

## Procedimiento recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de $\alpha$ -amilasa en suero sanguíneo humano

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular.  
Comité Científico, Comisión de Enzimas.

Documento M. Fase 3. Versión 1

Preparado por: G. Gubern Olivella, D. Balsells Roselló, R. Ferragut Mas, A. Galán Ortega, F.J. Gella Tomás, A. Padrós Fluvilà, R. Rueda Rúa y F. Canalias Reverter

### Introducción

La determinación de la concentración catalítica de la  $\alpha$ -amilasa (1,4- $\alpha$ -D-glucano glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1) está muy extendida en el laboratorio clínico para el diagnóstico de pancreatitis aguda. La concentración catalítica de  $\alpha$ -amilasa se incrementa tanto en suero como en orina de pacientes con pancreatitis aguda dentro de las 24 horas después del inicio del cuadro, manteniéndose elevada entre 3 y 7 días (1). Aunque la determinación de  $\alpha$ -amilasa es un indicador sensible de la pancreatitis aguda, también se producen incrementos de su concentración en suero asociados a desórdenes abdominales agudos, enfermedades del conducto biliar, cetoacidosis diabética, parotiditis, enfermedades inflamatorias y tumores malignos (1).

Probablemente, la  $\alpha$ -amilasa es la enzima con mayor cantidad de métodos descritos para la determinación de su concentración catalítica. No existe método de referencia para la determinación de concentración catalítica de  $\alpha$ -amilasa, así como tampoco ningún método recomendado por una sociedad científica nacional.

Los métodos más utilizados en la actualidad son aquellos que emplean cadenas de maltooligosacáridos de longitud definida, entre 3 y 7 unidades de glucosa, con el grupo 4-nitrofenilo unido en el extremo reductor y un grupo bloqueante en el extremo no reductor. En estos métodos se mide a 405 nm la liberación de 4-nitrofenol en presencia de enzimas auxiliares. El grupo bloqueante impide que las enzimas auxiliares hidrolicen el sustrato de la  $\alpha$ -amilasa. Dentro de este grupo cabe destacar aquellos métodos que usan como sustrato: 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltoheptaósido-4,6-o-etilideno, 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltoheptaósido-4,6-o-benzilideno y 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltopentaósido-6-o-benzil. La absorbancia del 4-nitrofenol varía con el pH, la temperatura, la fuerza iónica y la concentración proteica (2). Otro cromóforo utilizado es el 2-cloro-4-nitrofenol cuya absorbancia a 405 nm varía menos con el pH y la temperatura (3). Además presenta un coeficiente de absorción molar dos veces mayor al del 4-nitrofenol.

El objetivo de este documento es la recomendación de un método para la determinación de la concentración catalítica de  $\alpha$ -amilasa en suero sanguíneo humano. Esta Comisión, después de estudiar los distintos métodos descritos para la determinación de la concentración catalítica de la  $\alpha$ -amilasa, opta por recomendar el método que utiliza como

sustrato el 2-cloro-4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriósido. A diferencia de otros métodos, éste no necesita enzimas auxiliares, por lo que presenta un período de latencia prácticamente inexistente. Además, la velocidad de hidrólisis del 2-cloro-4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriósido por parte de la enzima es 10 veces superior a la mostrada para el 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriósido (4).

### Fundamento

El método recomendado para la determinación de  $\alpha$ -amilasa en suero se basa en el descrito por Winn-Deen et al. (4). El método utiliza el 2-cloro-4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriósido como sustrato. La  $\alpha$ -amilasa hidroliza este sustrato liberando directamente el cromóforo, 2-cloro-4-nitrofenol. La reacción catalizada por la enzima es la siguiente:

5 2-cloro-4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriósido

$\downarrow$   $\alpha$ -amilasa

3 2-cloro-4-nitrofenol + 2 cloro-4-nitrofenil-maltósido +  
+ 3 maltotriosa + 2 glucosa

La inclusión en el reactivo de determinación de agentes activadores como el tiocianato de potasio aumenta la velocidad de hidrólisis del sustrato por parte de la enzima.

### Condiciones recomendadas para la medición

Las condiciones recomendadas para la medición en suero son las siguientes:

Temperatura	37 °C
pH	6,3 (37 °C)
Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES)	50 mmol/L
2-Cloro-4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriósido	2,25 mmol/L
Cloruro de sodio	300 mmol/L
Cloruro de calcio	5 mmol/L
Tiocianato de potasio	445,5 mmol/L
Fracción de volumen de espécimen	0,0099 (1/101)

Las condiciones indicadas corresponden a la mezcla final de reacción.

### Obtención, transporte y almacenamiento del espécimen

La sangre debe recogerse en ayunas y con la mínima estasis venosa. El suero reciente y exento de hemoglobina es el espécimen recomendado. No se deben usar nunca anticoagulantes quelantes como oxalato, citrato y EDTA (5), aunque sí puede utilizarse la heparina.

La  $\alpha$ -amilasa mantiene su actividad en suero durante una semana como mínimo a temperatura ambiente y 2 meses cuando éste se conserva a 4 °C (6).

### Reactivos

Los reactivos empleados deben cumplir las especificaciones generales establecidas por la IFCC (7).

