdo a las reacciones bioquímicas que catalizaban. Fue con la obtención de ellas en forma purificada y cristalizada que también se investigan desde el punto de vista de su composición (proteica) y con ello hay un avance más en cuanto a su papel en las funciones fisiológicas. Por ejemplo -- se conoció que los niveles de fosfatasa alcalina están relacionados con el diagnóstico de enfermedades de sesas y hepato

biliares así como de fosfatasa ácida en pancreopatías y de uropepsina en el examen de funcionamiento gástrico, y no está de más el mencionar que la contracción muscular que requiere de energía está efectuada por reacciones catalizadas por enzimas.

Con el tiempo se han obtenido en forma altamente purificada algunos cientos de enzimas y más de 150 de ellas en estado cristalino sumando cerca de 2000 las que se han --- identificado, siendo todas ellas de origen proteico, con algún complemento de otro origen (puede ser metal u otras sustancias orgánicas).

Las enzimas son usualmente nombradas en términos de la reacción que catalizan. Una costumbre práctica es adicionar el sufijo -ASA al nombre del sustrato sobre el cual la enzima ejerce su acción catalítica; por ejemplo: la enzima que ataca a la urea es la ureasa, arginina es atacada o degradada por arginasa, tirosina por tirosinasa, etc. No obstante, persiste la nomenclatura antigua que no sigue esta regla como es el caso de pepsina, tripsina, renina a -- las cuales se les sigue llamando por sus nombres triviales.

También se ha observado que existe otro tipo de clasificación agrupándolas según sea el objetivo que se persiga: puede ser de investigación o de diagnóstico. En este último se da una clasificación por grupos que catalizan -- reacciones químicas similares, tales como lipasas (sobre -



lipidos], proteinasas (sobre protelnas), oxidasas, etc.

Otra clasificación se basa en el proceso metabólico -- que realizan y así tenemos las fosforilasas, oxidoreducta-- sas, descarboxilasas, hidrolasas, etc.- y dentro de cada -- una de ellas subdivisiones para cada reacción en particu--- lar.

Con todo esto se creó una Comisión Internacional de En zimas en 1961 dependiente de la IUB que adopta una clasifi-- cación sistemática muy parecida a lo que las Convenciones de la IUPAC en Ginebra describen las estructuras de los com-- puestos orgánicos; quedando así una nomenclatura específica para identificarlas, dando una designación numérica para ca-- da una de ellas.

Pero con la práctica se ha visto que Esto no funciona en forma generalizada ya que se manejan más los nombres tri-- viales de ellas y es más fácil identificarlas de esta mane-- ra.

Ahora, no sólo se clasifican sino que también se adop-- taron métodos para medir su actividad ayudados naturalmente por los rápidos métodos de análisis que estaban desarrol-- lándose conjuntamente. Esta cuantificación se basa en determi-- nar la actividad de la enzima relacionada con su probable - concentración en todos los tejidos y en plasma al que lle-- gan como resultado de una destrucción celular que puede ser normal ó anormal (también existen enzimas producidas por el

propio plasma} cuando es anormal podemos referirnos a un daño de un órgano o tejido específico y relacionarlo con una enfermedad. Este criterio de determinar si la actividad en contrada es alta o anormal se basa en el estudio de una --- cierta cantidad de personas aparentemente sanas buscando -- parámetros que nos indiquen que la actividad de una enzima detectada es normal.

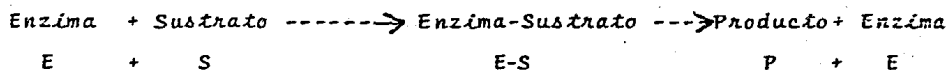
Igualmente también al observar el comportamiento de -- las enzimas y notar que actúan específicamente sobre un solo sustrato ayuda para conocer la composición del sustrato, su peso molecular y sus unidades base. La aplicación con -- relación a su alta especificidad ha ayudado para convertir sustancias cuya cuantificación es difícil a productos de -- reacción siendo esto de forma indirecta. También debemos -- mencionar que las enzimas además de mostrar especificidad -- sobre el sustrato también lo hacen en forma estereoespecífica de forma que un L-Sustrato es atacado sólo por su L-Enzima determinada.

Se ha detectado también la presencia de Isoenzimas en los tejidos al igual que las enzimas y estas son formas diferentes de una enzima pero que presentan idénticas funcio--- nes; esto se ha llevado a cabo por electroforesis o cromatografla en columna. Tal es el caso de la Deshidrogenasas -- Láctica con 4 cadenas de 2 diferentes subunidades que pue-- den combinarse en tetrameros de 5 maneras diferentes con actividad en diferentes órganos.

### Cinética Enzimática. (3, 4 y 5)

Al hacer hincapié al principio de este trabajo sobre las enzimas con catalizadores, no está de más el recordar que un catalizador es una sustancia que acelera una reacción química pero que no es consumida a lo largo del proceso; también se conoce el que la eficiencia de un catalizador en unidad se expresa en moles de Sustrato transformado por moles de catalizador en unidad de tiempo.

La teoría acerca de la catálisis enzimática está dada por Michaelis, Menten y Haldene y se basa en la medición de la velocidad de reacción (o de actividad de la enzima) a la cual transcurre la formación del producto y con la -- formación de un complejo intermedio Enzima-Sustrato. A -- continuación ilustraremos esto:



de aquí que la conversión de Sustrato a Producto sea determinada por la formación del complejo, a mayor concentración de Sustrato mayor formación del complejo y formación del Producto. Todo esto se ve afectado si la cantidad de Enzima permanece constante o si las concentraciones de sustrato son mayores que de enzima y otros factores que mencionaremos más adelante.

Y así tenemos que la velocidad de reacción podemos clasificarla de varios tipos de orden de reacción: Reacción -

de primer orden cuando la velocidad de reacción depende de la concentración de sustrato a una concentración constante de enzima; de segundo orden cuando la velocidad de reacción depende tanto de la concentración de sustrato como de enzima que son variables y de tercer orden incluso ya con alteraciones en la concentración de sustrato (relación no equivalente) con respecto a la concentración de enzima.

Por acuerdo internacional esta velocidad de reacción se reporta en Unidades de Enzima que es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromole de sustrato por minuto bajo condiciones específicas.

Dicha velocidad de reacción se ve alterada por: pH, temperatura, cambios cualitativos y cuantitativos de composición iónica del medio, presencia de activadores (iones metálicos Na, Cu, Mg, etc.) o inhibidores (calor, drogas, radiación UV) así como la concentración de sustrato y otras sustancias que intervengan en la reacción.

Como todos sabemos, en la actualidad podemos diagnosticar la mayoría de las enfermedades que afectan al ser humano mediante el estudio de las enzimas, los electrolitos, y otros compuestos presentes en el plasma; claro está ayudándonos también por estudios básicos como son la exploración del paciente efectuada por el médico y el estudio radiológico entre otros.

Ahora, para el caso de enfermedades de tipo pancreático, su diagnóstico de laboratorio lo basamos en el análisis de sangre, orina, contenido duodenal y exudado peritoneal para la detección de enzimas. Las enzimas más importantes en este caso son la Amilasa y Lipasa aunque algunos autores han considerado que la determinación de lipasa en suero es poco útil y le han dado más importancia al estudio de la Amilasa, pero en la práctica para el diagnóstico de un daño en páncreas se solicita la determinación de ambas enzimas.

Con respecto a la AMILASA es una polisacaridasa, conociéndose 2 tipos de ella: Alfa-amilasa ó alfa, 1-4 glucan 4-glucanhidrolasa presente en tejidos animales y la Beta-amilasa ó alfa, 1,4-glucamalto hidrolasa presente en vegetales; y en el presente trabajo se manejará la actividad de Alfa-amilasa solamente.

En 1831 Leuchs descubrió en saliva la actividad de Amilasa, posteriormente en 1845 Bouchardat la detectó en jugo pancreático y poco después en el mismo año Magendie en sangre. En la actualidad existe un gran volumen de reportes concernientes a ensayos con diferente metodología basada en las características físicas y químicas de esta enzima de acuerdo también en donde deberá ser cuantificada como es el suero, orina, y líquidos biológicos haciéndola actuar sobre un sustrato de almidón de concentración conocida.

La Alfa-amilasa (endoamilasa, amilosa, amilopsina, --

alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.1.) es una enzima que desdobla polisacáridos (almidón, glucógeno) rompiendo al azar enlaces alfa-1,4glucosídicos al segundo puente de enlace desde el extremo reductor.

Tiene un peso molecular de 45,000 con una actividad máxima entre 37-40°C y un pH óptimo de 6.8 y 7.4 y obtenida en forma cristalina de páncreas y saliva. Es estable a temperatura ambiente por una semana, en refrigeración por 2 meses y para períodos más largos a -20°C en el suero.

Sigue una cinética de orden cero y se activa la reacción en presencia de cloruros y bromuros; en cambio el EDTA, citrato y oxalato la inhiben, aunque puede cambiar el orden de reacción dependiendo de las condiciones como las que se mencionaron anteriormente que alteran el comportamiento de la enzima y por tanto la velocidad de reacción.

En humanos, la alfa-Amilasa se encuentra en el páncreas y en saliva principalmente. El páncreas es una glándula mixta: exócrina y endócrina, que participa tanto en la digestión como en la asimilación metabólica de los alimentos. Su participación en la digestión depende de la secreción exócrina del jugo pancreático, mientras que su papel en el metabolismo está relacionado con la secreción endócrina de insulina y glucagón. La patología exócrina del páncreas depende básicamente, de la producción excesiva o insuficiente de enzimas en el jugo pancreático y así ser verti-

do en intestino y de ahí a sangre donde su cuantificación - es de gran ayuda en el diagnóstico. Es por eso que también podemos encontrarla en orina, heces, y otros tejidos.

La amilasa sérica se ve elevada en casos de pancreatitis aguda o por inflamación del páncreas; también en trastornos gastrointestinales (peritonitis, úlceras duodenales, obstrucción intestinal), hepatitis viral, cirrosis hepática o administración de opioides, de aquí la importancia en su determinación en forma inmediata posible ya que no solo es el daño del órgano sino también su funcionamiento alterando la digestión y el nivel sanguíneo de glucosa además de que los órganos a él cercanos también se ven afectados y esto - puede complicarse y llegar incluso a fatales consecuencias.

Sin embargo, el grado de daño es diferente para cada - patología siendo el mayor el caso de la pancreatitis aguda.

En vista de que la determinación de amilasa sérica es muy importante para descartar una pancreatitis de otras enfermedades con sintomatología parecida, y ésta determina---ción se considera como de urgencia, se han desarrollado numerosos métodos para medir la actividad de amilasa en sue---ro, los cuales se pueden agrupar según sus principios.

A continuación presentamos los diferentes métodos existentes para la determinación de amilasa sérica en varios -- grupos ya que sería muy tedioso mencionar a cada uno de --- ellos.

Los métodos manuales clásicos basados en la hidrólisis enzimática de un sustrato de almidón son:

#### 1.- AMILOCLASTICO O IODOMETRICO (8,9)

En 1959 Caraway lo presenta basado en la disminución del color azul conferido por iodo y almidón. Aunque simple y rápido se ha visto que interfieren las proteínas, turbidez, triglicéridos presentes así como la vía de preparación y estabilidad del sustrato. Pero con todo esto sigue siendo de rutina en varios laboratorios.

#### 2.- SACAROGENICOS (6,7)

En 1938 Somogyi crea un método sencillo y práctico donde no hay interferencia por la apariencia del suero -- (turbio, icterico, hemolizado), se emplean pocos reactivos y es de bajo costo encontrándose una variada metodología que se ha perfeccionado día con día.

Este método mide el aumento de azúcares reductores formados (maltosa y glucosa) después de la incubación del suero con sustrato de almidón. Basado en la reducción de ácido pícrico, ácido dinitrosalicílico, o iones cúpricos y férricos en solución alcalina por la liberación enzimática de azúcares; estas soluciones coloridas se miden fotométricamente o por titulación y directamente obtenemos la actividad enzimática.



y en los últimos años buscando un método para el ensayo de esta actividad que además de tener las ventajas de -- los anteriores, elimine problemas tales como la preparación diaria de sustrato, el que sea inestable, falta de reproducibilidad, etc. se han modificado las técnicas anteriores y se han desarrollado nuevos métodos amiloclasticos y sacarogénicos.

De entre los AMILOCLASTICOS tenemos los siguientes métodos:

#### 1.- TURBIDIMETRICOS (8,9)

Estas técnicas se basan en medir la disminución de la turbidez de suspensiones de almidón después de la incubación con material que contiene amilasa. Esta disminución de turbidez se debe a la reducción en tamaño -- del gránulo de almidón asociado con su hidrólisis. -- Los métodos turbidimétricos son muy sencillos y rápidos, sin embargo tienen varios inconvenientes, el principal es que la velocidad de primer orden no es directamente proporcional a la concentración de amilasa.

#### 2.- VISCOSIMETRICOS.

El grado de viscosidad de una solución de almidón es -- debido a los gránulos hinchados. Cuando la alfa-amilasa hidroliza los enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las porciones lineales y ramificadas de los gránulos de al

almidón hidratados hay una *disminución* de la viscosidad. Sin embargo, estos métodos son dependientes de la naturaleza del sustrato además no son recomendables para sueros con baja actividad de amilasa.

### 3.- NEFELOMETRICOS (10,11,12).

Mide la *disminución* en la dispersión de la luz del sustrato que es una suspensión de almidón, a medida que es hidrolizada a fragmentos solubles. Se registra continuamente la dispersión de la luz por una suspensión estable de almidón y la actividad de la enzima es *determinada* cinéticamente.

### 4.- IODOMETRICOS (8,9)

La reacción de iodo-almidón se ha empleado por más de un siglo como un método muy sensible para la determinación de amilasa. En los últimos 70 años ha servido como base de muchos métodos para medir la actividad de la amilasa en materiales biológicos. El primero en *aplicar* el principio iodométrico para la determinación cuantitativa de la Amilasa, fue Wohlgemuth en 1908 (9). Muchas modificaciones de esta técnica se han descrito pero la más aceptada es la propuesta por Somogyi en 1938 (6).

La precisión de este método ha sido puesto en duda por muchos investigadores, quienes han considerado que el

único sustrato recomendable para este método es la -- Amilosa (13), otros autores han demostrado que la amí lasa actúa más rápido sobre la amilopectina que sobre la amilosa. Además, los almidones de diferentes orígenes contienen diferentes proporciones de amilosa y amilopectina. La concentración de iones hidrógeno, y la temperatura afectan considerablemente la reacción iodo-almidón; por otra parte se ha demostrado que las proteínas enlazan iodo, además interfieren la turbidez de la muestra; los triglicéridos, la forma de pre paración del sustrato, y el que es poco estable. Todos estos factores hacen poco recomendable el método iodométrico, sin embargo, es utilizado por un buen número de laboratorios clínicos en nuestro país debido en parte a su sencillez y rapidez con que se efectúa.

De los métodos SACAROGÉNICOS sabemos son preferidos -- sobre los métodos amiloclásticos a pesar de su mayor complejidad ya que se miden los productos de reacción enzimática más que la desaparición del sustrato, pudiendo trabajar en mayores concentraciones del sustrato preservando -- así la linealidad en un mayor rango de actividad de la enzima. Además los métodos-sacarogénicos son afectados menos que los amiloclásticos por la variación del sustrato -- del almidón.

Existen numerosos métodos sacarogénicos, los cuales --

para propósitos prácticos se clasifican sobre sus bases químicas y entre estos tenemos los siguientes:

### 1.- REDUCCION DEL COBRE (14, 15)

Estos métodos son los más populares, basándose en la reducción del cobre por los azúcares liberados como resultado de la acción de la amilasa y el más ampliamente usado es el de Somogyi.

