

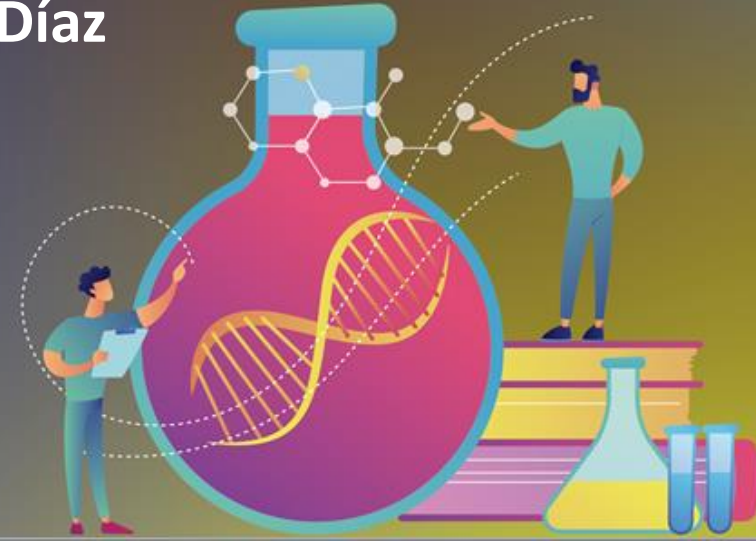
MEETING

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ASPARAGINASA

¿CÓMO SE MONITORIZA LA ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE ASPasa?

