

# LIPASA

## (Método Turbidimétrico)

### Uso:

El reactivo de lipasa se utiliza para la determinación de lipasa pancreática por método de turbidimetría cuantitativa en suero humano.

### Introducción:

La lipasa se define como ese grupo de enzimas que hidrolizan los ésteres de glicerol de ácidos grasos de cadena larga. La medida de la actividad de lipasa en suero y otros fluidos es evaluar las condiciones asociadas con el páncreas. 1 Voget et al. propuso una emulsión de aceite de oliva en medir la tasa de cambio en la turbidez en una unidad específica de tiempo. 2 Más tarde, Shihabi et al. modificó el método anterior y eliminó algo de interferencia. 3 Nuestro método se basa en las anteriores modificaciones.

### Principio:

Triglicéridos + H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{lipasa}}$  mono. + di-glicéridos + ácidos grasos  
La lipasa sérica hidroliza la emulsión de aceite de oliva. La disminución de la turbidez a 405 nm (después de la incubación) es proporcional a la actividad de la lipasa en la muestra.

### Composición del Reactivo:

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

### Advertencias y Precauciones:

1. Este reactivo es solo para uso diagnóstico "in vitro".
2. Ejercer las precauciones normales requeridas para el manejo de todos reactivos de laboratorio. No se recomienda pipetear con la boca para cualquier reactivo de laboratorio.

### Preparación del Reactivo:

1. Agregue tampón de lipasa a un matraz Erlenmeyer de 50 mL. Añadir 25 mL de agua destilada y agitar para disolver.
2. Pipetee 1 mL de sustrato de lipasa bien mezclado en la solución tampón.

Nota: La absorbancia de la emulsión antes del uso debe ser mayor que 1,0. Debido a las variaciones en las temperaturas regionales, la absorbancia puede ser inferior a 1,0. Si esto ocurre, agregue 0,5 – 1,0 mL más sustrato hasta que la absorbancia sea superior a 1,0.

### Almacenaje del Reactivo:

1. El reactivo no reconstituido debe almacenarse a temperatura ambiente. (25 - 30°C).
2. El reactivo reconstituido es estable durante diez días refrigerado (2 - 8°C) y 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. Preparar una emulsión fresca.

### Recolección de la Muestra:

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

### Sustancias Interferentes:

1. No se deben utilizar muestras hemolizadas.
2. Varias drogas y sustancias afectan la actividad de la lipasa. Para lista completa, ver Young, et al. 5

### Materiales Requeridos, pero no Provistos:

1. Dispositivos de pipeteo precisos (1,2 mL y 0,04 mL).
2. Vaso medidor de 25 mL.
3. Matraz Erlenmeyer de 50 mL.
4. Temporizador.
5. Tubos de ensayo/gradilla.
6. Espectrofotómetro con cubeta de temperatura controlada.
7. Baño incubador (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 1,2 mL de reactivo en tubos de ensayo apropiados y pre-caliente a 37°C durante al menos cinco (5) minutos.
4. Espectrofotómetro llevar a cero con agua destilada a 405 nm. (Rango de longitud de onda: +/- 10 nanomicrones).
5. Lea y registre la absorbancia del blanco y vuelva a calentar en el baño a 37°C.
6. Utilizando intervalos cronometrados, agregue 0,04 mL (40 uL) de muestra a cada tubo, mezcle y lea la absorbancia inicial. Regrese cada tubo a calentar en el baño después de la lectura inicial.
7. Exactamente cinco (5) minutos después de la lectura de absorbancia inicial, utilizando los mismos intervalos de tiempo, retire cada tubo del baño incubador y mezclar cada tubo. Leer la absorbancia del blanco y cada tubo de muestra contra agua destilada.

### Notas del Procedimiento:

1. Si la Absorbancia del "blanco" es un valor negativo, considérela cero.
2. Las tasas en blanco elevadas, es decir, (0,005) y superiores pueden ser causadas por revestimiento de aceite de oliva en la superficie de la cubeta. Enjuagar periódicamente con acetona seguido de enjuague con agua.
3. Las muestras turbias deben diluirse con agua destilada (1:5). Multiplique la respuesta final por el factor de dilución.
4. Use suero fresco, cuando sea posible, para obtener la mayor precisión.