La primera de estas técnicas fue desarrollada por Bertrand lo cual incluye la determinación gravimétrica -- del cobre reducido y de los últimos tenemos el método de Henry y Chiamoni descrito en 1960 que analiza el cobre reducido de acuerdo al procedimiento de Folin y Wu (11), sin embargo, se ha visto que hay variación según el método o técnica de preparación del sustrato.

### 2.- REDUCCION DEL FERRICIANURO (16)

Fingerhult describe este método basado en la capacidad reductora de los azúcares obtenidos por hidrólisis enzimática del almidón de convertir el ferricianuro alcalino en ferrocianuro haciendolo reaccionar con ácido fosfomolibdico.

### 3.- REDUCCION DEL ACIDO PICRICO (17)

De estos se basan en el método descrito en 1915 por -- Lewis y Benedict para la determinación de glucosa san-

guínea. Los azúcares liberados por la hidrólisis del almidón reducen el ácido pícrico formándose picramato. Las unidades de actividad enzimática que se manejan se obtienen de una curva de calibración ó por un método comparativo.

#### 4.- REDUCCION DE ANTRONA [18]

Existen dos métodos publicados, en ambos se cuantifica la glucosa, obtenida por hidrólisis de almidón ó de glucógeno, con antrona. Los azúcares reductores de un filtrado libre de proteínas se tratan junto con el suero y se hacen reaccionar con ácido tricloroacético.

#### 5.- CROMOGENICOS [19, 20, 21 y 30]

Estos métodos combinan la técnica del procedimiento sacarogénico con la rapidez y simplicidad asociada del procedimiento amiloclástico. Estos métodos han sido desarrollados en las últimas décadas utilizando un sustrato que es un polisacárido covalentemente unido a un colorante, sobre el cual actúa la amilasa liberando fragmentos solubles. El sustrato no hidrolizado es precipitado por centrifugación y el desarrollo del color en el sobrenadante contiene los fragmentos liberados que son proporcionales a la actividad de amilasa.

Los sustratos más empleados son:

a) Almidón con azul de remazol brillante.

b) Amilopectina con rojo reactone 2B.

c) Amilosa con Cibacrón azul F<sub>3</sub> GA.

Entre estos métodos se encuentra el método usado en -- 1977 de Phadebas que utiliza un almidón insoluble portador de un colorante azul el cual se hidroliza por la alfa-amilasa dando lugar a fragmentos solubles en ---- agua. La absorbancia de la solución azul está en función de la actividad de enzima presente.

#### 6.- REDUCCION DEL ACIDO DINITROSALICILICO (27-29, 36-37)

Desde 1921, Sumner (35) propuso el uso del ácido 3,5-dinitrosalicílico para la determinación colorimétrica de azúcares reductores, sin embargo, hasta muy recientemente se han reconocido sus ventajas. Se han -- comprobado que el incremento en color es directamente proporcional al número de grupos reductores generado -- por la acción de la amilasa, y además es independiente del tamaño molecular de los productos formados no afectándole la naturaleza del sustrato y por otra parte no interfieren las proteínas. El único problema es que -- produce blancos muy elevados por un aumento en la concentración coloidal. El color de reacción es altamen-

*te sensitivo y ha sido adaptado para medir actividad sacarogénica en microcantidades de suero.*

#### **7.- METODOS AUTOMATIZADOS [31-34]**

*Recientemente se han publicado varios métodos automatizados los cuales se basan en los métodos cromogénicos y en la cuantificación de la maltosa siendo preferibles los últimos.*

*Requieren de aparatos automatizados que cuantifican con exactitud la actividad de enzimas, con poco volumen de muestra, manejo especial y son de alto costo - pues son de importación; esto dificulta su adquisición y uso en este trabajo.*

## OBJETIVO.

La gran cantidad de métodos existentes para la determinación de Amilasa, se debe a que hasta hoy no se ha encon--trado un método lo bastante exacto y preciso para confiar - en él plenamente. Presentan ventajas y desventajas con -- técnicas que van desde lo más sencilllo hasta lo más sofisticado tanto en preparación de reactivos como en aparatos utilizados. Esto nos conduce a buscar una metodología que se aplique para determinar dicha actividad basada en la sencillez de los métodos amiloclásticos y con la precisión de -- los sacarogénicos.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es:

- a) Evaluar los diferentes métodos para determinación de Amilasa que existen en nuestro país y
- b) Modificar uno de ellos para recomendarlo como el más adecuado por su sencillez, rapidez, precisión, estabilidad y bajo costo.

Para esto fueron seleccionados dos métodos amiloclásticos (Nefelométrico, Iodométrico) y dos métodos Sacarogénicos (Cromogénico y Reducción del Acido Dinitrosalicílico) que comparados entre sí, nos lleven a determinar cual sea el más recomendable para su uso en el Laboratorio Clínico.



## PARTE EXPERIMENTAL.

Se han mencionado los métodos a seguir en este trabajo y de acuerdo a la literatura encontramos algunas diferencias entre ellos como son: Tiempo en que se efectúa la prueba, volúmenes usados de reactivos y suero, dos tipos de aparatos para medir la actividad de la enzima y el modo de obtener los resultados ya sea en forma directa, a través de una fórmula o con ayuda de una gráfica.

En lo que respecta a reactivos encontramos que en los métodos Iodométrico y Cromogénico, estos ya vienen incluidos en Kit o sea son preparaciones comerciales que facilita el no ocupar tiempo en la preparación de ellos, no así para el método Nefelométrico que requiere de una preparación diaria del sustrato de almidón.

Cabe mencionar además que no sólo se trabajará la técnica original en el método de Maltosa, sino que además si es necesario se le realizarán algunas modificaciones a fin de lograr su estandarización y estabilización ya que se ha visto que uno de los principales problemas que enfrenta esta determinación es el encontrar un sustrato de almidón (o derivados) que sea estable y no se vea afectado por la solución amortiguadora en la cual se mantenga así como por agentes externos (temperatura, descomposición por luz, etc.).

Así pues, el trabajo experimental que a continuación

se redacta, se divide primeramente en el corrimiento de estos cuatro métodos por separado con modificaciones si son necesarias y posteriormente se trabajarán ya una vez estandarizados varios sueros con estas técnicas a fin de concluir el método o métodos que por sus ventajas tanto de manejo y precisión como por sus resultados estadísticos, será el que reportemos como el más adecuado para su uso en el Laboratorio Clínico y de diagnóstico.

## METODO NEFELOMETRICO (11)

Zinterhofer, L. señala que se puede emplear cualquier nefelómetro ó fluorómetro, por lo tanto se utilizó un Fluorómetro Turner Modelo 110 con filtro primario de transmisión máxima a 405 nm. (10).

### Reactivos.

#### 1.- Solución amortiguadora de Tris

Se pesan 1.812 g de Tris y 0.175 g de cloruro de sodio, se disuelven en agua destilada, se ajusta a un pH de 7.2 con ácido clorhídrico concentrado, y se afora a 1000 ml.

#### 2.- Azida de sodio 0.02 g/ml

Se disuelven 2.0 g de azida de sodio en agua destilada y se lleva a un volumen de 100 ml.

#### 3.- Sustrato stock de almidón al 0.8% en Solución amortiguadora de Tris con concentración 0.1 M y pH 7.2

Se pesan 0.8 g de almidón que se colocan en un matraz volumétrico de 20 ml, agregar 50 ml de solución amortiguadora de Tris agitando constantemente, calentar hasta que esté completamente claro (1-2 min), enfriar a temperatura ambiente, agregar 5 ml de azida de sodio 0.02 g/ml y diluir a 100 ml con solución amorti-

guadora de Tris.

4.- Sustrato de trabajo de almidón.

Se prepara diariamente, se agregan 0.5 ml de ácido -- clorhídrico 0.5 M a 2.5 ml de sustrato stock con el fin de obtener un pH de 7.1 a 7.3

5.- Estandar de turbidez de formazina.

Procedimiento.

1.- Se estadariza el fluorómetro de acuerdo al instructivo de manejo.

2.- Pipetear 5.0 ml de solución de trabajo en las cubetas del aparato, precalentar 5 min/37°C, agregar 0.05 ml de suero, agitar, colocar en el portacubetas, cerrar y anotar las lecturas registradas.

Siguiendo los pasos anteriores, obtuvimos que habla -- resultados variables con corrimientos diarios (véase Ta-- bla al final de página ), así que se procedió a modificar el rango selector (mayor abertura y por tanto sensibili-- dad), concentración de sustrato y volúmenes de suero para determinar alguna falla en cuanto a manejo de material y -- reactivos o sensibilidad del aparato.

Se hacen varios ensayos modificando el rango selector (1X, 3X, 10X) se ensayan varios volúmenes de suero (50, --

100, 150 y 200 microlitros}, además se varía la concentración de sustrato siendo de 0.8%, 1.0% y 2.0% con ácido benzoico y en solución amortiguadora de fosfatos. Los tiempos de reacción son de 0, 5, 10 y 12 minutos y se anotan las lecturas usándose el mismo suero por varios días.

Con esto se realizó una curva patrón con concentraciones de almidón conocidas para observar el comportamiento de la reacción habiéndose determinado tanto la concentración de sustrato como el tiempo en el cual fué completa.

Se mantiene constante la temperatura y el volumen de sustrato.

#### Método Nefelométrico.

Tiempo	0 min	5 min	10 min
Blanco	0.0	0.0	0.0
150 $\mu$ l	14.0	13.0	12.0
	21.0	13.0	14.0
100 $\mu$ l	8.0	8.0	6.0
	18.0	8.0	19.0
50 $\mu$ l	6.0	5.0	5.0
	3.0	1.0	1.0

Lecturas registradas en corrimientos diarios con mismas muestras.

## METODO DE PHADEBAS (22)

Se empleó un Kit de reactivos siguiéndose las instrucciones y basándose en el método propuesto por Ceska, et al.

- 1.- A 200 microlitros de suero contenidos en tubos de ensaye, adicionar 4.0 ml de agua destilada (debe hacerse un blanco con 4.2 ml de agua destilada y efectuar con el toda la técnica).
- 2.- Preincubar en baño maría a 37°C/ 5 min, añadir un comprimido con pinzas, agitar con vibrador durante 10 --- seg. y colocar de nuevo en baño maría por 15 minutos - exactamente.
- 3.- Parar la reacción cumplido este tiempo agregando 1.0 ml de Hidróxido de sodio 0.5 M mezclar con vibrador inmediatamente.
- 4.- Centrifugar a más de 1,500 rpm durante 5 min ó fil---trar. Pipetear el sobrenadante/filtrado a una cubeta.
- 5.- Medir la absorbancia del sobrenadante/filtrado a 620 nm frente a agua destilada.
- 6.- Restar el valor de la absorbancia del blanco del de la muestra problema.
- 7.- Leer la actividad de amilasa en U/l sobre la curva estandar que da directamente la actividad de alfa-amilasa en las muestras de suero.

## METODO CARAWAY [9]

Se empleó el método de Caraway en las siguientes condiciones:

- 1.- Pipetear 5.0 ml del sustrato de almidón en 2 matraces volumétricos de 50.0 ml marcados "problema" y "blanco".
- 2.- Colocar el matraz marcado "Problema" en baño de agua a 37°C por 5 min. El "blanco" no es necesario incubar--lo.
- 3.- Pipetear exactamente 0.1 ml de suero en el fondo del matraz marcado "problema", mezclar bien, y ponerlo de nuevo en el baño por 7 1/2 min. exactamente.
- 4.- Después de este tiempo sacar el matraz "problema" e inmediatamente adicionar 5.0 ml de la solución de trabajo de yodo a cada matraz, y diluir ambos a 50.0 ml con agua destilada mezclando bien por inversión y agitando.
- 5.- Medir la densidad óptica (D.O.) del "problema" y ---- "blanco" contra un blanco de agua destilada a 660 nm en cualquier espectrofotómetro ó en un fotómetro equipado con filtro rojo.
- 6.- Cálculos:

$$\frac{D.O. \text{ blanco} - D.O. \text{ problema}}{D.O. \text{ blanco}} \times 800 = \text{Unidades de Amilasa/100 ml}$$

Sustrato Caraway

Almidón            0.8    gr

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>            26.6    gr

Ac. benzoico        4.2    gr

Aforar a 1000 ml con agua destilada y pH 7.0 ± 0.2



## METODO DE MALTOSA (SACAROGENICO) [29]

Se empleó el método de Dahlqvist preparando los siguientes reactivos:

## 1.- Solución amortiguadora (PBS) 0.05 M pH 6.9

Disolver 3.03 g de fosfato monobásico de potasio anhidro y 3.26 g de fosfato dibásico de sodio dihidratado en agua destilada, diluir a 1000 ml.

## 2.- Sustrato de almidón al 2.0%

Pesar 2.0 g de almidón soluble y 0.04 g de cloruro de sodio disolver en soluc. PBS a un volumen final de 100 ml. El calentamiento no es necesario, después de la adición de 1 a 2 ml de tolueno se guarda en refrigeración. Deberá ser descartado después de una semana.

## 3.- Reactivo de 3,5-dinitrosalicílico (DNSA).

Disolver 10.0 g de DNSA, 16 g de hidróxido de sodio y 300 g de tartrato de sodio y potasio en agua libre de CO<sub>2</sub> y diluir a un volumen final de un litro. Almacenar en frasco ámbar y prepararse al menos 2 días antes de su uso ya que la cantidad de color producida por mg de azúcar fue algunas veces más baja inmediatamente después de la preparación del reactivo.

Es estable por lo menos 6 meses a temperatura ambiente.

#### 4.- Solución estándar de Maltosa.

Disolver 0.4 g de maltosa monohidratada y 0.27 g de ácido benzoico en agua destilada y aforar a 100 ml. - El ácido benzoico actúa como un conservador y no interfiere con el DNSA. La solución es estable por algunas semanas a temperatura ambiente.

#### Procedimiento:

- 1.- Pipetear 1.0 ml de sustrato de almidón al 2.0% en tubo de ensaye para la muestra, preincubar en baño maría a 37°C/5 min. Igualmente correr un "blanco" con 1.0 ml de sustrato.
- 2.- Adicionar 1.0 ml de suero, mezclar y volver a incubar por 60 min. Al "blanco" se le adiciona 1.0 ml de agua destilada.
- 3.- Sacar los tubos del baño y agregar 2.0 ml del reactivo de DNSA.
- 4.- Colocar en baño de agua hirviendo durante 10 min, enfriar al chorro de agua fría y adicionar 20.0 ml de agua destilada.
- 5.- Mezclar y leer a 530 nm frente al "blanco".

El color es estable por lo menos 24 hrs.

Para conocer la concentración de la enzima se interpola en una curva standard.

#### Método de Searcy [27]

##### Reactivos:

- 1.- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.05 M pH 7.0

Se pesan 26.9 g de fosfato monobásico de sodio monohidratado, 8.18 g de fosfato dibásico de sodio pentahidratado y 8.5 g de cloruro de sodio que se disuelven en agua destilada y se afora a 1000 ml.

- 2.- Sustrato de almidón al 1.0 %

Se pesa 1.0 g de almidón soluble que se disuelve en el PBS y se afora a 100 ml.

- 3.- Reactivo de dinitrosalicilato

A 10.0 g de DNSA se le adicionan 200 ml de hidróxido de sodio 2.0 N y 500 ml de agua destilada y se mantiene en agitación magnética por 3 hrs hasta disolución del ácido. Posteriormente agregar 300 g de tartrato de sodio y potasio, disolver, mezclar y aforar a 1000 ml con agua destilada. Esta solución es estable por 6 meses.

*Procedimiento.*

- 1.- Adicionar 0.5 ml de sustrato al 1.0% previamente incubado, a un tubo de ensaye conteniendo 10 microlitros de suero, e incubar a temperatura de 37°C durante 60 min.
- 2.- Adicionar 1.0 ml de DNSA.
- 3.- Colocar en baño de agua hirviendo durante 5 minutos, y enfriar al chorro de agua otro 5 min.
- 4.- Leer a 540 nm contra blanco de agua destilada.