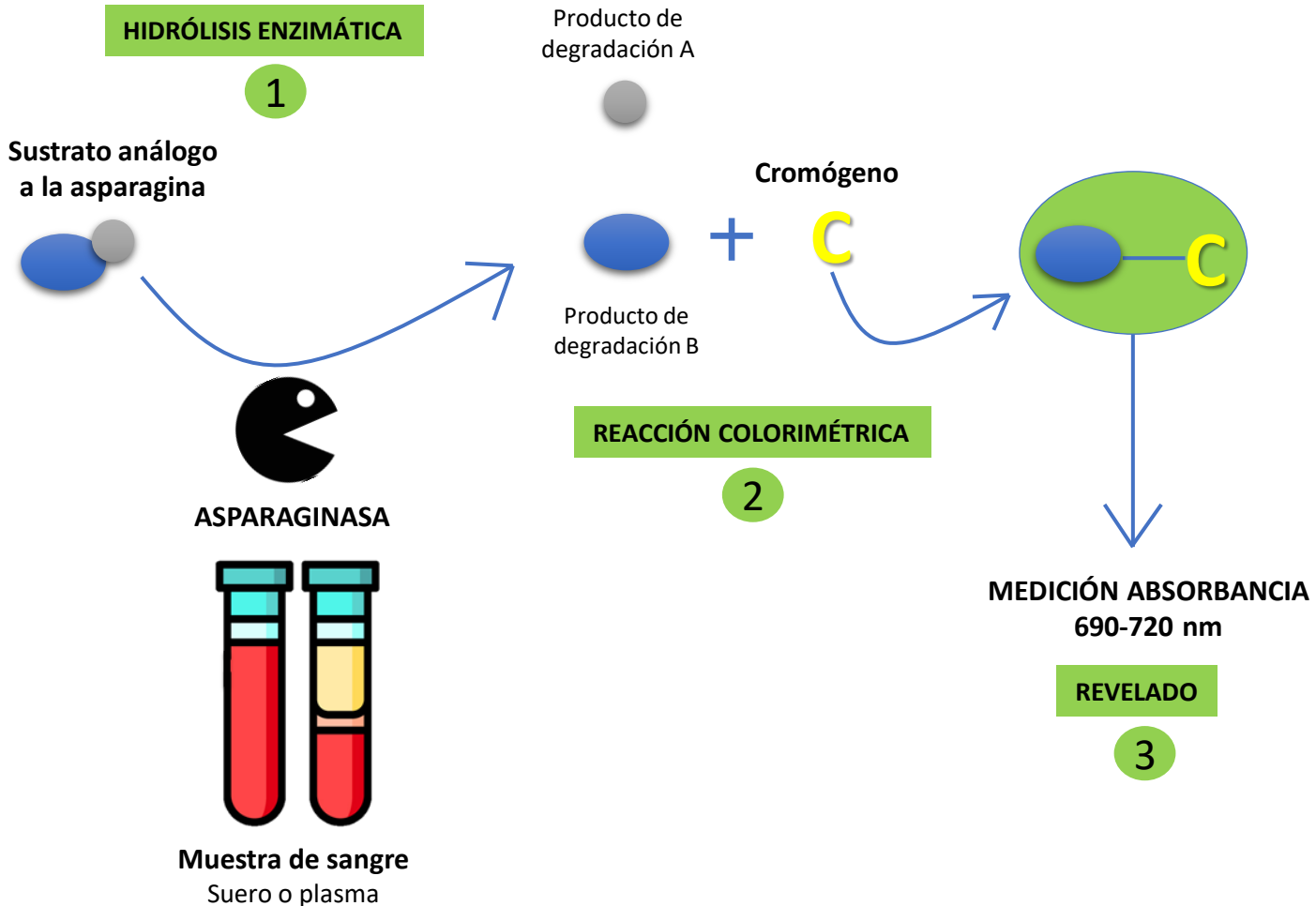
Ruth Ramos Díaz

ORGANIZA



Principio del ensayo

Medac Asparaginase-Aktivitäts-Test MAAT



ORGANIZA



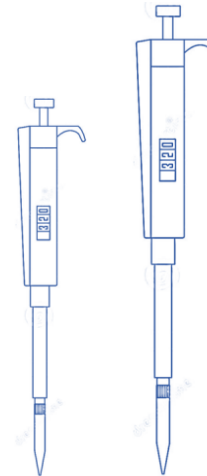
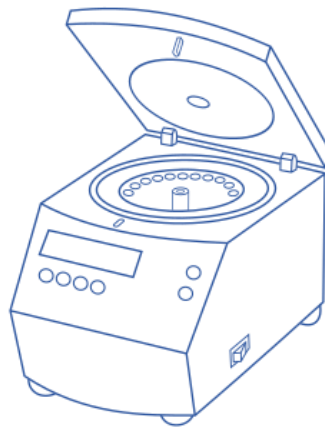
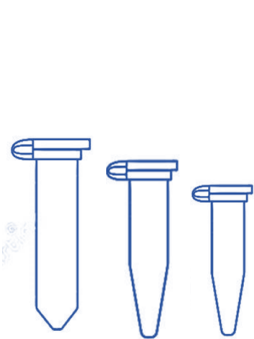
M E E
T I N G

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ASPARAGINASA



Materiales

- Tubos estériles (1,5 – 2 ml)
- Micropipetas (20 μ l – 1 ml)
- Centrífuga (min 1.100 x g)
- Lector de microplacas (690-720 nm)
- Kit *Medac Asparaginase-Aktivitäts-Test MAAT* (2 – 8°C)



Preparación del material

Importante: antes de iniciar el ensayo, todos los componentes del kit deben llevarse a temperatura ambiente (aprox. 1 hora)

Medac Asparaginase-Aktivitäts-Test MAAT

Calibradores
Calibrador 1: 600 U/l
Calibrador 2: 300 U/l
Calibrador 3: 50 U/l
Calibrador 4: 0 U/l