Se ha realizado un estudio de las condiciones experimentales (8), deduciéndose la siguiente composición del reactivo de trabajo: 2-cloro-4- $\alpha$ -D-nitrofenil-maltotriósido 2,27 mmol/L, ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico 50,5 mmol/L, cloruro de sodio 303 mmol/L, cloruro de calcio 5,05 mmol/L y tiocianato de potasio 450 mmol/L, pH 6,3 (37 °C).

### Procedimiento de medida

#### CONDICIONES OPERATORIAS

Longitud de onda	405 nm ( $\pm$ 1 nm)
Paso de luz	10 mm
Volumen final de la mezcla de reacción	1,01 mL
Temperatura	37 °C ( $\pm$ 0,1 °C)

#### ESQUEMA ANALÍTICO

Preincubar a 37 °C el espécimen y el reactivo de trabajo.

Pipetear:

Reactivo de trabajo	1,00 mL
Suero	0,010 mL

Mezclar e incubar a 37 °C durante 30 segundos, transcurridos los cuales se registra la variación de absorbancia durante 2 minutos.

### Cálculos

Calcular el  $\Delta A$ /minuto obtenido para el intervalo de mediciones del período rectilíneo de la reacción.

Teniendo en cuenta que el coeficiente de absorción molar del 2-cloro-4-nitrofenol a 405 nm, 37 °C y pH 6,3 es  $1\,549 \pm 11,2 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$  se deducen las siguientes ecuaciones para la determinación de la concentración catalítica:

$$\Delta A/\text{min} \times 108,67 = \mu\text{kat}/\text{L}$$

$$\Delta A/\text{min} \times 6\,520 = \text{U}/\text{L}$$

### Intervalo analítico

La concentración catalítica de  $\alpha$ -amilasa determinada con el método recomendado es proporcional a la velocidad de transformación al menos hasta 28,3  $\mu\text{kat}/\text{L}$  (1700 U/L) (Anexo I). Rebasado este límite es aconsejable efectuar una dilución del suero con cloruro de sodio 154 mmol/L y repetir la determinación.

### Valores de referencia

Los valores de referencia encontrados en el suero de personas adultas y presuntamente sanas, obtenidos utilizando el método recomendado, son los siguientes:

$$0,3\text{-}0,95 \mu\text{kat}/\text{L} \text{ (18-57 U/L)}$$

No se observaron diferencias ni por sexo ni por edad.

### Interferencias

No existe interferencia debida a la presencia de heparina, lípidos o bilirrubina. La hemoglobina produce una interferencia negativa apreciándose un decremento en la medida de actividad de la  $\alpha$ -amilasa del 10% a concentraciones de hemoglobina de 6 g/L (9).

### Anexo I

#### Estudio de la rectilinealidad

Se diluyó un suero con una elevada concentración catalítica de  $\alpha$ -amilasa con otro de muy baja concentración de enzima. Se determinó la concentración catalítica de la  $\alpha$ -amilasa de cada una de las diluciones utilizando el método recomendado. La relación entre dilución y velocidad de reacción era lineal hasta 0,260  $\Delta A$ /min.

#### Estudio del límite de detección

Se calculó el límite de detección del método mediante 10 determinaciones del blanco de reactivo. Se observó una actividad promedio correspondiente a 0,75  $\mu\text{kat}/\text{L}$  con una desviación típica de 0,13  $\mu\text{kat}/\text{L}$ . El valor del límite de detección resultó de 1,1  $\mu\text{kat}/\text{L}$ .

Correspondencia:  
Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular.  
Comisión de Enzimas. Llançà, 51 08015 Barcelona.

### Bibliografía

1. Clavien PA, Burgan S, Moossa AR. Serum enzymes and other laboratory tests in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1989; 76: 1234-43.
2. Rauscher E, Neumann U, Schalch E, von Bülow S, Wahlefeld AW. Optimized conditions for determining activity concentration of  $\alpha$ -amylase in serum with 1,4- $\alpha$ -D-nitrophenylmaltoheptaoside as substrate. *Clin Chem* 1985; 31: 14-9.
3. Teshima S, Mitsuhide N, Ando M. Determination of  $\alpha$ -amylase in biological fluids using a new substrate ( $\beta$ -2-chloro-4-nitrophenylmaltoheptaoside). *Clin Chim Acta* 1985; 150: 165-74.
4. Winn-Deen ES, David H, Sigler G, Chavez R. Development of a direct assay for  $\alpha$ -amylase. *Clin Chem* 1988; 34: 2005-8.
5. Zarkowski JJ, Bruns DE. Biochemistry of human  $\alpha$ -amylase isoenzymes. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1985; 21: 283-323.
6. Henderson AR, Tietz NW, Rinker MS. Gastric, pancreatic and intestinal function. En: Burtis CA, Ashwood ER, dirs.: *Tietz textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia: Saunders, 1994; 1576-1644.
7. Bower GN, Bergmeyer HU, Horder M, Moss DW. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of an enzyme in the blood serum or plasma of man. *Clin Chim Acta* 1979; 9: 163F-174.
8. Gubern G, Saco Y, Canalias F, Gella FJ. Determination of  $\alpha$ -amylase with a direct substrate. *Ann Biol Clin* 1992; 51: 455. (abstract)
9. Genzyme Diagnostics: 2-chloro-4-nitrophenyl maltotriósido. Informe interno no.3. Genzyme Diagnostics. Kent, 1992.