El "blanco" contiene 0.5 ml de sustrato incubado a --- 37° C y 10 microlitros de suero que se adiciona inmediatamente antes de agregar 1.0 ml de DNSA.

**METODO DE DAHLQVIST MODIFICADO**

Se modificó este método con el fin de obtener el método deseado

0.5 ml sustrato + X ml de suero  $\xrightarrow[\text{incubac}]{\text{Temp amb. x min}}$  1.0 ml DNSA  $\xrightarrow[\text{agua herv}]{10 \text{ min}}$  enfriar al chorro de agua

chorro de agua + 10 ml de agua destilada, mezclar y leer a 530 mm.

- A) Se utiliza 0.5 ml. de sustrato de almidón con resultados satisfactorios
- B) En lo que se refiere a temperatura de reacción, se probó a temperatura ambiente y a 37° C.
- C) El tiempo de ebullición en baño de agua fue el mencionado en las 2 técnicas anteriores de 5 a 10 minutos.
- D) El tiempo de incubación se varía desde 3 hasta 120 minutos o sea se trabajó a 3, 6, 10, 15, 20, 30, 60, 90, y 120 minutos.
- E) Volúmenes de reactivos empleados:
- I) DNSA 0.5 y 1.0 ml; también se varió el volumen de
- II) agua destilada siendo de 5 y 10 ml.
- F) Muestra de suero utilizando 0.02, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 y 1.0 ml.
- G) Se hicieron varias concentraciones del sustrato y de los conservadores que se indican a continuación:
- Almidón al 0.2%, 1.5%, 1.2%, 1.0%, 0.8% con Acido Benzoico
- Almidón al 2.0%, 0.8% sin Acido Benzoico

Almidón al 0.8% con Acido salicilico.

Almidón al 0.8%, 0.4% 0.2% con Acido Benzoico, Tris y Cloruro de sodio

Almidón al 0.4% con Acido Benzoico

Almidón al 0.4% con Tris y cloruro de sodio

Y se esterilizan a 15 lbs. de presión, 121° C por 15- minutos:

Almidón al 0.4% con Acido Benzoico y

Almidón al 0.4% con Acido Benzoico, Tris y Cloruro de sodio.

- H) Así mismo también hubo variación en los volúmenes de sustrato que fueron de 0.5% y 1.0 ml.
- I) El pH del sustrato no se le hicieron modificaciones. La literatura reporta un pH óptimo entre 6.9 y 7.2 para este trabajo se prepararon todos los sustratos a un pH de  $7.0 \pm 0.05$ .

#### MATERIAL BIOLÓGICO

Sueros de pacientes tomados al azar sin evidencias de pancreatitis.

## TOMA DE MUESTRAS

Se recolectan 3.0 ml de sangre por punción venosa de pacientes en ayunas, se deja coagular y el suero se separa por centrifugación a 2000 rpm/5 minutos.

## RESULTADOS

Antes de comparar los métodos, se analizaron por separado cada uno de ellos, de tal manera que mencionaremos cada una de las variables trabajadas y los resultados que se observaron.

Se trabajan las 3 últimas técnicas con 50 sueros de pacientes y sueros controles respectivos.

### METODO NEFELOMETRICO

Con el fin de encontrar el rango selector adecuado se ensaya 3X que nos da valores bajos y menos reproducibles al aumentar el tiempo de incubación; con 10X hay una constancia en los resultados con lecturas adecuadas (no muy cercanas a 100 ó 0) ya que a mayor abertura mayor unidades de -- fluorescencia, así que se escoge este último rango selector. (Tabla A).

A mayor volumen de suera, mayor concentración de enzima y se tiene lecturas altas en unidades de fluorescencia, pero 50 microlitos no mostró variación alguna en lecturas -- siendo el volumen óptimo para que la reacción enzimática -- proceda a llevarse a cabo. (Tabla B).

Cuando se efectuó diluciones de suero, había disminu-- ción de concentración de enzima, disminución de la hidrólisis y por tanto se obtienen valores bajos de fluorescencia. (Tabla B).



En lo que respecta al tiempo de reacción vemos que a mayor tiempo la enzima sigue desdoblando al almidón y por tanto la suspensión es menos turbia, va disminuyendo la concentración de enzima libre y se da un aumento en las unidades de fluorescencia siendo hasta un cierto límite como los muestra la Figura 2 con lecturas casi similares entre 10 y 12 minutos, con tiempos mayores las lecturas bajan. Así tenemos que de la técnica original sólo se modifica el tiempo de incubación (10 min) quedando la técnica como sigue:

5.0 ml. sustrato 37°C/5min + 50 microlitros suero 37°C/  
10 min. después se lee en escala directa del aparato.

TABLA A.- Efecto del rango selector en el  
Método Nefelométrico.

Tiempo	3X			10X			
	0'	5'	10'	0'	5'	10'	
BT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
150 $\mu\text{l}$	14,21	13,13	12,14	2	70,73	73,73	83,75
100 $\mu\text{l}$	8,18	8,8	6,19	3	72,74	79,75	88,77
50 $\mu\text{l}$	6,3	5,1	5,1	7	80,84	91,86	97,88

Lecturas registradas en corrimientos diario y mismas muestras

TABLA B.- Efecto de la dilución del suero sobre los  
resultados en Unidades de Fluorescencia.

	U. Fluorescencia		10X
Blanco	0.0		
suero 1:1	80.0	80.0	
1:2	53.0	55.0	
1:3	39.0	37.0	
1:4	29.0	28.0	
1:5	25.0	25.0	

En corrimientos dobles se puede observar la reproducibilidad

## CURVA PATRON PARA AMILASA

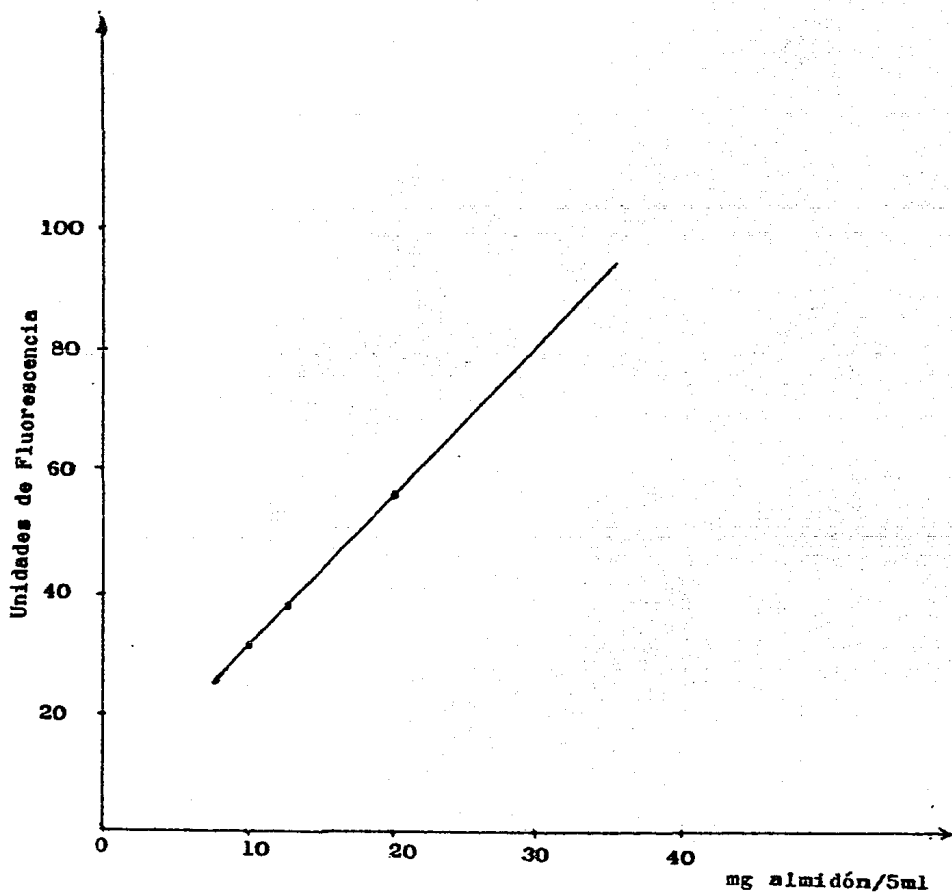


Figura 1.- Método Nefelometrico estandarizado utilizando sustrato de almidón al 0.8%

METODO NEFELOMETRICO  
ACTIVIDAD DE AMILASA SERICA

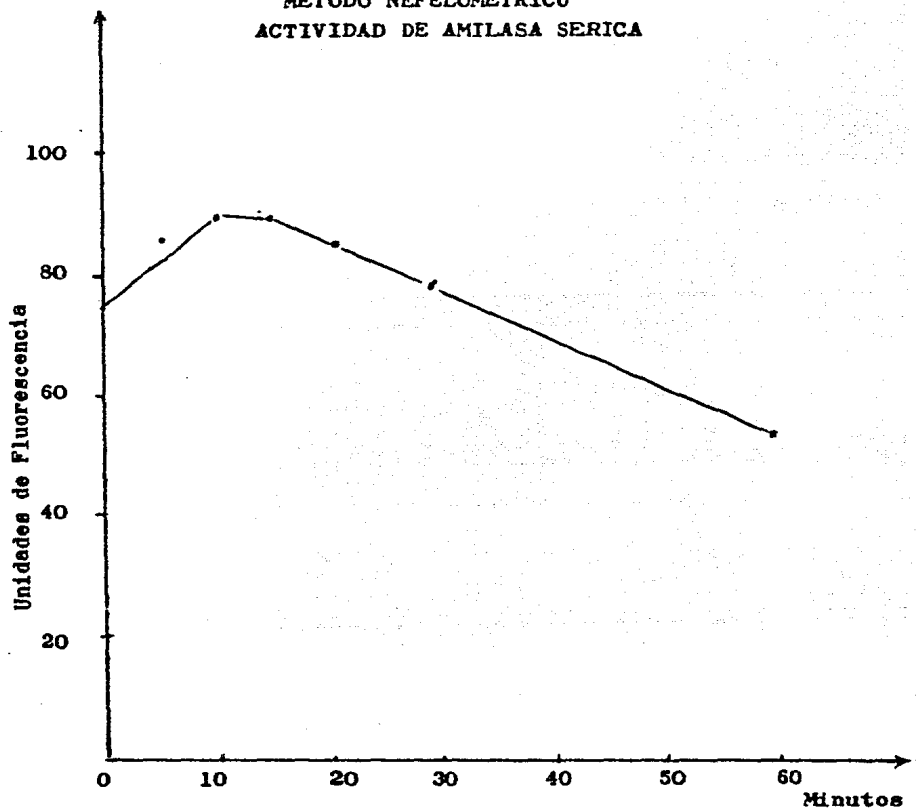


Figura 2.- Efecto del tiempo de incubación para la  
determinación de Amilasa a 37°C

## METODO PHADEBAS

Este método se utilizó como método de referencia para estudiar el método de Maltosa. [Tabla I]

Este sólo se trabajó al correr simultáneamente los 3 métodos y así verificar si los resultados en sueros de pacientes y controles tienen actividad similar de Amilasa (estos métodos enunciados son de Maltosa, Caraway y Phadebas.).

## METODO CARAWAY

En este método al igual que Phadebas, los reactivos ya vienen incluidos, procediendo a trabajarlo como la técnica lo marca.

Los resultados obtenidos con sueros de pacientes y usando controles (normal y elevado) se reportan en Tablas 2 y 3 respectivamente.

## METODO DE MALTOSA

Como observamos lo reportado en el procedimiento, se efectuaron diversas modificaciones a fin de encontrar las condiciones de reacción óptimas con resultados confiables en cuanto a la medición de la actividad de la enzima.

Antes de mencionar los experimentos cinéticos. efectua

dos en este método, se reporta una tabla donde se corren a la vez el suero de 50 pacientes con las 3 técnicas y estandarizadas (el cuarto método nefelométrico se descarta por los inconvenientes señalados en la discusión) y notar su similitud entre el método phadebas y el de maltosa modificado. (Tabla 2 ).

TABLA 1.- Valores estadísticos obtenidos en análisis de Ami lasa sérica por Método de Phadebas.

Valor estadístico	I	II
$\bar{X}$	208.5	558.0
Mediana	201.5	558.5
Rango	167-310	430-685
n	16	4
D.S.	$\pm$ 40	$\pm$ 104.9
C.V. %	5.21	5.31

I.- suero control Orthodiagnostics 225 U/l

II.- suero control Q-PAK Chemistry 541 U/l

n = Núm. muestras

D.S. = desviación estandard

C.V. = coeficiente de variación

$\bar{X}$  = promedio

TABLA 2.

METODO MALTOSA U/L	METODO PHADEBAS U/L	METODO CARAWAY U/dL
155	.247	242.7
160	.160	267.1
140	.105	267.4
155	.61	235.7
155	.159	253.3
125	.114	----
230	.210	235.7
220	.193	182.9
160	.222	267.4
153	.182	302.5
165	.201	130.1
140	.97	165.3
180	.303	211.1
105	.106	158.3
132	.179	200.5
---	---	200.5
220	.290	242.7
165	.215	199.7
215	.218	199.7
138	.76	227.2
125	.114	266.3
130	.81	274.2
185	.208	191.9
135	.282	238.8
140	.212	238.8
150	.260	275.0
---	---	206.2
200	.246	----
215	.128	213.5
185	.171	231.6
260	.163	213.5
215	.240	----
215	.184	----
115	.93	249.9
140	.75	226.6
185	.250	246.3
150	.256	273.3
175	.291	249.9
147	.63	193.3
216	.140	264.2
180	.235	183.5
---	---	294.6
---	---	324.4

(Continúa)

(Continuación).

METODO MALTOSA U/l	METODO PHADEBAS U/l	METODO CARAWAY U/dL
115	280	-----
236	157	132.4
252	263	-----
165	166	86.0
248	172	86.0
221	117	-----
199	91	172.0
---	---	150.0
179	275	-----
---	---	245.0
221	166	245.0
121	90	-----
200	238	276.0
<hr/>		
n 50	50	47
Rango 105-260	61-303	86-324

TABLA DE COMPARACION DE RESULTADOS OBTENIDOS CON SUEROS DE PACIENTES ANALIZADOS POR 3 METODOS.



TABLA 3.- Datos estadísticos de análisis de Amilasa sérica -  
por el método de Caraway con sueros controles.

Estadística	I	II
$\bar{X}$	193.0	327.0
Mediana	180.0	330.0
Rango	92-329	194-365
n	31	27
D.S.	65.5	38.2
C.V. %	3.41	8.54

I suero control 216 U/dl

II suero control 346 U/dl

Todos los resultados a excepción del C.V. son en U/dl

## METODO MALTOSA

Primeramente consideramos la longitud de ondas a la cual se trabaja, no haciendose modificación alguna pues varios artículos al respecto la reportan como la óptima; en seguida trabajamos con temperatura y tiempo de incubación - diversos para encontrar donde la actividad de la enzima actúa totalmente sobre el sustrato sin desnaturalización de ella ni reacción incompleta; posteriormente seguimos con el volumen de sustrato y suero en una relación que exista un enlace Enzima-Sustrato de tal manera que haya una pronta obtención del producto; y finalmente la concentración de sustrato y conservadores de la solución que nos den la velocidad máxima y con esto añadimos la importancia del pH en este proceso enzimático que debido a usar diversos conservadores y soluciones amortiguadoras se vio alterado pero siempre se llevó a pH de  $7.0 \pm 0.2$ .

## EXPERIMENTOS CINETICOS

### Longitud de onda

Se encuentra reportada en la literatura 540 y 530 nm, - por lo que en el presente trabajo se usa longitud de onda de 530 nm. como máxima como lo muestra la Figura 3.