Control positivo



Diluyente de muestras

Diluyente para cromógeno

Cromógeno

Sustrato

Placa multipocillos

ORGANIZA



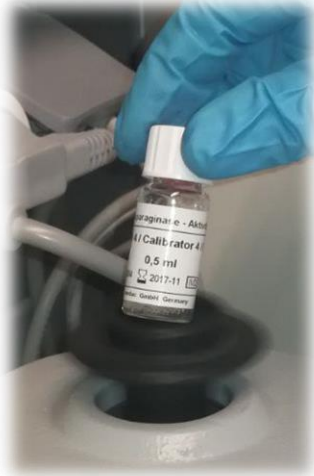
M E E
T I N G

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ASPARAGINASA



Preparación del material

I. Reconstituir reactivos liofilizados



II. Extraer nº exacto de pocillos

- 4 para calibradores
- 1 para control
- [X] para muestras



Recolección y almacenamiento de muestras

I. Extracción de sangre (al menos 1 ml)



EDTA 4°C

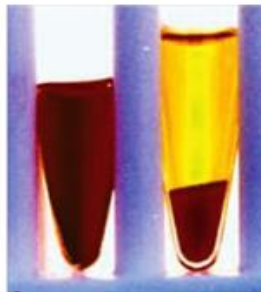


no EDTA 15-30 min (18-22°C)
para coagulación

II. Centrifugar a 1.100 – 1.300 x g durante 10 minutos



III. Transferir sobrenadante a un tubo



IV. Almacenar y transportar en frío



2-8°C corto plazo (~7 días)

-20/-80°C largo plazo (> 6 meses)

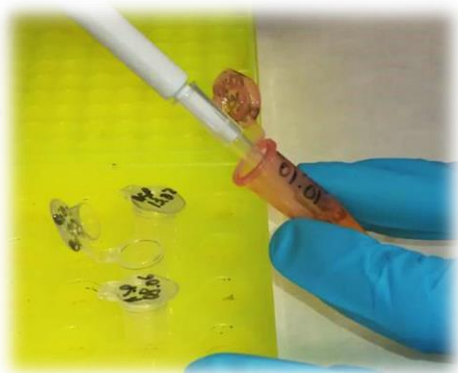


Instrucciones del procedimiento

Importante: el pipeteado de los calibradores, el control, las muestras y el sustrato debe realizarse en el plazo de 10 minutos

I. Dilución de las muestras (1:10)

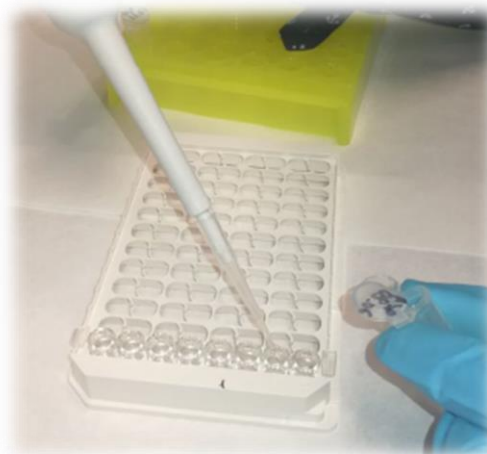
20 μ l suero/plasma +
180 μ l diluyente de muestras



II. Dispensación de calibradores, control y muestras diluidas

20 μ l en cada pocillo

¡Respetando el mismo orden!



III. Dispensación del sustrato

20 μ l en cada pocillo



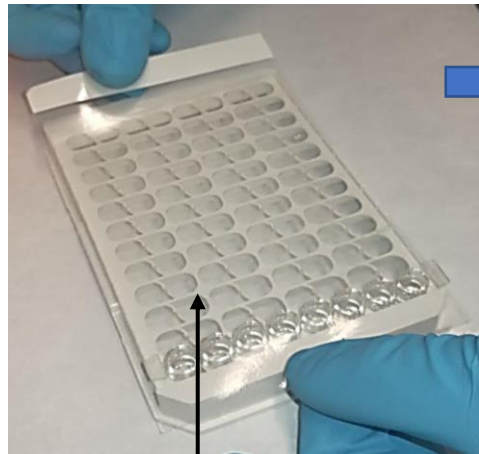
Instrucciones del procedimiento

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

1

IV. Primera INCUBACIÓN

Colocar el film sobre los pocillos e incubar la placa en oscuridad a temperatura ambiente ($22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) durante **60 min** (± 2 min)



