

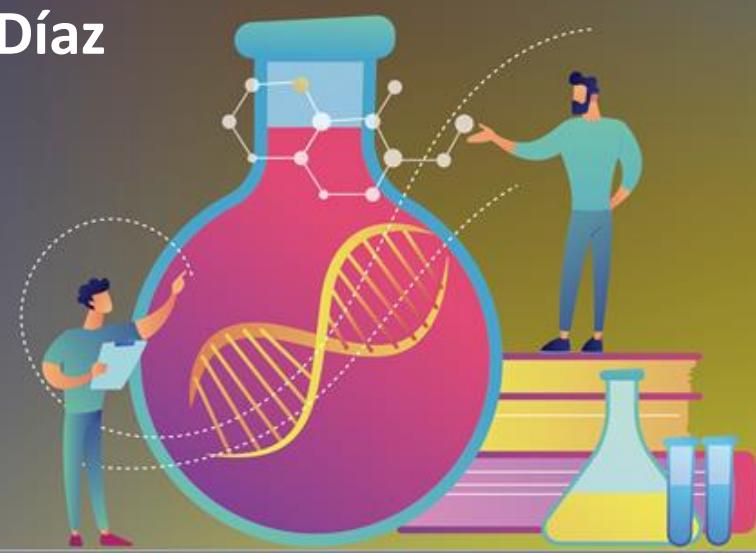
MEETING

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ASPARAGINASA

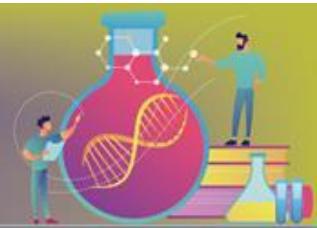
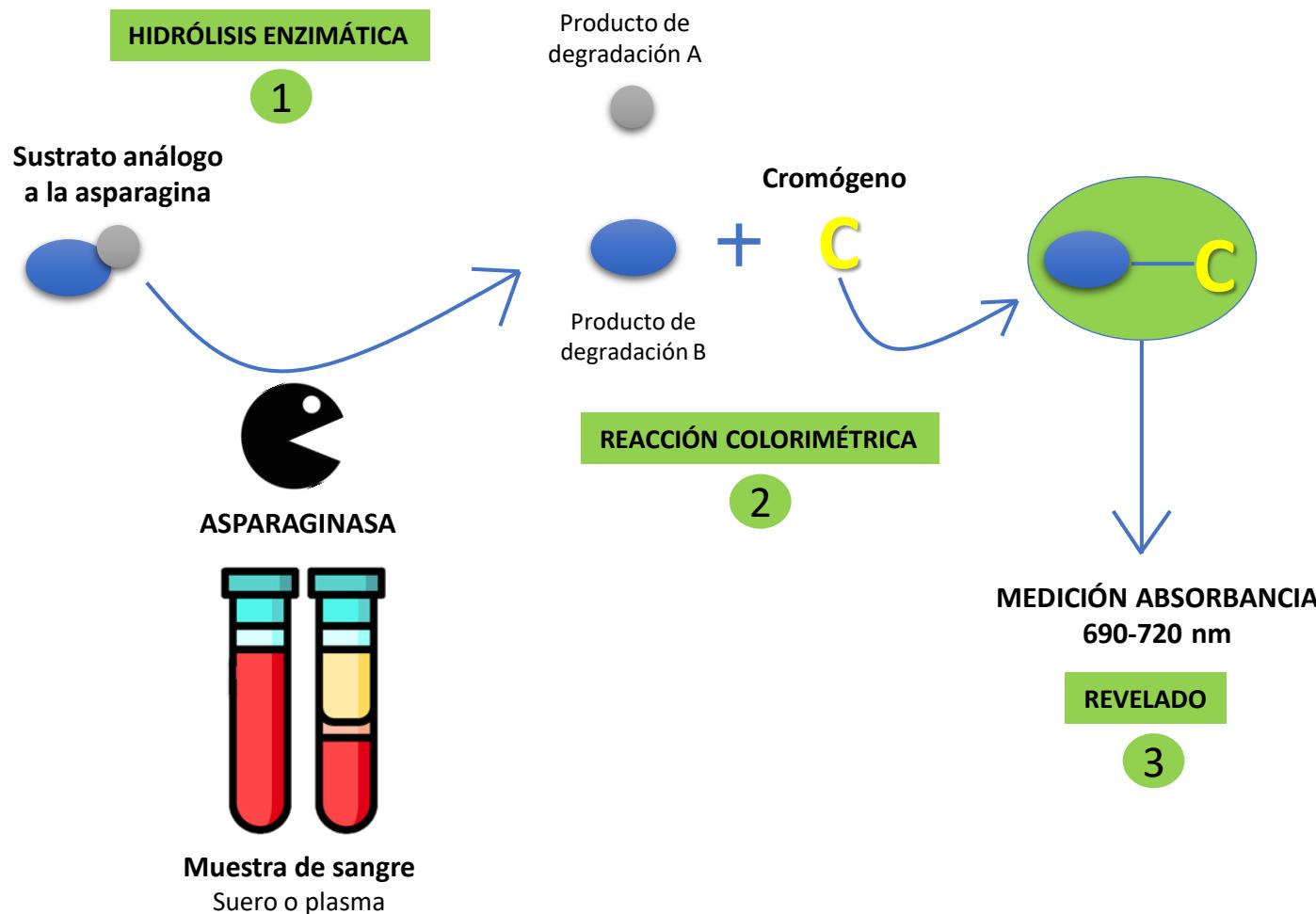
¿CÓMO SE MONITORIZA LA ACTIVIDAD
PLASMÁTICA DE ASPasa?