## METODO MALTOSA

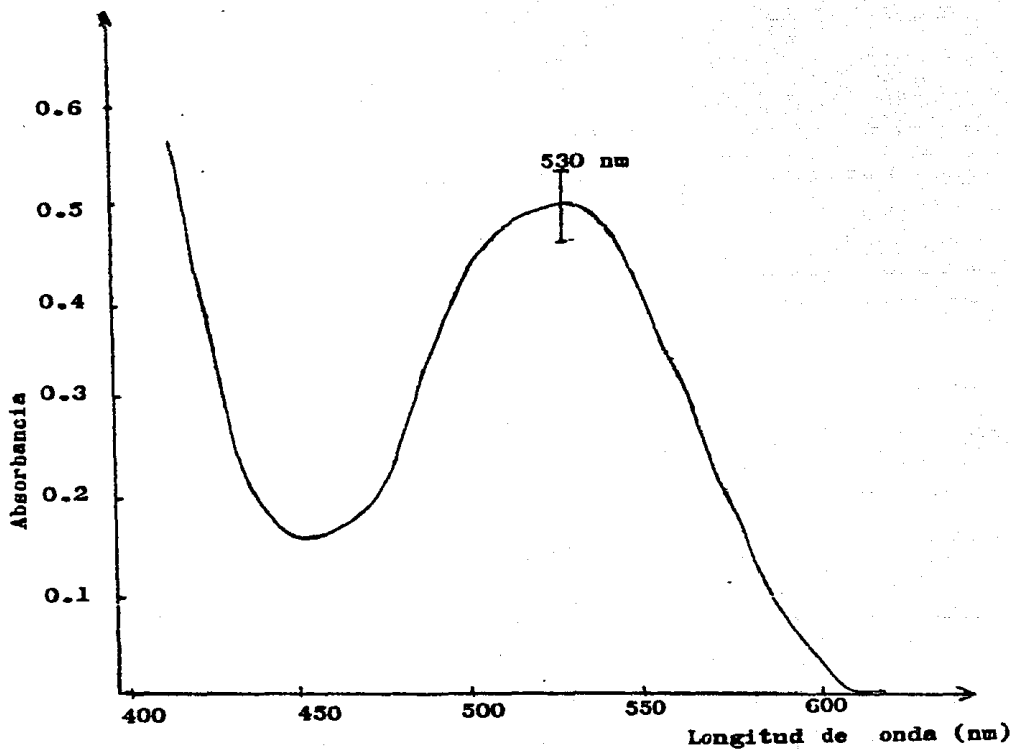


Figura 3.- Espectro de Absorción para la determinación de Ami lasa sérica con una soluc. estandard de Maltosa, al 1.0%, pH 7.0 y 37°C. La máxima absorción es a 530 nm pudiendo utilizarse entre 505-550 nm (Fernández y Sobel 1964).

### Temperatura de reacción.

En los artículos revisados al respecto, la determinación de la actividad de amilasa sérica la llevan a cabo a temperatura ambiente,  $37^{\circ}\text{C}$ , e incluso  $40^{\circ}\text{C}$ .

En incubaciones a  $37^{\circ}\text{C}$  y temperatura ambiente con igual volumen de suero, se obtuvieron valores de Absorbancia mayores a  $37^{\circ}\text{C}$  (Figura 4).

### Tiempo de incubación.

Llevamos a cabo la pre-incubación de 5 min a  $37^{\circ}\text{C}$  para que la reacción se efectúe al máximo pues el sustrato a esta temperatura puede ser atacado fácilmente por la enzima.

A una concentración de sustrato y temperatura de hidrólisis dadas se puede determinar la concentración de enzima en un rango amplio observándose en la Figura 5 que a mayor tiempo de incubación, mayor absorbancia y por tanto mayor concentración de enzima hasta un cierto límite que va generalmente entre los 30 y 60 minutos e incluso 90 minutos de ahí que se escoge 30 minutos de incubación como óptimos ya que para tiempos mayores de incubación la reacción ya se llevó a cabo.

A temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  no se observan estas variaciones sino un constante aumento en Absorbancia al aumentar el tiempo de incubación pero la alfa-amilasa ya no está traba-

jando sino detectamos productos de degradación ó existe saturación de sustrato (Figura 4).

Volumen de Acido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA)

Cuando se efectuó la reacción con 0.5 ml de DNSA a diferentes tiempos de incubación y diferentes volúmenes de suero, el valor de % de transmitancia, obtenido fué mayor de 100.0 de ahí que se utilizó 1.0 ml de DNSA.

Volumen de sustrato.

La técnica original reporta una relación uno a uno de sustrato con respecto a la enzima. En este trabajo siguiendo la misma relación utilizamos 0.5 ml de sustrato sin verse alterados los corrimientos en ensayos repetitivos.

Volumen de suero (concentración de enzima).

La técnica marca un volumen de 1.0 ml de suero y se ensayaron 1000, 500, 250, 100, 50, 20 y hasta 10 microlitros a fin de determinar hasta que mínimo volumen de suero, la reacción era llevada a cabo influyendo también el tiempo de incubación y temperatura de reacción.

La Figura 4 y 5 nos ayuda a determinar 50 microlitros como el volumen de suero donde se presenta una constancia en los resultados a temperatura ambiente.

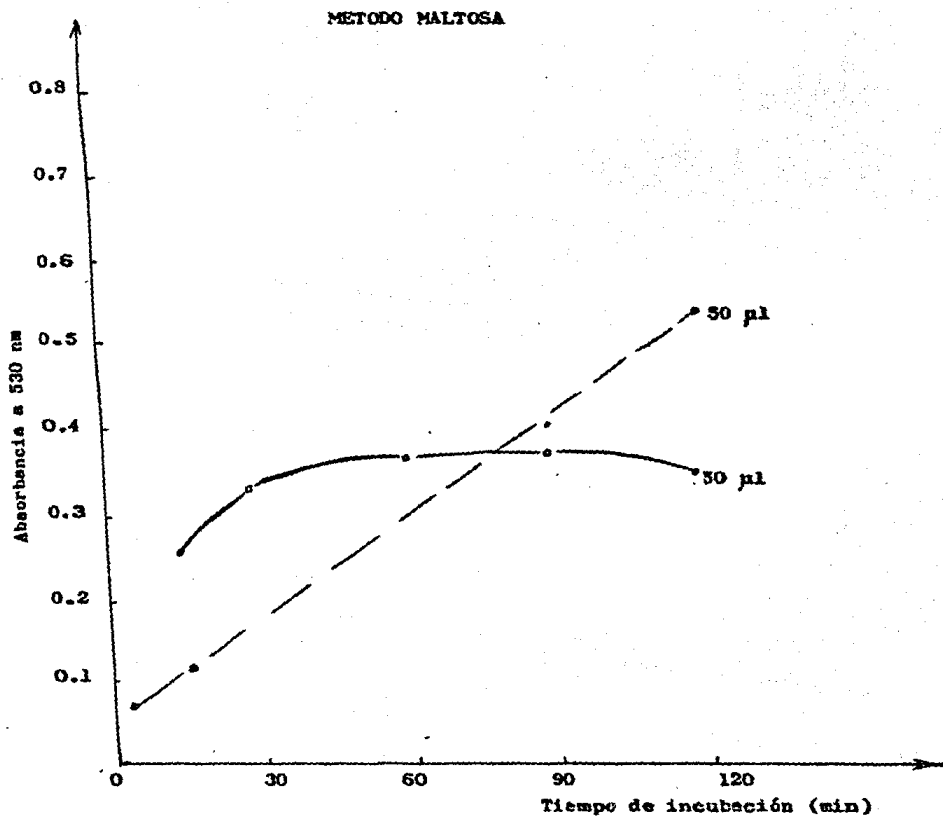


Figura 4.- Influencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción a igual concentración de enzima y sustrato de almidón al 2.0%.

--- 37°C

— Temperatura ambiente

µl microlitros

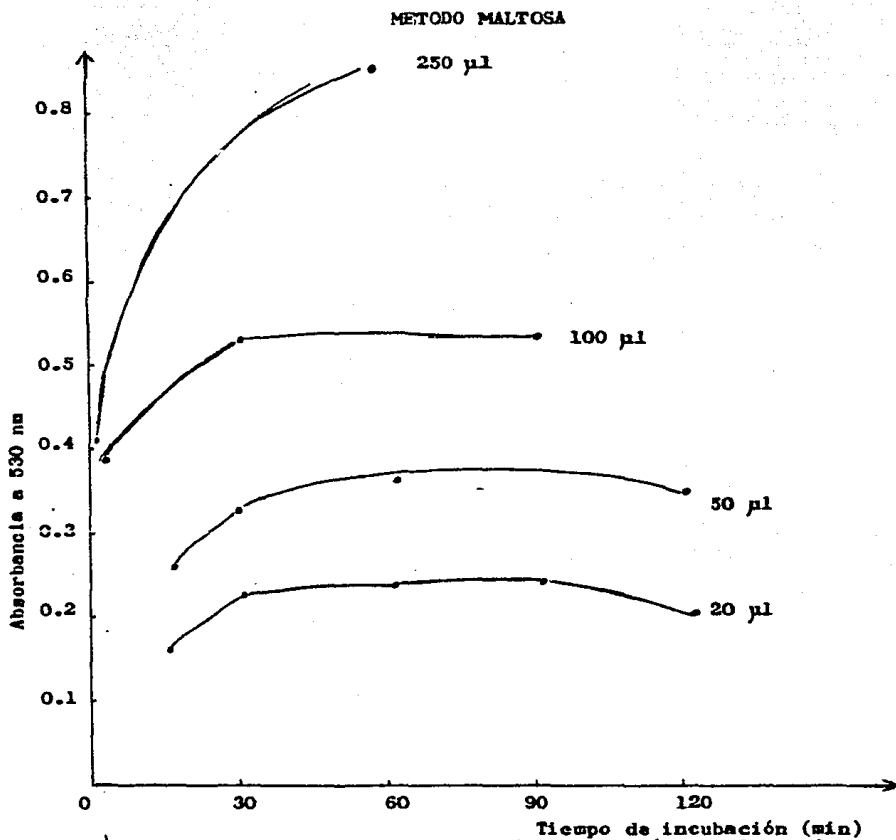


Figura 5.- Influencia del tiempo de incubación y volumen de suero sobre la velocidad de reacción a temperatura ambiente utilizando sustrato de almidón al 2.0%.  $\mu$ l = microlitros

### Concentración de sustrato y conservadores.

El propósito de variar la concentración de sustrato y conservadores es con el fin de analizar si existe ó no, variación en los resultados en Absorbancia ó %T (y con ello actividad de enzima) a medida que cambia la concentración de Almidón y determinar hasta que mínima concentración de éste, se da la reproducibilidad del método.

Iniciamos con almidón al 2.0% con Acido Benzoico 100 mg en lugar de tolueno que marca Dahlqvist y 40 mg de cloruro de sodio pero dura solamente una semana sin enturbiarse.

Seguimos con almidón al 1.5% en iguales cantidades de conservadores dando resultados similares al correrlos ayudados por sueros controles y una solución estandard de Maltosa logrando sólo mantener 12 días la solución (Tabla 4 y 5).

Se prepara almidón al 0.8% sin Acido Benzoico y tan sólo cloruro de sodio obteniéndose resultados muy incongruentes durante 4 días descartando con ello el preparar un sustrato sin conservador.

Cambiando el conservador de Acido Benzoico por ácido salicílico se prepara almidón al 0.8% con 40 mg de ácido salicílico y 40 mg de cloruro de sodio pero notamos que al



correrlo por varios días el % de Transmitancia iba aumentando o sea disminuyendo la concentración de producto determinado y también se enturbiaba con facilidad.

Se procede después a adicionar al sustrato, Tris en almidón al 0.8% en cantidad de 600 mg, 460 mg de cloruro de sodio y 40 mg de ácido benzoico, dando buenos resultados -- además de que se conserva 15 días sin contaminarse ni enturbiarse.

Seguimos disminuyendo la concentración de sustrato al 0.4% preparándolo igualmente y disolviéndolo en agua y no en solución amortiguadora de fosfatos, da un pH elevado que se baja con HCl diluido a  $7.0 \pm 0.2$  dando mejores resultados en corrimientos dobles por varios días comparándolo con Almidón al 0.4% con Acido Benzoico y cloruro de sodio pero sin Tris (Figura 7).

El almidón al 0.4% sólo con Acido Benzoico dura poco dando valores confiables, después varían; se prepara en ---- igual concentración de almidón pero eliminando el ácido benzoico e igualmente nos da resultados variables con sueros -- controles en pocos días por lo que se procede a trabajar --- siempre con estos tres conservadores: Acido Benzoico, Tris y cloruro de sodio como activador de la reacción. (Figura 6).

Intentando disminuir más aún la concentración de sustrato al 0.2% con 600 mg de Tris, 460 mg de cloruro de sodio y

40 mg. de ácido benzoico aumentando el volumen de este en la reacción de 0.5 ml. a 2.0 ml. para compensar la baja concentración de almidón pero se obtienen valores muy variables - en corrimientos dobles durante 3 días por lo que la concentración deseada de Sustrato de Almidón se determina ser de - 0.4% con Tris, cloruro de sodio y ácido benzoico ayudándonos para concluir esto la Figura 6 y un sin número de ensayos con sueros controles y un estándar de Maltosa para cada una de las concentraciones de sustrato ensayadas, así como de datos estadísticos (Tabla 6).

Al ir disminuyendo la concentración de sustrato se toma en cuenta que no haya alteración en los resultados buscando se mantenga la misma formación de producto o sea que - la actividad enzimática no se altere con la disminución de - almidón, como también los conservadores (composición y cantidad) pues no deben alterar la reacción sino solo evitar contaminación e incluso activar. Cuando por efecto del conservador la solución se torna turbia, esta se desecha y se busca que cantidad y condiciones evitan esto.

TABLA 4.- Relación de % Transmitancia determinada en corrimientos triples por el Método de Maltosa usando una estandar de Maltosa al 1.0 %.

Concentración de sustrato	% Transmitancia			Promedio
2.0 %	81.5	80.0	82.0	81.1
1.5 %	81.5	81.5	82.0	81.6
1.2 %	78.5	82.5	83.0	81.3
1.0 %	78.0	77.0	80.0	78.3
0.8 %	78.0	77.5	78.0	77.8
0.8 % *	77.0	68.0	68.0	71.0
0.4 %	82.0	84.0	----	----
0.4 % *	65.0	----	----	----
0.2 %	Resultados Variables.			

\* El sustrato contiene además de ácido benzoico y cloruro de sodio, Tris.

TABLA 5.- Relación de %Transmitancia determinada en corrimientos dobles por el Método de Maltosa usando suero control.

Concentración de sustrato	% Transmitancia	
2.0 %	23.0	22.5
1.5 %	21.5	20.0
1.0 %	19.0	20.0
0.4 %	26.0	26.0

Se observa semejanza en resultados dobles con estos sustratos que contienen Tris, cloruro de sodio y ácido benzoico como conservador.

El suero control utilizado presenta una concentración -  
450 U/1

TABLA 6.- Datos estadísticos de la actividad de Amilasa sérica ensayada con sueros controles de concentración conocida a diferentes concentraciones de sustrato.

Concentración de Sustrato	Suero control UI/1 (frasco)	Ensayo			
		n	X	D.S.	C.V. %
2.0 %	216.0	5	230.0	30.7	13.3
1.5 %	216.0	5	243.0	38.7	15.9
0.8 %	541.0	24	567.0	29.2	5.1
0.8 % <sup>a</sup>	541.0	8	639.2	36.5	5.7
0.4 % <sup>b</sup>	225.0	49	227.4	26.5	11.6

Los sustratos contienen como conservador Acido Benzoico y como activa -- dor cloruro de sodio.

a) no contiene conservador

b) el sustrato contiene además Tris como conservador.