### Calibración:

La actividad de la lipasa en la muestra se calcula en base a la Absortividad milimolar del aceite de oliva (3,15 en solución de trabajo).

### Control de Calidad:

1. Sueros de control frescos con valores normales y anormales conocidos debe ejecutarse para cada ensayo para controlar la validez de la reacción.
2. La actividad de la lipasa sérica debe ser válida por método volumétrico.

### Cálculos:

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

$$\text{Unidades/Litro} = \frac{\Delta \text{Abs. corregido}/5 \text{min}}{\text{Absorbancia de blanco inicial}} \times 1953$$

$\Delta \text{Abs corregido} / 5 \text{min} = \Delta \text{Abs test} - \Delta \text{Abs blanco}$

Ejemplo:  
(Blanco) Abs. inicial = 0,970  
(Blanco) 5 min. Abs. = 0,967 (si el resultado es negativo, tratar como cero).

$$\begin{aligned} \Delta \text{Abs de Blanco} &= 0,970 - 0,967 = 0,003 \\ (\text{Prueba}) \text{ Abs. inicial.} &= 1,300 \\ (\text{Prueba}) 5 \text{ min. Abs.} &= 1,271 \\ \text{Prueba } \Delta \text{Abs} &= 1,300 - 1,271 = 0,029 \\ \Delta \text{Abs.}/5 \text{ min corregido} &= 0,029 - 0,003 = 0,026 \\ \text{Por tanto:} &= \frac{0,026}{0,970} \times 1953 = 52 \text{ UI/L} \end{aligned}$$

### Derivación del Factor (1953).

$$\frac{\Delta \text{Abs.}/5 \text{min corregido} \times 315 \times 3,1}{\text{Abs inicial/blanco} \times 0,1} = \frac{315 \times 3,1}{0,1} = \frac{9765}{0,1} = 97650 = 1953$$

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

3,1 = volumen de la mezcla de reacción.

0,1 = volumen de muestra en mL.

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

Nota:

Para convertir IU/L a unidades Cherry-Crandall, divida IU/L por 70.

Ejemplo:  $\frac{52 \text{ UI/L}}{70} = 0,74$  unidades Cherry-Crandall

### Limitaciones:

1. Las muestras con valores superiores a 280 UI/L deben diluirse 1:1 con agua destilada y el resultado final multiplicado por dos.
2. La contaminación bacteriana de las muestras puede resultar en un aumento de la actividad de la lipasa. 4

### Valores Esperados: 4

Adultos: 10-150 UI/L (mayores de 60 años 18-180 UI/L).

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales.

### Características del Desempeño:

1. Linealidad: 280 UI/L.
2. Sensibilidad: Basado en una resolución del instrumento de A = 0,001, este procedimiento tiene una sensibilidad de 5,4 UI/L.
3. Comparación: Estudios hechos manualmente entre este procedimiento y un procedimiento similar arrojó un coeficiente de correlación de 0,98 con una ecuación de regresión de  $Y = 0,94X + 9,13$  (N = 59).
4. Precisión:

### Entre Corridas:

Promedio (UI/L)	S.D.	C.V. (%)
36	3,9	10,9
380	35	9,3

### Corrida a Corrida:

Promedio (UI/L)	S.D.	C.V. (%)
37	5,4	14
298	40	13

### Referencias:

1. Tietz, N.W., Fundamentos de química clínica, W.B. Saunders, Filadelfia. p.633 (1976).
2. Voget, W. C. et al., Clín. química 9:168 (1963).
3. Shihabi, Z.K. et al., Clin. química 17:11556 (1971).
4. Tietz, N.W., Libro de texto de química clínica, W.B. Saunders, Filadelfia, pág. 735 (1986).
5. Young D. S. y col., Clin. química 21:1D (1975).