Ruth Ramos Díaz

ORGANIZA

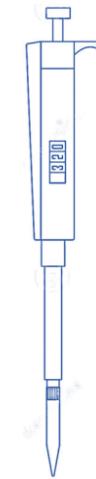
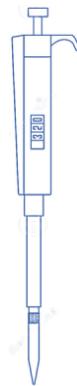
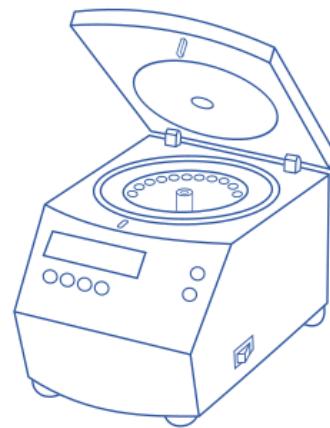
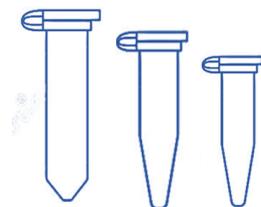


Principio del ensayo



Materiales

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



ORGANIZA



MEETING

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ASPARAGINASA



Preparación del material

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



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

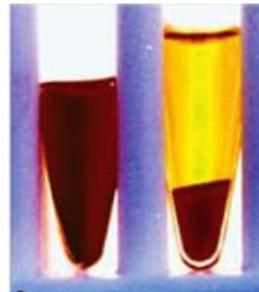


no EDTA 15-30 min (18-22°C)
para coagulación

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)

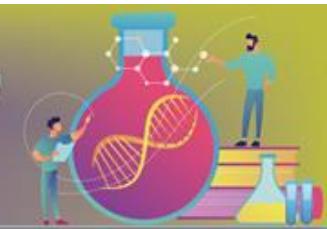
-20/-80°C largo plazo (> 6 meses)

ORGANIZA



MEETING

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ASPARAGINASA

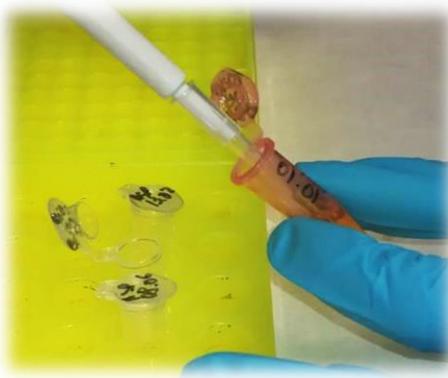


Instrucciones del procedimiento

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 µl suero/plasma +
180 µl diluyente de muestras