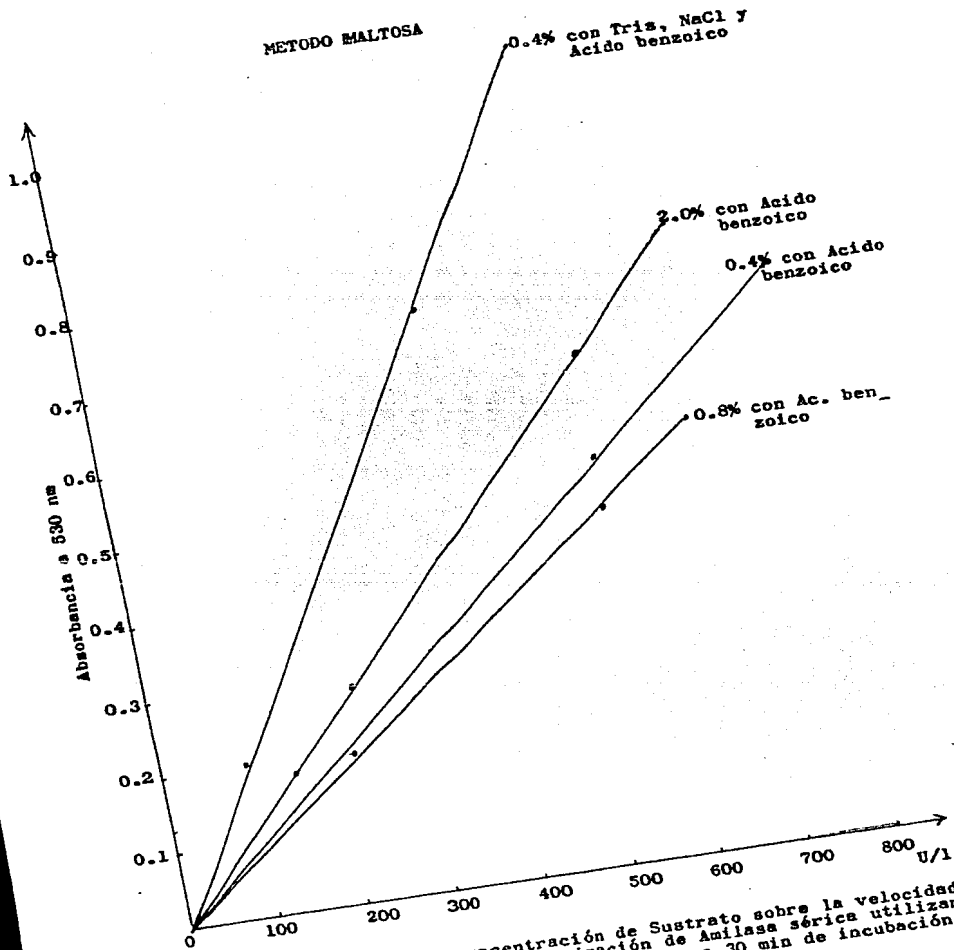


Figura 6.-Efecto de la concentración de Sustrato sobre la velocidad de reacción en la determinación de Amilasa sérica utilizando un suero control elevado y 37°C con 30 min de incubación.

## METODO MALTOSA

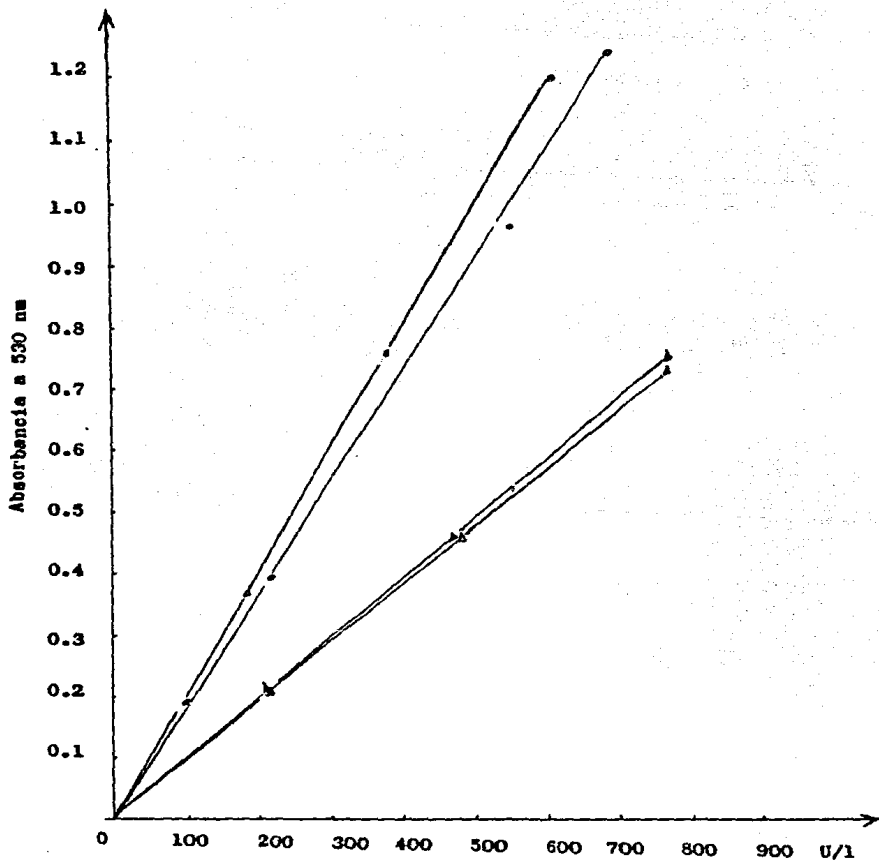


Figura 7.- Efecto de la soln. amortiguadora de TRis sobre la actividad de la Amilasa con almidón al 0.4%, a 37°C y 0.05 ml de suero por duplicado.  
(° con soln amortiguadora de Tris)(Δ sin soln de TRis)

### Sustrato de almidón

Observando que uno de los mayores problemas en la determinación de la actividad de Amilasa es tener un sustrato que permanezca estable sin alteraciones tanto en composición como en aspecto, se busca que la concentración de sustrato, - activadores y conservadores sea la adecuada para obtener resultados confiables.

En la bibliografía se reporta que el almidón no dura muchos días en forma clara sino que se enturbia a los pocos días y recomiendan la reparación diaria de él; esto ocasiona que se cheque diariamente el sustrato con sueros controlados, haciendo la técnica poco práctica.

Esto lo observamos también en este estudio y vemos que el almidón se enturbiaba a los 8 días e incluso antes, con la consiguiente variación en los resultados. Se procede a hervir durante 1 min. el sustrato al prepararlo y esto nos ayuda a evitar el enturbiamiento, durando más de 8 días claro y después se enturbia muy poco en forma ya permanente hasta por 1 mes. Pensamos que el enturbiamiento podría deberse en partes a contaminación bacteriana, lo cual comprobamos haciendo cultivos del sustrato en Gelosa sangre.

Por lo tanto se esteriliza el sustrato de almidón tanto al 0.4 % con Acido Benzoico como al 0.4% con Tris, cloruro



no de sodio y ácido benzoico a 110 ° C, 15 min, 15 lbs. de presión (esta concentración es la mínima de almidón que nos da la reproducibilidad del método) y se procede a correrlos de igual manera, junto con sustratos de la misma concentración pero no estériles a fin de notar si existe diferencia en los resultados encontrados y no sólo esto sino que también se corren días e incluso meses más tarde.

Siempre se desechan cuando presentan turbidez y se efectúan pruebas para detectar si hay contaminación bacteriana.

Primeramente preparamos sustratos de almidón de concentración al 0.4 % con ácido Benzoico, Tris y Cloruro de sodio.

Se divide en volúmenes iguales estos dos sustratos y una parte se esteriliza. El sustrato no estéril se prepara en forma reciente al corrimiento de la prueba ya que se enturbia y más cuando cuando el sustrato solo contiene Ácido Benzoico.

Se trabajan ambos sustratos utilizando un suero control y las lecturas nos indican si hay o no variación.

Este procedimiento se efectúa a los 15 días, 1 mes, 2 meses, 4 meses y a los 7 meses se descarta por turbios pero sin índice de contaminación al cultivarlo en Gelosa sangre.

Observamos que no hay variación en cuando a lecturas de Absorbencia que se traducen en actividad enzimática - pues estas son similares a las del sustrato estéril que sigue permaneciendo claro (Tabla 7).

También diremos que el sustrato al 0.4% que contiene únicamente Acido Benzoico como conservador se descarta - pues en condiciones no estériles se enturbia con gran facilidad a los 15 días.

pH

Dahlqvist en 1962 reportó el pH óptimo de 6.9 al igual que Babson en 1970 observando que además influye la temperatura para la velocidad de reacción, naturaleza del amortiguador, concentración del sustrato, presencia de activadores o inhibidores etc. Basados en lo reportado. se trabajó el sustrato de almidón a varios pH y temperatura constante a fin de encontrar cual es el indicado para la actividad de Amilasa sea máxima (Fig. 8).

TABLA 7.- Relación de actividad de Amilasa sérica al esterilizar el sustrato.

Tiempo	U/1 ESTERIL	U/1 NO ESTERIL	Control
Inicial	295	280	225 U/1
15 días	200	200	225 U/1
1 mes	220	218	225 U/1
2 meses	230	230	225 U/1
4 meses	370	365	346 U/1
7 meses	se descarta por turbio pero sin contaminación		

El sustrato que se ensaya es almidón al 0.4% con Tris, cloruro de sodio y ácido benzoico.

Los resultados encontrados por varios autores son los siguientes:

- Babson A.L. en 1970            6.9
- o Zinterhofer, L. 1973        7.0

Así que al relacionarlos con los encontrados en el presente trabajo se ve lo siguiente:

## METODO MALTOSA

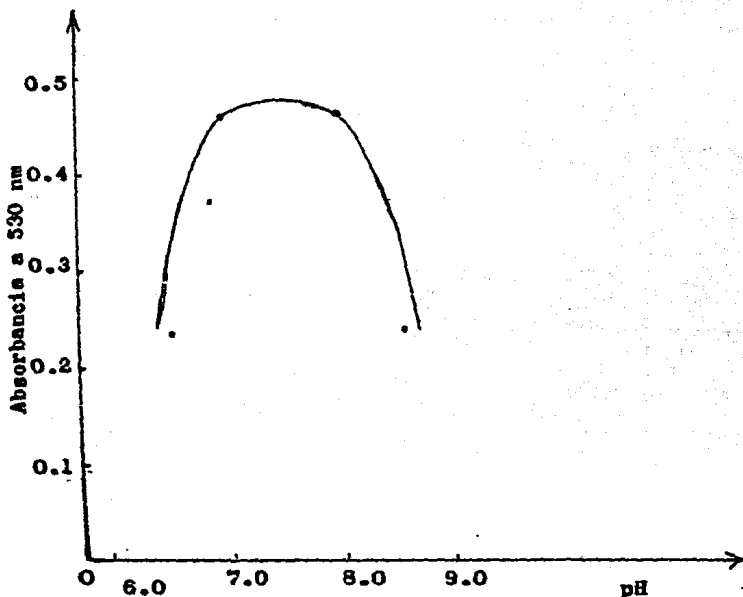


Figura 8.- Efecto del pH sobre la actividad de amilasa a 37°C utilizando Almidón 0.4% con Tris, cloruro de sodio y ácido benzoico.

El rango de pH 6.8-7.2 no presentó cambios significativos en la lectura de Absorbancia del sustrato preparado considerandolo como el óptimo.

### Calibración.

Se usan estandares de concentración que nos ayudan a trazar una curva de calibración que luego nos permite convertir Absorbancia ó % Transmitancia a Actividad enzimática.

Para obtener dicha curva de calibración se utiliza un suero control (por ejemplo P-PAQ Chemistry que contiene 541 U/l), donde diluciones de él nos da valores determinados de Densidad Óptica y graficados estos datos nos ayudan a controlar con exactitud de interpretar los resultados de los análisis.

Tubo No.	Volumen de suero $\mu$ l	D.O.	U/l
1	20.0	0.194	216.4
2	40.0	0.367	432.8
3	50.0	0.456	541.0
4	60.0	0.569	649.2

### Cálculos de la actividad enzimática.

Estos se pueden efectuar mediante 3 formas:

- a) Interpolando directamente en la gráfica estándar el valor encontrado de Absorbancia, lo cual nos da la concentración ó actividad enzimática en la enzima a determinar.
- b) Se trabaja un estándar de concentración conocida, -

dándonos un valor determinado de Absorbancia; esta relación nos lleva a encontrar un factor específico que multiplicado por cada una de las Absorbancias de las muestras a ensayar nos da la concentración existente en cada muestra:

$$\frac{[Std]}{Abs} = \text{Factor} \times \text{Absorbancia de muestra} = \text{concentrac. muestra.}$$

- c) Y por último, mediante una fórmula donde intervienen tanto las Absorbancias de standard y muestra como volúmenes empleados y diluciones.

$$\text{Actividad enzimática (U/l)} = \frac{Abs (m)}{Abs_{std}} \times 10^6 \times Std \times \frac{1}{t} \times \frac{VT}{VS}$$

donde:

$Abs_m$  = Absorbancia de muestra

VT = volumen total

$Abs_{std}$  = Absorbancia de standard

VS = volumen muestra

t = tiempo.

En el presente estudio se efectuó el cálculo de dicha actividad interpolando en la gráfica donde obtenemos valores de U/l, solo que estos resultados no nos ayudan para correlacionarlos con el método de Caraway por ser reportados estos últimos en U/dl y necesitamos de un factor de conversión ya reportado en la literatura.

También como trabajamos con una solución estandard de Maltosa necesitamos aplicar la fórmula mencionada anteriormente ya que su concentración es en mg/100 ml. ó moles/litro. Esto es más práctico puesto que al correr la técnica se hace junto con un estandard de Maltosa y las Absorbencias además de volúmenes y tiempo nos transforma en moles/litro a U/l. Se evita la preparación constante de curvas de calibración al preparar nuevo sustrato y solo se requiere de un estandard de Maltosa que permanece estable por mucho más tiempo.

#### Análisis ó procedimientos estadísticos (38-40)

La media ( $\bar{X}$ ), desviación estandard (D.S.) y coeficiente de variación (C.V.) fueron las medidas usadas para representar los datos.

Sabemos que la amplitud de las series y la desviación estandard permite conocer el grado de dispersión

Ayudados por sueros controles podemos verificar tanto precisión como exactitud, así como detectar posibles errores en la determinación causados por manejo de técnica ó reactivos caducados. Esto repercute en la linealidad y en la precisión de cada serie ó "día a día".

También utilizamos la gráfica de Levey-Jennings para determinar la variación del valor real del suero control al hacerlo por varios días.



A continuación se anotan los resultados de reproducibilidad y precisión del método de Maltosa modificado:

TABLA 8.- Reproducibilidad del método de Maltosa.

U/l enzima	No. muestras	$\bar{X}$	C.V. %	Rango
547	20	567.0 $\pm$ 31.0	5.4	535-620
450	20	435.2 $\pm$ 59.2	13.6	380-485
180	20	173.0 $\pm$ 26.6	15.4	152-220

Se utilizan 20 muestras de suero control, se analiza su alta precisión.

TABLA 9.- PRECISION DEL METODO DE LA MALTOSA

	Std <sup>a</sup>	Normal <sup>b</sup>	Elevado <sup>c</sup>
<i>Mismo día</i>			
$\bar{X}$	173.0	435.2	567.0
D.S.	$\pm 26.6$	$\pm 59.2$	$\pm 37.0$
C.V. %	15.4	13.6	5.4
Rango	152-220	380-485	535-620
n	20	20	20
<i>Día a Día</i>		<i>Normal<sup>d</sup></i>	
$\bar{X}$		227.0	
D.S.		$\pm 9.6$	
C.V. %		4.25	
Rango		215-255	
n		20	

a) 180 U/L

b) 450 U/L

c) 541 U/L

d) 225 U/L

Nota: todos los datos a excepción del C.V. son en U/L

Valores obtenidos con sueros controles de actividad de Amilasa en rango normal y elevado así como un estándar de Maltosa.