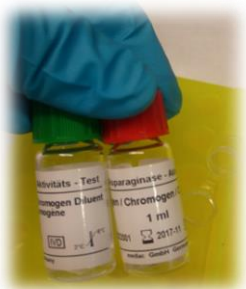
Film sellador



Instrucciones del procedimiento

Importante: la mezcla de cromógeno y diluyente para cromógeno no puede conservarse y debe utilizarse inmediatamente

Medac Asparaginase-Aktivitäts-Test MAAT



V. Preparar solución de cromógeno

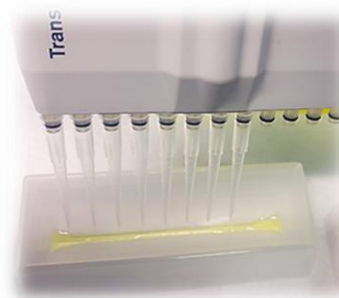
El cromógeno se mezcla con el diluyente para cromógeno en proporción 1 + 2.

Número de pocillos	Cromógeno (µl)	Diluyente para cromógeno (µl)	Σ (µl)	Volumen de pipeteado necesario (µl)
6	240	480	720	600
7	280	560	840	700
8	320	640	960	800
9	360	720	1080	900
10	400	800	1200	1000



VI. Dispensar solución de cromógeno

100 µl en cada pocillo



ORGANIZA



M E E
T I N G

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ASPARAGINASA



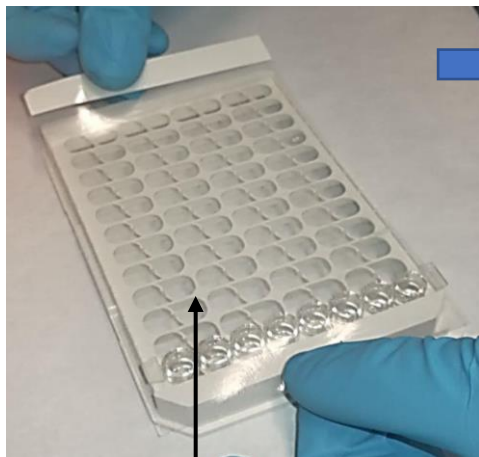
Instrucciones del procedimiento

REACCIÓN COLORIMÉTRICA

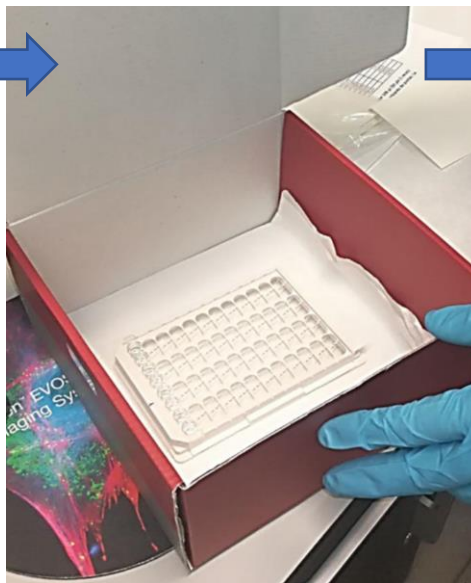
2

VII. Segunda INCUBACIÓN

Colocar el film sobre los pocillos e incubar la placa en oscuridad a temperatura ambiente ($22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) durante **90 min** (± 2 min)