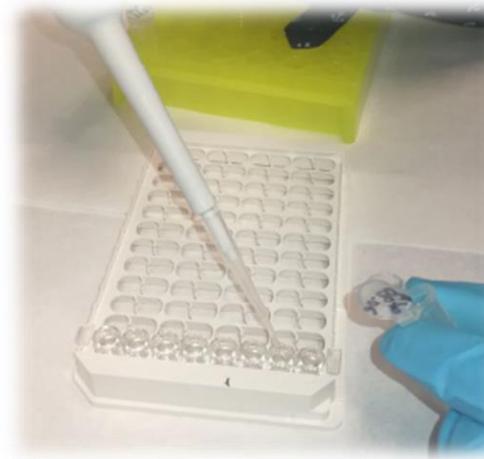
II. Dispensación de calibradores, control y muestras diluidas

20 µl en cada pocillo

III. Dispensación del sustrato

20 µl en cada pocillo

¡Respetando el mismo orden!



ORGANIZA



M E E
T I N G

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ASPARAGINASA



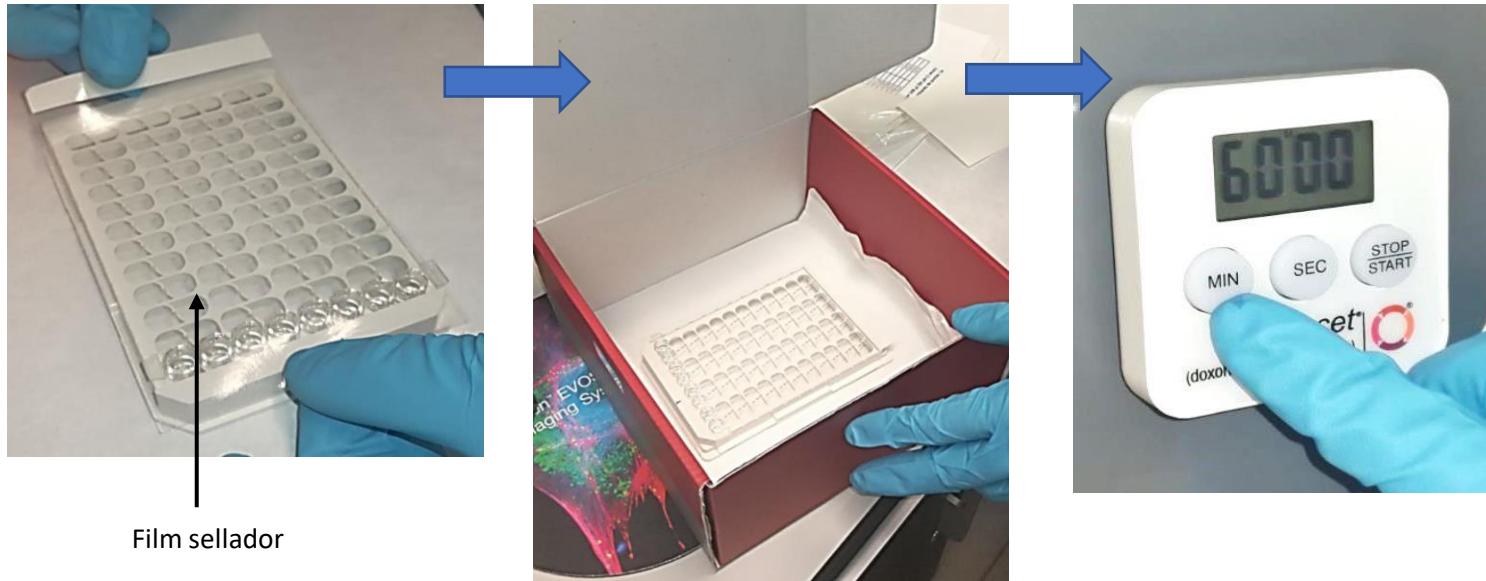
Instrucciones del procedimiento

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)