### Linealidad del método.

El suero control además de ayudarnos a verificar precisión y exactitud del método a analizar, es útil para determinar - si el ensayo corre en forma lineal, esto es, si sigue la Ley de Lambert y Beer donde al aumentar la concentración (actividad) de la enzima que analizamos aumenta la Absorbancia. Con esto podemos seguir trabajando los sueros problemas y obtener su concentración interpolando en la gráfica. Además también nos indica si al modificar la concentración de sustrato, este mejora o no la técnica. Cuando hay errores en la preparación de reactivos, uso de un suero caducado etc, lo detectamos en la gráfica. La Figura 9 muestra que el ensayo se comporta en forma lineal.

La gráfica de Levey-Jennings (Figura 10) muestra en un - corrimiento por 20 días la precisión del método y el que los sueros trabajados por esta técnica casi no se desvían del valor medio ( $\bar{X}$ ) manteniéndose dentro del rango  $\bar{X} \pm 2$  D.S. que abarca un 95% - de los resultados y es un límite de control aceptable de variación por lo que el método no está fuera de control.

Con todo lo anterior ya expuesto podemos decir que el método de Maltosa modificado nos ha dado muy buenos resultados que - repercute en los análisis estadísticos antes reportados. Cada modificación se ha hecho con un número elevado de ensayos a fin de - evitar errores, así como cada alteración se ha analizado para hacer la técnica no solo sencilla sino también exacta y reproducible.

Los estudios de correlación y regresión los mencionamos más adelante a fin de relacionar este método modificado con los ya existentes utilizando un número adecuado de muestras.

#### Interferencias.

Lo que puede alterar los resultados y exactitud del método puede ser porque las lecturas se hagan en diferentes espectrofotómetros, se usen sueros controles caducados, el pH sustrato sea alto, uso de un sustrato sin conservador, así como la presencia en el suero de drogas.

#### Valores normales.

Este puede estar dado en los reactivos comerciales con una aproximación al valor normal para cada población.

Debe tenerse en cuenta que cada método da resultados diferentes dependiendo de la sensibilidad y precisión de este.

Se considera la raza, sexo, edad, estado nutricional, etc. para dar un valor normal de la enzima analizada.

A mayor número de muestras que se ensayen, mayor exactitud habrá en los resultados.

Para el método de Maltosa modificado usando una solución estandard de Maltosa y bastantes ensayos consideramos que los valores normales abarcando un 95% de las muestras --

que se ensayan están dentro de  $X \pm 2$  D.S. ó sea de 120-226

u/l

CURVA PATRON DE AMILASA  
(METODO MALTOSA MODIFICADO)

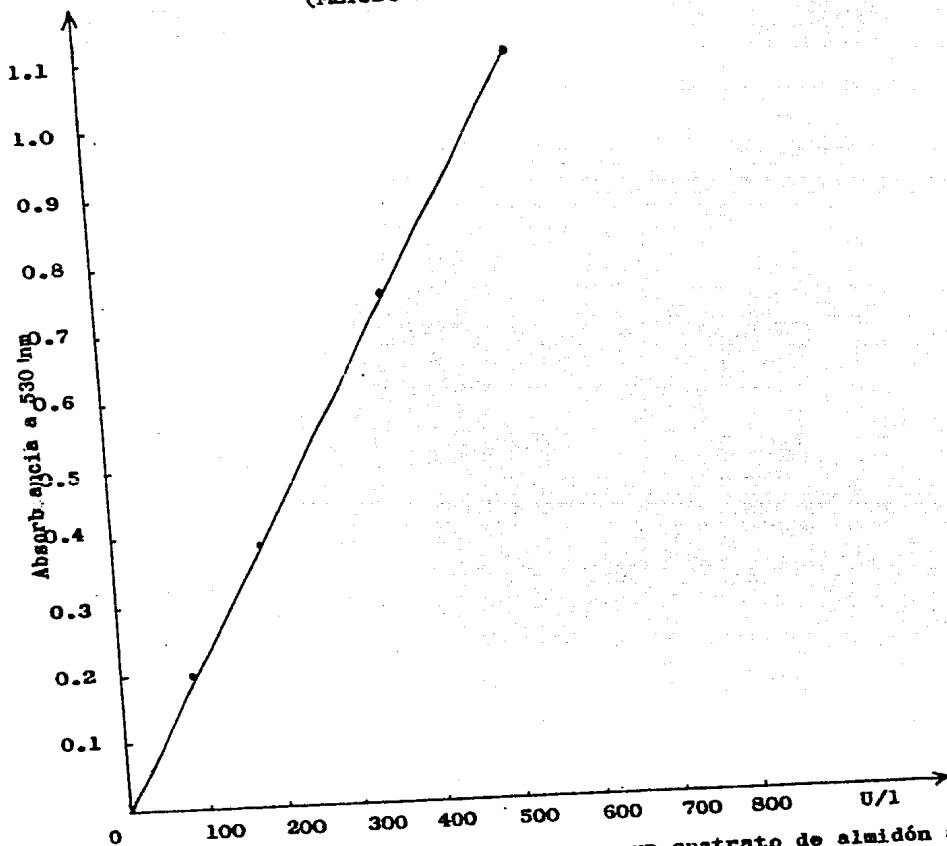


Figura 9.- Linealidad del Método con un sustrato de almidón al 0.4% con Tris, cloruro de sodio y ácido benzoico.

## PRECISION DEL METODO DE MALTOSA MODIFICADO

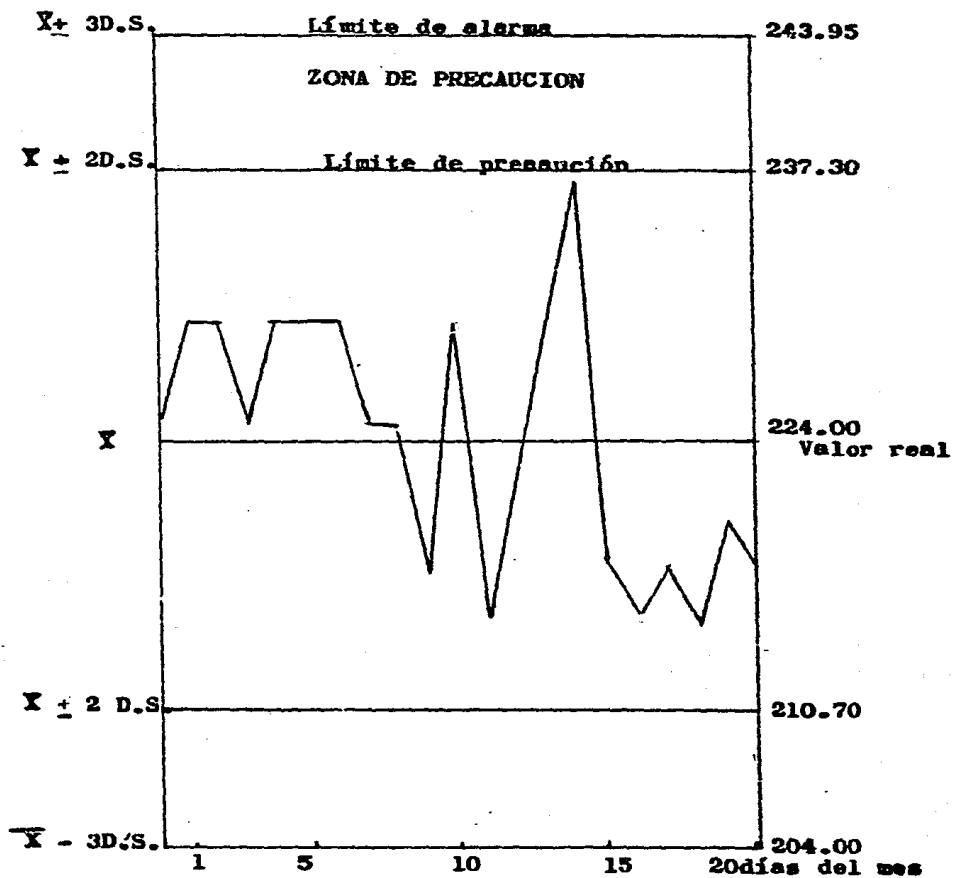


Figura 10.- Gráfica de Lewy-Jennings

## METODO DE MALTOSA MODIFICADO.

### Procedimiento:

Pipetear 0.5 ml de sustrato de almidón al 0.4% en Tris, cloruro de sodio y ácido benzoico (0.4 g de almidón soluble, 600 mg de Tris, 460 mg de cloruro de sodio y 40 mg de ácido benzoico, aforar a 100 ml con agua destilada y pH  $7.0 \pm 0.2$  hirviendo durante 1 min para evitar enturbiamiento) en tubo de ensaye, preincubar en baño maría a  $37^\circ \text{C}/5 \text{ min}$ . Igualmente correr un "blanco" con 0.5 ml de sustrato.

Adicionar 0.05 ml de suero, mezclar y volver a incubar por 30 min. Al "blanco" no se le adiciona nada.

Sacar los tubos del baño y agregar 1.0 ml de DNSA a ambos tubos, "problema" y "Blanco" (Se disuelven 10.0 g de 3,5 - dinitrosalicílico, 16 g de hidróxido de sodio y 300 g de tartrato de sodio y potasio en agua diluyendo a un volumen final de un litro. Almacenar en frasco ámbar y prepararse al menos 2 días antes de su uso. Es estable por lo menos 6 meses a temperatura ambiente).

Colocar en baño de agua hirviendo durante 10 min, enfriar al ahorro de agua fría y adicionar 10.0 ml de agua destilada.

Mezclar y leer a 530 mm frente al "blanco".



CORRELACION ENTRE LOS METODOS DE MALTOSA, PHADEBAS Y CARAWAY PARA LA DETERMINACION DE AMILASA SERICA.

Valoración estadística de los métodos.

La precisión y exactitud de los métodos para determinar Amilasa sérica, fueron obtenidos estadísticamente de acuerdo a las siguientes fórmulas matemáticas:

Exactitud  $\bar{X} = \frac{\sum Xi}{n}$  D.S. =  $\sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$

Precisión  $\bar{X}$ , D.S. y C.V. donde C.V. =  $\frac{D.S.}{\bar{X}} \times 100$

Linearidad  $m = \frac{N \sum xy - (\sum y)(\sum x)}{N \sum x^2 - (\sum x)^2} = \frac{\sum xy - n}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$

Coefficiente de correlación

$$r = \frac{\sum xy - (\sum x \sum y / n)}{\sqrt{\left( \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left( \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right)}}$$

Ecuación de regresión

$$y = \bar{y} + m (x - \bar{x}) = mx + c$$

$\bar{x}$  = promedio, media

D.S. = desviación estándar

C.V. = coeficiente de variación

n. = número de muestras

m = pendiente de la recta

## Factores de conversión

1 Unidad = 0,36 mg maltosa monohidrato = 1  $\mu$ mole maltosa formada/min/ml

Unidades Somogyi (US) = mg glucosa x 30 min x 100 ml

$$= \frac{1000}{180,6} \times \frac{1}{30} \times 10 \mu\text{mol/min/l} = 1.848 \text{ UI/l}$$

Phadebas x 0.54 = US/dl

Phadebas x 0.164 = U Street Close/dl

Medidas nefelométricas x 10 = US/dl

$$\text{U/l} = \text{mU/ml} = \frac{\text{Abs}_m}{\text{Abs}_{std}} \times 10^6 \times \text{Std} \times \frac{1}{x} \times \frac{VT}{VM}$$

## Estudios de comparación.

Comparamos el método de Maltosa propuesto con el método manual ampliamente aceptado de Caraway (9) y el cromogénico de Phadebas (22) por ensayos con 50 sueros de pacientes tomados al azar y sin evidencia de pancreatitis.

Se corren a la vez con iguales condiciones de temperatura e iguales estándares de calibración.

Las tablas y gráficas siguientes muestran la existencia o no de correlación entre estos 3 métodos de acuerdo a los resultados de la Tabla II (pág 42).

Tabla 10.- Concentración de actividad de alfa-amilasa sérica.

MALTOSA U/l	PHADEBAS U/l	CARAWAY U/dl
120-226	70-300	60-160

Rangos de actividad de esta enzima determinada por 3 métodos.

Tabla 11.- Estimación de actividad de alfa-amilasa sérica por 3 diferentes métodos usando sueros controles en ensayos repetitivos.

MARCA	UI/L (fco.)	MALTOSA	PHADEBAS	CARAWAY
Precinorm E	216	230.0	251	193
Orthodiagnosics	225	227.0	208	---
Q-PAK Chemistry	541	567.0	558	---
Kontrollogen	131 US/dL	-----	---	134 US/dL
Precipath E	450	435.2	---	----
Hyland	346 U/dL	-----	---	327 U/dL

Se puede observar la similitud entre el suero control por el método de maltosa y la concentración que lleva.

TABLA 12.- Análisis estadístico de amilasa sérica de pacientes acorde con Tabla 2.

Estadística	MALTOSA	PHADEBAS	CARAWAY
X	175.0	181.0	222.3
Mediana	165.0	180.5	235.7
n	50	50	47
Rango	105-260	67-303	86-324
D.S.	$\pm$ 40.0	$\pm$ 69.3	$\pm$ 51.3
C.V. %	22.8	38.2	23.0

Todo se reporta en U/L ó U/dl para el Método de Caraway  
 Datos estadísticos en sueros de 50 pacientes.

X = promedio

D.S. = desviación estándar

C.V. = Coeficiente de variación

Tabla 13.- Correlación de los 3 métodos de ensayo de Amilasa sérica.

Entidad de	Phadebas (x)	Caraway (x)	Phadebas (y)
Correlación:	Vs.	Vs.	Vs.
	Caraway (y)	Maltosa (y)	Maltosa (x)
Ec. regresión	$y=0.10x + 202.7$	$y=-0.75x + 338$	$y=0.44x + 95.74$
r	0.16	-0.77	0.26
n	41	41	47

## METODO MALTOSA

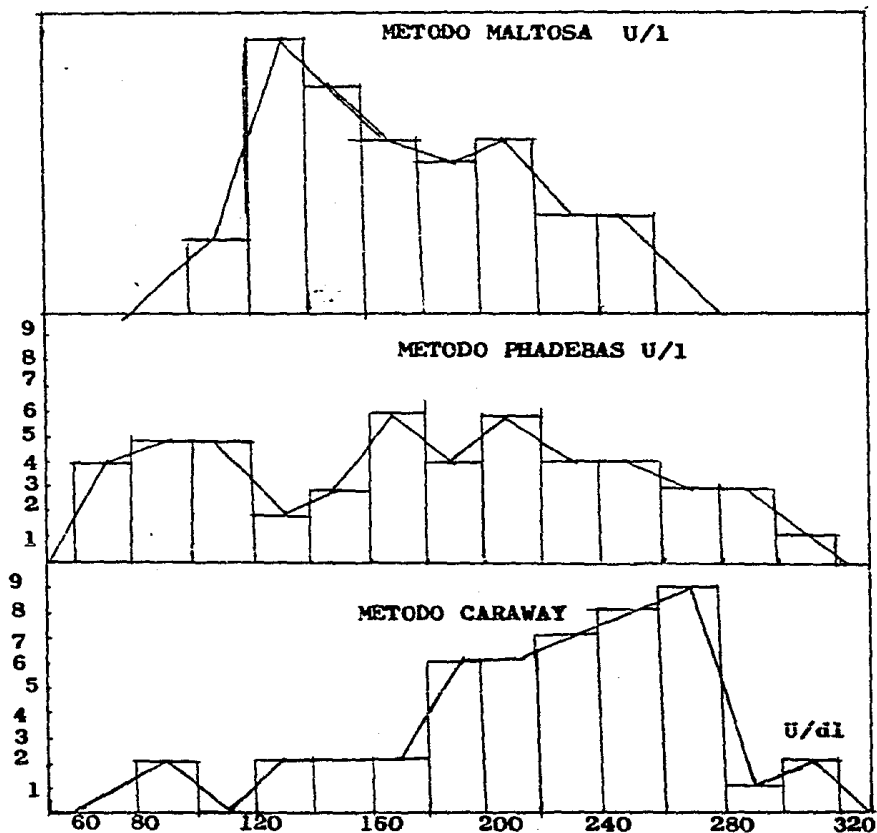


Figura 11.- Distribución de Frecuencias en la determinación de Amilasa sérica.

