

#### CONJUNTO DE REACTIVOS DE LIPASA

El reactivo de lipasa se utiliza para la determinación cuantitativa turbidimétrica de la lipasa pancreática en el suero humano.

### INTRODUCCIÓN

La lipasa se define como el grupo de enzimas que hidrolizan los ésteres de glicerol de ácidos grasos de cadena larga. La medición de la actividad de la lipasa en el suero y otros fluidos es para evaluar condiciones asociadas con el páncreas.1 Voget et al. propusieron una emulsión de aceite de oliva para medir la tasa de cambio en la turbidez durante una unidad de tiempo específica.2 Posteriormente, Shihabi et al. modificaron el método anterior y eliminaron algunas interferencias.3 Nuestro método se basa en las modificaciones mencionadas.

### PRINCIPIO

Triglicérido + H<sub>2</sub>O → mono. + di-glicéridos + ácidos grasos

La lipasa del suero hidroliza la emulsión de aceite de oliva. La disminución de la turbidez a 400 nm (tras la incubación) es proporcional a la actividad de la lipasa en la muestra.

#### REACTIVO (MATERIALES PROPORCIONADOS)

1. Sustrato: 0,8% (p/v) de aceite de oliva en alcohol.
2. Buffer: Tampón Tris 69 mM, Deoxicolato de sodio 10 mM, pH 9,0 (37°C).

#### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este reactivo es solo para uso diagnóstico "in vitro".
2. Por favor, tome las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos de laboratorio. No se recomienda pipetear con la boca ningún reactivo de laboratorio.

#### PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Añada el tampón de lipasa a un matraz Erlenmeyer de 50 ml. Agregue 25 ml de agua destilada y agite para disolver.
2. Pipetee 1 ml de sustrato de lipasa bien mezclado en la solución de tampón. Nota: La absorbancia de la emulsión antes de su uso debe ser superior a 1.0. Debido a variaciones en temperaturas regionales, la absorbancia puede ser inferior a 1.0. Si esto ocurre, añada 0.5 – 1.0 ml más de sustrato hasta que la absorbancia sea mayor a 1.0.

#### ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

1. El reactivo no reconstituido debe almacenarse a temperatura ambiente (25 - 30°C).
2. El reactivo reconstituido es estable por siete días si se refrigera (2 - 8°C) y se mantiene bien tapado.

### DETERIORO DEL REACTIVO

No utilice la emulsión si la absorbancia es más de 0.3 por debajo de la absorbancia de la emulsión cuando está fresca. Prepare una emulsión fresca.

#### ALMACENAMIENTO DE LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

1. Utilice muestras de suero frescas.
2. La actividad de lipasa en suero es estable a temperatura ambiente durante una semana; los sueros pueden almacenarse por tres semanas en el refrigerador (4-8°C) y por varios meses si se congelan. La contaminación bacteriana de las muestras puede resultar en un aumento de la actividad de lipasa.4

### SUSTANCIAS INTERFERENTES

1. No deben utilizarse especímenes hemolizados.
2. Varios medicamentos y sustancias afectan la actividad de la lipasa. Para obtener una lista completa, consulte Young, et al.5

#### MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROPORCIONADOS

1. Dispositivos de pipeteo precisos (3.0 ml y 0.1 ml).
2. Vasija de medición de 25 ml.
3. Matrás Erlenmeyer de 50 ml.
4. Cronómetro.
5. Tubos de ensayo/soporte.
6. Espectrofotómetro con cubeta controlada por temperatura.
7. Baño de calentamiento (37°C).
8. Controles de suero

#### PROCEDIMIENTO (MANUAL)

1. Reconstituya el reactivo de lipasa según las instrucciones.
2. Etiquete los tubos de ensayo como "blanco", "control", "paciente", etc.
3. Pipetee 3.0 ml de reactivo en los tubos de ensayo correspondientes y precaliente a 37°C durante al menos cinco (5) minutos.
4. Calibre el espectrofotómetro con agua destilada a 400 nm. (Rango de longitud de onda: 390-420 nm).
5. Lea y registre la absorbancia del blanco y colóquelo de nuevo en el baño de calentamiento.
6. En intervalos de tiempo, añada 0.1ml (100 ul) de muestra a cada tubo, mezcle y lea la absorbancia inicial. Devuelva cada tubo al baño de calentamiento después de la lectura inicial.
7. Exactamente cinco (5) minutos después de la lectura inicial de absorbancia, utilizando los mismos intervalos de tiempo, retire cada tubo del baño de calentamiento y mezcle cada tubo. Lea la absorbancia del blanco y de cada tubo de muestra frente al agua destilada.

#### NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

1. Si la Abs. del "blanco" es un valor negativo, considérela cero.
2. Las tasas elevadas de blanco, es decir, (0,005) y superiores, pueden ser causadas por el recubrimiento de aceite de oliva en la superficie de la cubeta. Enjuague periódicamente con acetona seguido de un lavado con agua.
3. Las muestras turbias deben diluirse con agua destilada (1:5). Multiplique la respuesta final por el factor de dilución.
4. Utilice sueros frescos, cuando sea posible, para obtener la máxima precisión.

## CALIBRACIÓN

La actividad de lipasa en la muestra se calcula en función de la absorptividad milimolar del aceite de oliva (3.15 en solución de trabajo).

## CONTROL DE CALIDAD

1. Se deben utilizar sueros de control frescos con valores normales y anormales conocidos en cada ensayo para supervisar la validez de la reacción.
2. La actividad de lipasa en el suero debe validarse mediante el método de titrimetría.

## CÁLCULOS

La actividad enzimática se expresa en Unidades Internacionales. Una Unidad Internacional (IU) se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones decretadas.

$$\text{Unidades/Litro} = \frac{\Delta \text{Abs. corregida}}{5 \text{ min}} \cdot 1953$$

Absorbancia inicial en blanco

$$\Delta \text{Abs. corregida} / 5 \text{ min} = \Delta \text{Abs de prueba} - \Delta \text{Abs en blanco}$$

Ejemplo:

$$\begin{aligned} (\text{blanco}) \text{ Abs inicial} &= 0.970 \\ (\text{blanco}) \text{ Abs a los 5} &= 0.967 \text{ (si el resultado es negativo, tratar como cero)} \\ \text{min. } \Delta \text{Abs en blanco} &= 0.970 - 0.967 = 0.003 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (\text{prueba}) \text{ Abs inicial} &= 1.300 \\ (\text{prueba}) \text{ Abs a los 5 min.} &= 1.271 \\ \Delta \text{Abs de prueba} &= 1.300 - 1.271 = 0.029 \\ \Delta \text{Abs. corregida} / 5 \text{ min} &= 0.029 - 0.003 = 0.026 \end{aligned}$$

$$\text{Por lo tanto: } \frac{0.026}{0.970} \cdot 1953 = 52 \text{ IU/L}$$

## DERIVACIÓN DEL FACTOR (1953)

$$\frac{\Delta \text{Abs. corregida} / 5 \text{ min}}{\text{inicial/blanco}} \cdot \frac{315}{0.1} \cdot \frac{3.1}{0.1} = \frac{315 \cdot 3.1}{0.1 \cdot 0.1} = 9765 = 1953 \text{ Abs.}$$

315 = concentración de aceite de oliva (micromoles/litro) en la solución de trabajo.

0 = volumen de la mezcla de reacción.

0 = volumen de muestra en ml.

( $\Delta \text{Abs.} / \text{min}$ )  $\cdot 5$  = conversión a  $\Delta \text{Abs.} / \text{min}$

## Nota:

Para convertir IU/L a unidades Cherry-Crandall, divide IU/L entre 70.

Ejemplo:

$$\frac{52 \text{ IU/L}}{70} = 0.74 \text{ unidades Cherry-Crandall}$$

## LIMITACIONES

1. Las muestras con valores superiores a 280 IU/L deben diluirse 1:1 con agua destilada, volver a analizarse y multiplicar los resultados finales por dos.
2. La contaminación bacteriana de las muestras puede resultar en un aumento de la actividad de lipasa.

## VALORES ESPERADOS<sup>4</sup>

**Adultos: 10-150 U/L (edad mayor de 60 años 18-180 IU/L)**

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca su propio rango normal.

## RENDIMIENTO

1. Linealidad: 280 IU/L
2. Sensibilidad: Basado en una resolución de instrumento de  $A = 0.001$ , este procedimiento tiene una sensibilidad de 5.4 IU/L.
3. Comparación: Estudios realizados manualmente entre este procedimiento y uno similar arrojaron un coeficiente de correlación de 0.98 con una ecuación de regresión de  $Y = 0.94X + 9.13$  ( $N = 59$ ).
4. Precisión:

Dentro de la ejecución			
Media (mg/dl)	D.E.	C.V.(%)	
36	3.9	10.9	
380	35	9.3	

  

Ejecución a ejecución			
Media (mg/dl)	D.E.	C.V.(%)	
37	5.4	14	
298	40	13	