Instrucciones del procedimiento

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



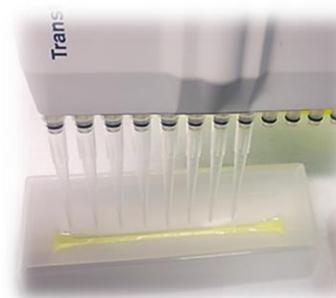
V. Preparar solución de cromógeno

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



MEETING

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ASPARAGINASA



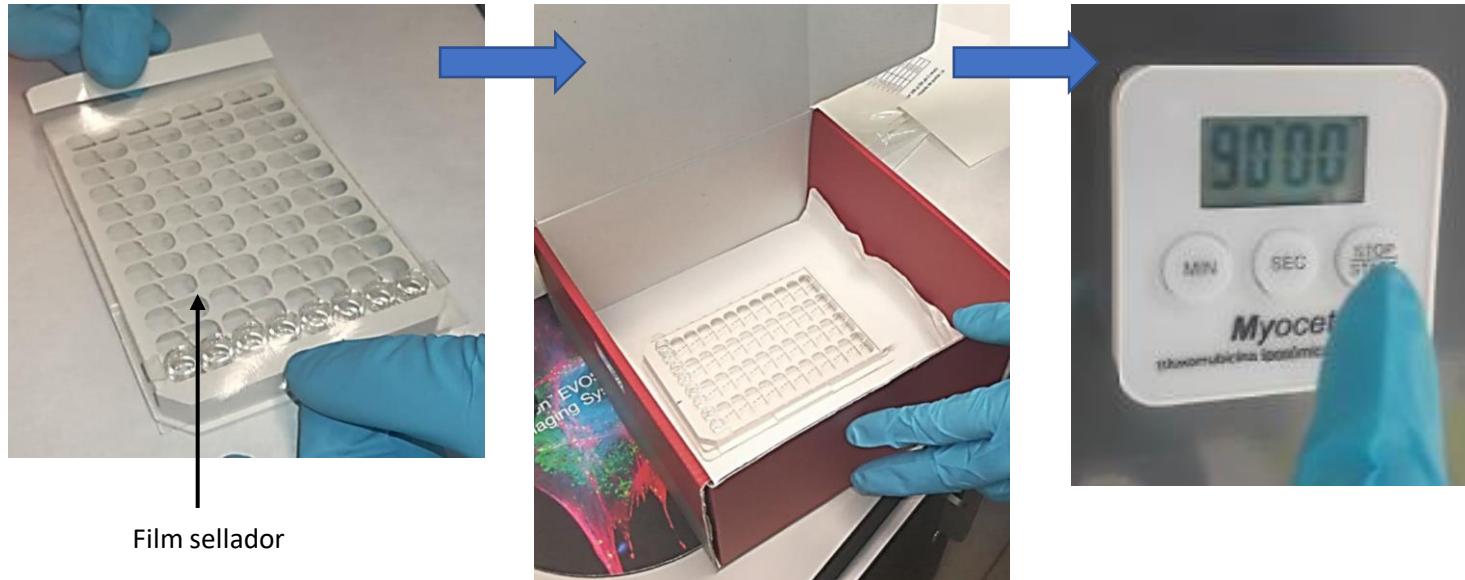
Instrucciones del procedimiento

REACCIÓN COLORÍMÉTRICA

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)