Film sellador



Instrucciones del procedimiento

REVELADO

3

VIII. Lectura de la absorbancia



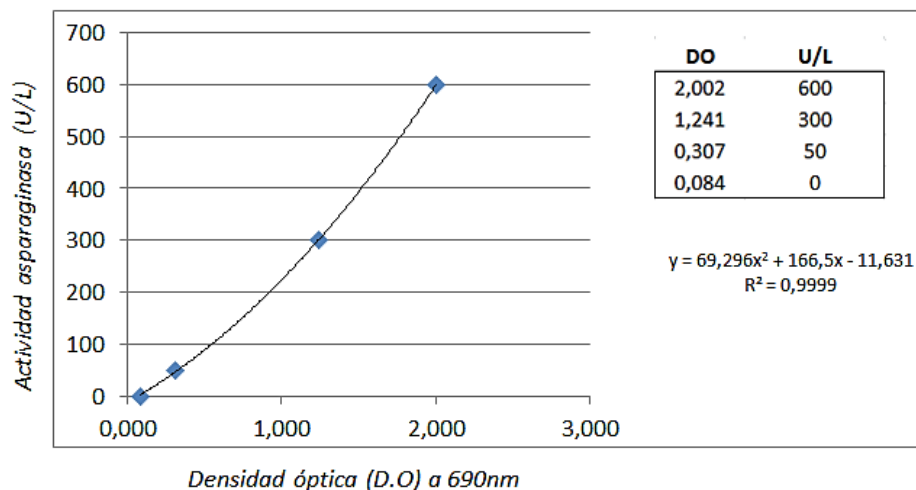
$\lambda = 690-720 \text{ nm}$

	Densidad óptica (DO)
Control positivo	A 0.502
Calibrador 1	B 2.027
Calibrador 2	C 1.267
Calibrador 3	D 0.301
Calibrador 4	E 0.075
Muestras	F 2.046
	G 1.173
	H 1.970



Interpretación de resultados

	Muestra	D.O.	U/L	Rango	Validación
	Control +	0,493	87,3	78,2 - 117,2 U/L	OK
	CAL 1	2,002	600	DO > 1,5	OK
	CAL 2	1,241	300		
	CAL 3	0,307	50		
	CAL 4	0,084	0	DO < 0,15	OK
Paciente 1	Día +7	1,846	532	> 100 U/L	OK
	Día +14	1,322	330	> 100 U/L	OK
Paciente 2	Día +7	1,487	389	> 100 U/L	OK
	Día +14	0,496	88	< 100 U/L	Actividad infraóptima
	Día +7	0,082	0	< 100 U/L	Actividad NULA



Advertencias/recomendaciones

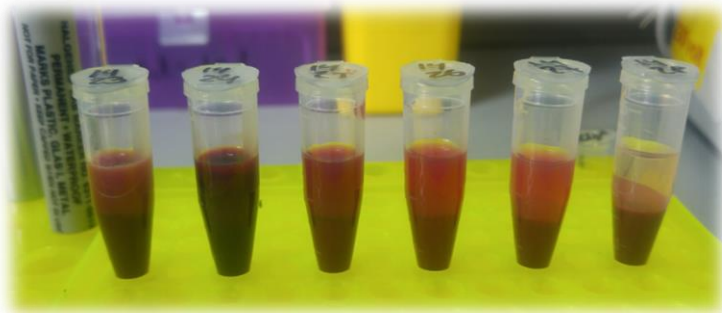
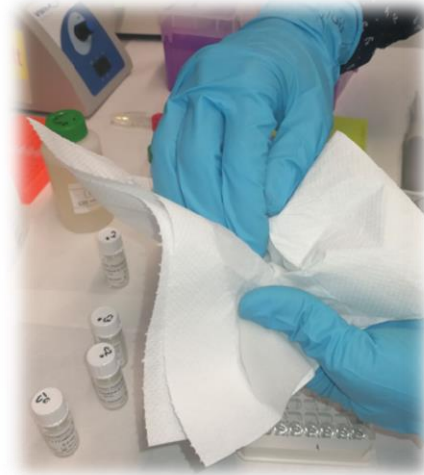
NO APTO

- Lipemia (*)
- Contaminación microbiana
- Presencia de eritrocitos

APTO

- ↑ [Hemoglobina]
- ↑ [Bilirrubina]

Buena *praxis* para evitar contaminación cruzada



Respetar condiciones y plazos de conservación



Conclusiones

VENTAJAS

- No requiere gran equipación/formación específica
- Manipulación sencilla al no existir pasos de lavado y centrifugado
- Apto para todos los preparados de ASPasa comerciales
- Ensayo rápido, con una duración inferior a 3 horas
- Elevada precisión y repetitividad de los resultados

LIMITACIONES

- Precio (aprox. 19€/pocillo)