TABLA No. 14

COMPARACION DE METODOS EN LA DETERMINACION DE ALFA-AMILASA  
UTILIZANDO ANALISIS DE VARIANZA

METODO	n	MEDIA	D.S.	p-		(3)
				(T)MALTOSA VS:	PHADEBAS VS: ANDEVA	
MALTOSA U/l	50	174.7	40.4			(4)
PHADEBAS U/L	50	183.0	66.8	N.S. (2)		.05 .005 (5)
CARAWAY U/dl	45	222.3	51.84	.005	.005	

(1) Prueba de hipótesis para diferencias apareadas

(2) No significativa

(3) ANALISIS DE VARIANZA de un diseño aleatorizado en bloques

(4) Diferencia significativa de sueros

(5) Diferencia significativa en métodos



## DISCUSION .

En el Laboratorio Clínico cada día se hace más énfasis en mejorar las técnicas de análisis, en reducir el costo de éstas, en proveer resultados lo más exactos posibles. Estos -- son esfuerzos muy importantes y de gran beneficio para el paciente y para los médicos que dependen y confían en la eficacia del Laboratorio.

La literatura relacionada con el análisis de actividad de Amilasa es voluminosa y las fechas comienzan el siglo pasado. La mayoría de los parámetros enzimáticos relacionados con la determinación cuantitativa de Amilasa ha sido investigado y numerosas modificaciones probadas. El tiempo de incubación ha sido aumentado y disminuido, la concentración de sustrato variado, las fuentes biológicas y la preparación del sustrato de almidón investigado, se han hecho intentos para establizar el sustrato de almidón y se han alterado los métodos -- para la detección del rompimiento hidrolítico comparándose. Esta investigación extensiva de métodos refleja la insatis-- facción de los analizistas con las técnicas para el análisis -- de la Amilasa.

Nos dimos a la tarea de probar mejorar estos métodos para eliminar los problemas y desventajas que presentan así como modificar condiciones de reacción y tener un método de ensayo accesible.

Realizamos este trabajo comparando 4 métodos con la finalidad de seleccionar el mejor y ver la posibilidad de superarlo, trabajando y conociendo las desventajas de ellos además de sus ventajas y evaluar su precisión y requerimientos, analizando el porque aún algunos de ellos permanecen en tanto que otros han caído en desuso en la actualidad.

El problema principal en todos los análisis de Amilasa, parece residir principalmente en el sustrato de almidón. El almidón es heterogéneo tanto en el peso molecular como en el grado de ramificación dos factores los cuales pueden afectar profundamente la susceptibilidad del almidón a la acción de la Amilasa.

Por otra parte tenemos los METODOS NEFELOMETRICOS que -- son muy rápidos y sencillos con el inconveniente que se debe contar con un Nefelómetro para poder efectuarlos. Sin embargo, no ofrecen ventajas sobre los métodos sacarogénicos porque también requieren corrección con blancos de suero, los cuales frecuentemente dan blancos elevados como consecuencia de fluorescencia no específica, además de que estos métodos no son adecuados para la determinación de amilasa en orina. Al ser hidrolizado el almidón por la amilasa, formándose Maltosa va disminuyendo la dispersión de la suspensión de sustrato ó la turbidez que se traduce en un aumento en la unidades de fluorescencia.

Este método no presenta un control o estandard de ayuda, además entre sus desventajas está el que la dispersión de la

luz [y por tanto la intensidad de la fluorescencia] se ve -- afectada al trabajar con sueros ictericos, hemolizados o lipémicos (turbios) y no siempre se puede trabajar con sueros aparentemente normales; esto influyó para que se registraran datos variables en sueros de pacientes que se corrieron dobles durante 2 ó 3 días aún conservando la misma concentración de sustrato.

Conociendo la sensibilidad del nefelómetro a cambios de turbidez pues una muestra ó standard que varle en apariencia (ocasionado por diversas causas), en pH, temperatura, en condiciones de reacción constantes tales son: temperatura de 37°C, concentración de sustrato al 0.8%, pH de 7.2 y tiempo de reacción más prolongado que el reportado.

Vemos en la Figura 2 que la reacción se lleva a cabo aún hasta los 12 minutos y posteriormente disminuye la intensidad de fluorescencia siendo esto muy inconstante en ensayos repetitivo por lo que se procede a variar la concentración de sustrato del 2.0% al 1.0% y 0.8% en Buffer Tris-NaCl 0.1M pH 7.2. Diluciones de una solución estándar utilizando este sustrato nos da varias concentraciones que nos permite -- trazar una curva (Figura 1) y con esto checar si los Filtros primario y secundario permiten medir la fluorescencia por dejar pasar la luz emitida a través de la suspensión de almidón así como el rango selector para medir más exactamente -- esta intensidad.

Los resultados permanecían constantes solo 2 ó 3 días y después presentaban inconstancia lo que no hace el método re producible, al preparar después el sustrato al 2.0% usando ácido benzoico como conservador que evita el enturbiamiento obtenemos igual falta de reproducibilidad y aunque se pudo estandarizar otras variables que son sumamente importantes en la determinación fluorométrica, la inestabilidad del sustrato nos desanima para poder emplearlo como método de rutina. El costo de los reactivos y la facilidad para adquirirlos es fácil así como el tiempo en que se efectúa es corto (20 minutos aproximadamente) pero el equipo que se utiliza es caro y sale del presupuesto común de un Laboratorio para ser usado como única prueba.

Los Métodos Cromogénicos son una combinación de los procedimientos sacarogénicos con la rapidez y sencillez del procedimiento amilolítico. Estos métodos utilizan un polisacrido covalentemente unido a un colorante sobre el cual actúa la amilasa liberando fragmentos solubles que son proporcionales a la actividad de amilasa.

Entre estos métodos se encuentra el METODO DE PHADEBAS, - considerando como el método de referencia en los países europeos, aunque algunos autores consideren que esto no debe ser, pero comparando con otros métodos es bueno. Algunos de los inconvenientes es que produce un blanco elevado, la cantidad de colorante liberado varía de lote a lote, además si existe

correlación entre Unidades Somogyi, Street Close y Unidades Internacionales (24). El método es sencillo y sigue la cinética de orden cero lo cual da una curva de calibración lineal, por otra parte con frecuencia se obtienen valores elevados de amilasa, cuando se compara con otros métodos.

Presenta estabilidad con sus reactivos, fácil manejo de ellos rapidez, sencillez y reproducibilidad como se observa en la Tabla No. 1 donde un bajo valor de desviación estándar y coeficiente de variación indica un método reproducible en el caso de suero control I, no así para el control II debido al poco número de muestras que se ensayaron (cuatro) pero el coeficiente de variación de 5.3% nos sigue indicando su precisión y reproducibilidad.

Esto nos ayudó bastante para correlacionarlo con Maltosa y decir que al presentar valores de la actividad de enzima -- muy similares tanto en sueros controles como muestras, la precisión del método modificado es bastante confiable, y nos da la pauta para cada una de las conclusiones del método de Maltosa.

Desafortunadamente y dadas las condiciones de importación es difícil su adquisición y nos vemos obligados a estudiar -- técnicas y procesos sencillos y prácticos y con bajo costo para seguir trabajando estas técnicas, aunque es fácil y su -- tiempo de realización de aproximadamente 30 minutos, es costoso.

Las técnicas basadas sobre el principio amiloclástico explotan el hecho de que hay una pérdida progresiva en la reacción de color iodo-almidón durante la hidrólisis del almidón; en contraste, los análisis sacarogénicos de amilasa miden el incremento en el poder reductor del sustrato según sean ro-tos los enlaces glucosídicos por la amilasa.

El almidón en solución sufre retrogradación (21) ó un fenómeno de envejecimiento (20) que es una asociación de cade-nas para formar miscelas más grandes, las cuales hacen al almidón menos susceptible a la hidrólisis con Amilasa. De es-ta manera se presenta una variable adicional, dependiendo de la edad de la solución del sustrato de almidón. Este fenómeno de envejecimiento se observa claramente en el sustrato de almidón preparado por el método de Caraway. Algunos autores, han pensado en utilizar un sustrato de estructura química homogénea, como un oligosacárido ó maltosido susceptible a la hidrólisis de alfa-amilasa pero los resultados obtenidos han descartado esta idea.

Del METODO DE CARAWAY usamos los reactivos comerciales y sueros estándares dando una variación en los resultados de -corrimientos durante varios días con un rango bastante amplio y alejado del valor que tiene el estándar control II (Tabla 3) y que no se espera obtener usándose sueros controles, debido quizás a que se pasa un poco de tiempo en leer afectan-do los resultados (la disminución de color conferida por --

iodo-almidón se ve afectado con el paso de tiempo y la temperatura. La estabilidad del sustrato no fue eficiente pues trabajando el mismo durante todos los exámenes el valor en Transmittancia del "blanco" varió manteniendo constante los reactivos, sustrato y sueros controles.

Adicionado a esto se encuentra que el volumen final es aproximadamente 5 veces más que en la técnica de Maltosa; y como se ha mencionado anteriormente, presenta poca precisión por verse afectado también por la presencia de proteínas, -- turbidez del suero, el pH y la temperatura. Pero con todo esto sigue usándose.

No se desea rechazarlo pues siendo sencillo y rápido es práctico y por tal motivo también se prepararon los reactivos en el Laboratorio: un sustrato de almidón con un buffer y conservador, una solución de yodo diluida como se está reportado y condiciones exteriores adecuadas, para hacerlo aún más fácil de adquirirlo.

La concentración o actividad de Amilasa fue mayor usando el estandar I a los anteriores con reactivos comerciales, -- en tanto que con el estandar II son similares pero aún así -- no hay resultados similares de un día a otro.

También el variar la concentración de reactivos del sustrato para utilizarlo como sustrato para el método de Maltosa hubo variación pues no son los mismos valores de Absorban

cía cuando se usa el sustrato al 0,8% y ni entre ellos mismos siendo más observable en el caso del suero control II. Este sustrato no contiene cloro que active la reacción y presenta mayor cantidad de conservador que de almidón haciendo que se enturbie con mayor rapidez y sea poco estable.

Otra variación que encontramos fue el que se reporta la actividad de la enzima en U/dl al contrario de los otros métodos, que lo hacen en U/l; pero mediante un factor de conversión se logra intercambiar las unidades (10), este factor es 1,848. Por todas las alteraciones anteriores debe chequearse constantemente la estabilidad del sustrato con sueros controles. Aunque fácilmente se adquieren los reactivos, el equipo es el usado en un laboratorio, el costo es bajo comparado con el de Phadebas, su inestabilidad lo hace un tanto impropio.

Para los métodos SACAROGÉNICOS el reactivo de 3,5-dinitrosalicilato para la determinación de azúcares reductores fue introducido por Sumner (35). La reacción química y la estructura de la sustancia de color formada han sido cuidadosamente investigados por Hostettler, Borel & Deuel (1951). La aplicación de este método para determinar azúcares durante el análisis de enzimas fue primero hecho por Sumner y Howel (1953) y para la determinación de la actividad de Amilasa, fue aplicado por primera vez por Mayer, Fischer y Bernfel (1947).

Nosotros empleamos el método de Dahlqvist (29), al cual se le hicieron algunas modificaciones debido a que el mismo



autor observó que curvas estandar preparadas con el reactivo DNSA, frecuentemente no obedecen la Ley de Lambert y Beer ya que no pasa por el origen. Por tal motivo varios autores han criticado este método, además de que se obtienen blancos que tienen densidad óptica elevada debido al almidón y las dextrinas digeridas en la hidrólisis alcalina al pH de 11.4 lo cual es altamente dependiente del tiempo de calentamiento.

En el ensayo de este método cada una de las modificaciones al método original (29) se basaron en corregir las desventajas que éste presenta y hacerlo de aplicación rutinaria.

El principal enfoque fue la de un sustrato estable pero naturalmente esto se ve influido por los volúmenes de suero, y reactivos, el tiempo de incubación de la enzima para que hidrolice el sustrato y el producto sea evaluado eficazmente, pH, etc.

La longitud de onda no la variamos por considerar un valor ya estandarizado debido al producto a determinar. La temperatura de 37°C es óptima para el ensayo de casi todas las enzimas dándose una buena actividad de ellas y así lo seguimos por obtener mejor valor de Absorbancia que a temperatura ambiente (Figura 4). El tiempo de incubación se basa en que a temperatura ambiente la reacción fue completa a los 30 minutos permaneciendo la misma lectura de Absorbancia hasta los 90 minutos; a temperatura de 37°C se da una reacción más

rápida pero consideramos que en este tiempo la enzima ya actuó totalmente sobre el sustrato (Figura 5). El volumen de DNSA y de Sustrato es conforme a la técnica sin modificarlos. El volumen de suero se determina basándose hasta que mínima cantidad de enzima la reacción sigue la cinética de orden cero y linealidad siendo a 37° C de 50 microlitros (Figura 4).

Va una vez estandarizado lo anterior procedimos a encontrar la concentración mínima de sustrato que nos de una metodología confiable y reproducible. Al ir disminuyendo la concentración de almidón para la preparación del sustrato del 2.0% hasta 0.4% (0.2% dió valores mucho muy incongruentes) encontramos tanto reproducibilidad en los resultados (Tabla 4 y 5) como linealidad y cumplimiento de la Ley de Lambert y Beer (Figura 6). Los conservadores de Tris, cloruro de sodio y ácido benzoico finalmente nos dieron una estabilidad al sustrato sin enturbiarlo y con la misma acción por más tiempo (Figura 7).

Babson S.R., CLIN CHIM ACTA 44(2):193 F.973, reporta un sustrato estable cuando se esteriliza así que al sustrato ya estandarizado al 0.4% con Tris, cloruro de sodio y ácido benzoico y con un tiempo de uso de aproximadamente 15 días lo esterilizamos a 110°C/15 min/15 lbs y se ensaya al paso de los días, e incluso meses junto con un sustrato no estéril. La Tabla 7 nos reporta que puede durar más de 4 meses sin modificar los resultados (producto formado) y permaneciendo éla

no logrando con esto la batalla contra la inestabilidad del sustrato.

Y por último el pH reportado para una mejor actividad de la enzima es de  $7.0 \pm 0.2$ , solamente ensayamos para verificar si con el cambio en la concentración de sustrato este -- rango no lo altera, la mejor actividad fue entre 6.8 y 7.2 [Figura 8].

Este método es de bajo costo, fácil adquisición de reactivos y su preparación, el material y equipo es el común y no presenta una técnica sofisticada.

Considerando todas las referencias anteriores, de cada uno de los métodos mencionados y analizando cada uno de --- ellos encontramos que el METODO NEFELOMETRICO, además de sus inconvenientes ya indicados, nosotros observamos que interfieren las proteínas obteniéndose valores elevados, también los sueros lipémicos dan resultados muy elevados. Por otra parte, niveles de bilirrubina mayores de 2 mg/100 ml también dan valores elevados, por lo tanto consideramos que este método debe descartarse para la determinación de Amilasa en -- suero, a pesar de que algunos autores lo consideran como --- bueno, ya que además, se necesita una solución de sustrato -- de almidón fresco, lo cual quiere tiempo para su preparación y esto le resta ventajas en cuanto a la rapidez del procedimiento.

EL METODO DE CARAWAY, se puede considerar como método alternativo cuando no se disponga de material ó reactivos para un método mejor, sin embargo, para resultados precisos es necesario recurrir a otro método. El sustrato de amidón debe prepararse por lo menos una vez por semana, tienen el inconveniente de que no se puede hacer curva de calibración para este método y es necesario siempre correr dos sueros controles, uno normal y uno elevado.