ORGANIZA



MEETING

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ASPARAGINASA



Instrucciones del procedimiento

REVELADO

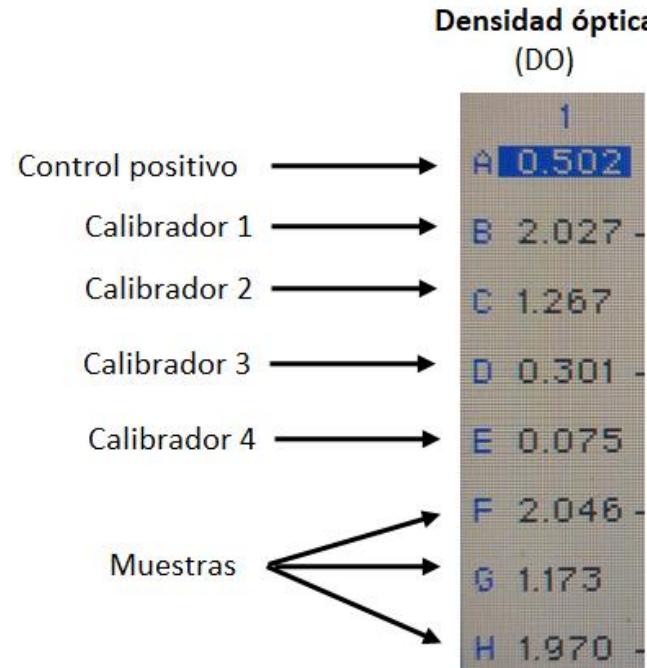
3

VIII. Lectura de la absorbancia

Medac Asparaginase-Aktivitäts-Test MAAT

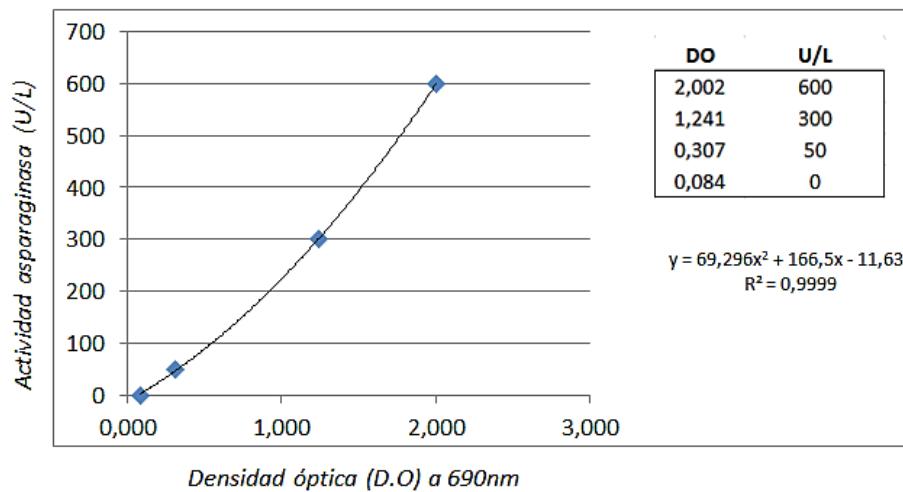


$\lambda = 690-720 \text{ nm}$



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



ORGANIZA



MEETING

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ASPARAGINASA



Advertencias/recomendaciones

NO APTO

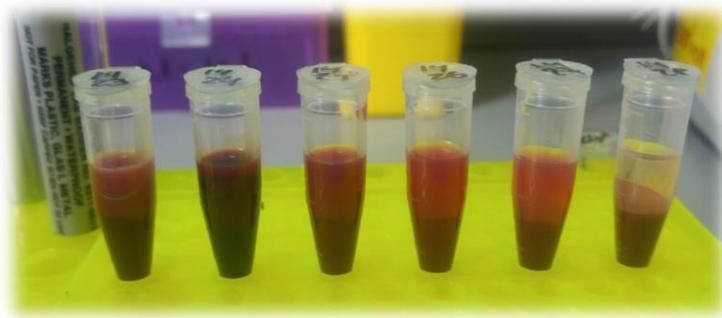
- Lipemia (*)
- Contaminación microbiana
- Presencia de eritrocitos

Buena *praxis* para evitar contaminación cruzada



APTO

- ↑ [Hemoglobina]
- ↑ [Bilirrubina]



Respetar condiciones y plazos de conservación



ORGANIZA



MEETING

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ASPARAGINASA



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)

ORGANIZA



M E E
T I N G

MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ASPARAGINASA