Este método también se ve afectado por niveles elevados de bilirrubina, lo mismo que de proteínas. Además de las dificultades mencionadas, este método no puede ser empleado para la determinación precisa de niveles subnormales de amilasa y para los niveles elevados se necesita diluir las muestras.

Estos problemas se deben a que se utiliza una concentración subóptima de sustrato (600 mg de almidón en 100 ml de solución) y siempre se debe emplear un blanco de suero, aunque los autores del método indiquen que no es necesario. Por otra parte, su coeficiente de variación obtenido en múltiples determinaciones de amilasa en sueros control es bastante elevado [Tabla 3], lo cual indica su inexactitud. Las ventajas con respecto a otros métodos analizados, es su bajo costo de adquisición, la rapidez con que se efectúa y la sencillez del mismo.

EL METODO DE PHADEBAS a pesar de considerarse como un método de referencia, tiene algunos inconvenientes similares -

al método de Caraway. Los resultados se ven afectados por la concentración de proteínas y también por los niveles de bilirrubina. Además la cantidad de colorante liberado, varía de lote en lote. Presenta un coeficiente de variación de 5.21 - que indica que es un buen método, sin embargo, es de importación y por lo tanto no siempre se consigue fácilmente.

Los métodos iodométricos generalmente no siguen la cinética de orden cero debido a la concentración subóptima del sustrato, y no puede efectuarse la estandarización primaria. El método de Phadebas sigue la cinética de orden cero dando una curva de calibración lineal pero tampoco permite su estandarización primaria.

Los métodos sacarogénicos están exentos de los varios defectos que resultan de la interacción de proteínas en los procedimientos amiloclásticos. Además pueden ser aplicados a líquidos turbios o coloreados, tales como contenido duodenal, - bilis, sueros hemolizados, lipémicos o ictericos.

Por otra parte, los métodos sacarogénicos emplean concentraciones saturadas de sustrato y son técnicamente superiores aunque son consumidoras de tiempo y presentan blancos elevados. Sin embargo, el problema del blanco elevado es un problema común a casi todos los métodos existentes para la determinación de Amilasa sérica. Searcy y colaboradores<sup>27</sup> hicieron una revisión de 50 métodos y concluyeron que los métodos sacarogénicos son los mejores.

Se han hecho intentos de hacer curvas de calibración con controles séricos enzimáticos comerciales pero ha sido muy problemático. Se considera que esto se debe a que la mayoría de las preparaciones contienen amilasas derivadas de --- fuentes no humanas las cuales reaccionan de una forma diferente a la amilasa sérica humana. Por ejemplo, la alfa-amilasa pancreática de puerco, usada frecuentemente en controles séricos enzimáticos, dan 50 a 60% de actividad con respecto a la enzima pancreática humana.

El otro método empleado fue el METODO SACAROGENICO ó de Dahlqvist [29] el cual se modificó. En este método, la concentración de la enzima está directamente relacionada a la producción del poder reductor, expresado como maltosa. De tal manera que la actividad de amilasa se puede expresar en Unidades Internacionales, definidas como la cantidad de enzima que produce un micromole de maltosa por minuto.

Searcy y colaboradores [27], hicieron una modificación - método de Dahlqvist y basándonos en estos dos métodos, observamos que el sustrato de almidón al 2.0%, es muy concentrado, lo que hace producir blancos elevados, además de que tiende a precipitar después de 2 a 3 días de preparado, por ello -- lo reducimos hasta un 0.4% el cual fue más estable y da resultados reproducibles. Este método tal y como lo proponemos, tiene la ventaja de que el sustrato de almidón es estable por lo menos 4 meses a temperatura ambiente, el reactivo

de DNSA, es estable durante 6 meses a temperatura ambiente y el compuesto coloreado obtenido es estable por más de 2 horas. Además las proteínas no interfieren la reacción y por lo tanto no es necesario efectuar desproteinización del suero. Por otra parte, con esta concentración de almidón, la curva standard se pasa por el origen, razón por la cual varios autores criticaban este método de esta manera, ha sido superado el problema.

Por otra parte, la heterogeneidad del almidón en peso molecular, el grado de ramificación parecen no afectar los resultados. También los resultados no se ven afectados por el envejecimiento o retrogradación del almidón ya que obtuvimos resultados reproducibles a los 6 meses de preparado el sustrato. Por lo tanto, el sustrato no necesita prepararse justamente previo a su uso, lo cual representa menor trabajo y pérdida de tiempo cuando el sustrato se esteriliza y se trabaja en condiciones adecuadas.

Otra importante ventaja del método del 3,5-dinitrosalicílico es que ni la bilirrubina ni la glucosa causan interferencia, haciéndolo de fácil procedimiento, bajo costo y elaboración de sus reactivos y equipo.

Finalmente a continuación presentamos un cuadro con las ventajas y desventajas de estos cuatro métodos.

Los estudios de correlación y regresión de 3 métodos (Maltosa, Caraway y Phadebas) mostraron que no hubo correla-

ción en los métodos de Phadebas y Caraway ya que su coeficiente de correlación está cercano al cero; los métodos de Caraway y Maltosa muestra una relación donde las variables cambian en dirección opuesta ( $r$  tiene valores negativos  $-0.77$ ); y la correlación entre Maltosa y Phadebas no fué una relación tan perfecta pero si observamos el que los puntos en la gráfica se mantienen en un rango estrecho y la recta parte de un valor bajo de "y", los datos estadísticos nos ayudan a seguir definiendo el Método de Maltosa modificado como con fiable y correlacionado con los otros 2 métodos. (Tabla 13).



NEFELOMETRICO

VENTAJAS

Un simple reactivo  
poco volumen de suero  
Poco tiempo (2-4 minutos)

CRONOGENICO

Estabilidad de sustrato  
Simple y sencillo  
Preciso en corrimientos -  
dobles o día a día  
Rápido  
Sigue cinético orden cero  
Fácil manejo  
Reproducible

CARAWAY

Rápido  
Simple  
Mide concentración subó-  
tima de sustrato

MALTOSA

Simple  
Rápido  
Semiautomático  
Mide bajos niveles de ac-  
tividad de amilasa

DESVENTAJAS

No práctico  
Técnico de preparación

Requiere reactivos de importación  
Mayor número de pasos y equipo de Maltosa

Sólo mide una porción específica de sustra-  
to  
Los enzimas no trabajan bajo condiciones  
de saturación de sustrato.  
Interferencia de proteína.  
No sigue cinética de orden cero  
Interferencia con sueros hiperlipémicos  
Afectado por vía de preparación del sustra-  
to  
Poca estabilidad del sustrato

### VENTAJAS

#### NEFELOMETRICO

Un simple reactivo  
poco volumen de suero  
Poco tiempo (2-4 minutos)

#### CROMOGENICO

Estabilidad de sustrato  
Simple y sencillo  
Preciso en corrimientos -  
dobles ó día a día  
Rápido  
Sigue cinético orden cero  
Fácil manejo  
Reproducíble

#### CARAWAY

Rápido  
Simple  
Mide concentración subóptima de sustrato

#### MALTOSA

Simple  
Rápido  
Semiautomático  
Mide bajos niveles de actividad de amilasa

### DESVENTAJAS

No práctico  
Técnico de preparación

Requiere reactivos de importación  
Mayor número de pasos y equipo de Maltosa

Sólo mide una porción específica de sustrato  
Los enzimas no trabajan bajo condiciones de saturación de sustrato.  
Interferencia de proteína  
No sigue cinética de orden cero  
Interferencia con sueros hiperlipémicos  
Afectado por vía de preparación del sustrato  
Poca estabilidad del sustrato

## CONCLUSIONES.

Los resultados indican que el Método del 3,5-dinitrosalicilato, es preferible a los demás métodos. El método es sencillo, preciso, cinéticamente válido y no presenta las fallas de los otros métodos.

Los errores potenciales introducidos son eliminados con el empleo de un estándar de Maltosa.

De acuerdo con diversos autores, el método ideal para la determinación de amilasa deberá reunir los siguientes requisitos:

- 1.- Debe usar un sustrato altamente estable en solución.
- 2.- Obtener valores reproducibles de actividad enzimática de lote a lote de sustrato.
- 3.- Tener precisión y seguridad como cualquier otro método.
- 4.- La muestra no debe requerir tratamiento especial [desproteinización, incluso con sueros ictericos o lipémicos].
- 5.- No necesitar reactivos difíciles de conseguir.
- 6.- Ser sencillo.

Considerando que el Método del 3,5-dinitrosalicilato presentado aquí, reúne todos los requisitos anteriores.

Se puede aplicar en análisis de rutina y de investigación dando buena estimación de la actividad de la enzima.

Es adecuado para usarlo en el Laboratorio y creemos resuelve algunos de los problemas inherentes en otras técnicas existentes para el ensayo de Amilasa.



## 5.- Todd-Sanford

DIAGNOSTICO CLINICO POR EL LABORATORIO

6a. Edición

Editorial Salvat

Barcelona, España

1978

págs 859-68, 891-95

## 6.- Klaus Lorentz and Detlef Oltmanns

A new Saccharogenic Micromethod for measurement of  
Amylase activity in biological fluids.

CLIN CHEM L [4]: 300-4 Apr 1970

## 7.- Kim Y. Chung, Ram H. Sinha, and J. Allan Trew

Comparison of two methods for determining amylase acti-  
vity in serum and urine.

CLIN CHEM 17[2]:89-91 Feb 1971

## 8.- Gitlitz P.H., and Christopher S. Frings

Interferences with the starch-iodine assay for serum  
amylase activity, and affects of hyperlipemia.

CLIN CHEM 22[12]:2006-9 Dec 1976

## 9.- Wendell T. Caraway, P.H., D.

A stable starch substrate for the determination of  
amylase in serum and other body fluids.

AM J CLIN PATHOL 32[1]:97-99 Jul 1959

- 10.- Shipe J.R., and John Savory  
Kinetic nephelometric procedure for measurement of  
amylase activity in serum.  
CLIN CHEM 18(11):1323-5 Nov 1972
- 11.- Zint erhofer L., Steven Wardlaw, P. Jatlow and D.  
Seligson  
Nephelometric determination of pancreatic enzymes  
I. Amylase  
CLIN CHIM ACTA 43(1):-5-12 Jan 1973
- 12.- Joseph Yourno, M.D., and John Bernard Henry, M.D.  
Rapid amylase and lipase determination by nephelometry  
AM J CLIN PATHOL 70(1):56-63 Jul 1978
- 13.- F.L. Bates, D. French and R.E., Rundle  
A method for the determination of alpha-amylase in  
blood with use of starch-iodine color.  
J AM CHEM SOC 65:142 1943
- 14.- Bertrand, G.  
Assay of amylase in serum which involved the gravi-  
metric determination of copper.  
BULL SOC CHIM FRANCE 35:1285 1906
- 15.- R.J. Henry and N. Chiamori.  
Study of the saccharogenic method for the determination  
of serum and urine amylase  
CLIN CHEM 6:434-452 1960

- 16.- B. Fingerhut, R. Ferzola, A. Poock and W.H. Marsh  
A rapid saccharogenic method for the determination of  
serum amylase.  
CLIN CHEM 9:862-868 1965
- 17.- R.C. Lewis and S.R. Benedict  
A method for measurement serum amylase based on picric  
acid reduction.  
J BIOL CHEM 20:62 1975
- 18.- H. Sobel and S.M. Myers  
A simplified method for the determination of amylase  
activity in serum and urine using glycogen and the  
anthrone reagent.  
J LAB CLIN MED 42(4):655-58 1953
- 19.- Fridhandler L., J. Edward Berk, and Satoru Take  
Applicatibility of a new synthetic dye-labeled  
substrate for amylase assay.  
PROC SOC EXP BIOL MED 233(4):1212-6 Apr 1970
- 20.- Babson Arthur L., Susan A. Tenney, And Robert E. Nagraw  
New amylase substrate and assay procedure  
CLIN CHEM 26(2):29-43 Apr 1970
- 21.- Take S., J. Edward Berk and Louis Fridhandler  
Observations on a new simplified dye method for assess-  
ing amylase activity.  
CLIN CHIM ACTA 26(3):533-537 Dec 1969



- 22.- Ceska M., K. Birath and B. Brown  
A new and rapid method for the clinical determination of  
alfa-amylase activities in human serum an urine. Optimal  
Conditions.  
CLIN CHIM ACTA 26(3):437-444 Dec 1969
- 23.- Ceska M., B. Brown and K. Birath  
Ranges of alpha-amylase activities in human serum and  
urine and correlations with some other alpha-amylase  
methods.  
CLIN CHIM ACTA 26(3):445-453 Dec 1969
- 24.- Hamlin Clive R. and Kim Schwede  
Letter: Standarization of an alpha-amylase Kit procedure  
CLIN CHEM 20(1):96 Jan 1974
- 25.- Duncan A.M.  
Letter: Amylase assay by the Phadebas method.  
J CLIN PATHOL 29(20):174-175 Feb 1977
- 26.- Wiener K. and C.H. Foot  
A study of some factors affecting the Phadebas amylase  
test.  
CLIN CHIM ACTA 75(1):177-180 Feb 1977
- 27.- Searcy R.L., Shinichiro Hayashi and J. Edward Berk.  
A new micro saccharogenic method for serum amylase de-  
termination.  
AMER J CLIN PATHOL 46(5):582-6 Nov 1966

- 28.- Fernandez A. and C. Sobel  
*Determination of serum amylase by measurement of Maltose and other products from starch substrate [29722].*  
PROC SOC EXP BIOL MED 117(3):871-4 Dec 1964
- 29.- Dahlqvist A.  
*A method for the determination of amylase in intestinal content.*  
SCAND J CLIN LAB INV DST 14:145-151 1962
- 30.- Klein B., J.A. Foreman, and R.L. Searcy  
*The synthesis and utilization of Cibachron Blue-amylase: A new chromogenic substrate for determination of amylase activity*  
ANAL BIOCHEM 31:412-425 Oct 1965
- 31.- Lott A. John and Joan E. Mercier  
*A semiautomated method for determining amylase activity in serum and urine.*  
CLIN CHEM 16(5):390-5 May 1970
- 32.- Hanson N. Quast and Walid G. Yasmineh  
*On the kinetics of the Beckman enzymatic method for serum and urinary amylase.*  
CLIN CHEM 24(5):762-8 May 1978
- 33.- Hanson N. Quast and Walid G. Yasmineh  
*Alpha-amylase activity by then Backman reaction system and suppression by pyruvate.*  
CLIN CHE 25(7):1216-21 Sep 1979

- 34.- Marshall J. John  
On the use of "defined substrates" for the measurement  
of alpha-amylase activity [letter].  
CLIN CHEM 25(9):1675-7                      Sep 1979
- 35.- J.B. Sumner  
Dinitrosalicylic acid: A reagent for the estimation of  
sugar in normal and diabetic urine.  
J BIOL CHE 47:5                                      1921
- 36.- K.H. Meyer, G. Noelting and P. Bernfield  
Détermination du poids moléculaire de polysaccharides  
naturels par dosage colorimétrique.  
HELV CHIM ACTA 31:103                              1948
- 37.- K.H. Meyer, A.J.A. Van der Wyk and C.P. Feng  
Sur la détermination du poids moléculaire des poly-  
saccharides  
HEL CHIM ACTA 37:1619                              1954
- 38.- J. D. Hitchen  
ESTADISTICA PRACTICA PARA LA INVESTIGACION QUINICA  
1a. Edición  
Editorial El Manual Moderno, S.A.  
México, D.F.  
1976.

39.- *Dr. Luis Mourey Valdes*

SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES EN EL LABORATORIO CLINICO.

1a. Edición.

*Elarteh. Publicaciones*

*México, D.F.*

1981.

40.- *Murali Dharan*

TOTAL QUALITY CONTROL IN THE CLINICAL LABORATORY

1a. Edición

*The C. V. Mosby Company*

*Saint Louis*

1977.