

### Finalidade

Método cinético a 405 nm para a determinação de amilase em soro, plasma ou urina. Substrato CNPG3.

### Significado Clínico

A amilase está envolvida com a quebra de amido e glicogênio alimentar em maltose. Está presente principalmente no pâncreas e nas glândulas salivares e é excretada pelos rins, apesar de ser uma molécula proteica. Sua principal aplicação clínica é no diagnóstico de pancreatite aguda necrosante. Esta é uma doença essencialmente de cães (e humanos), associada com dietas com muita gordura e obesidade, na qual as enzimas proteolíticas extravasam das células e iniciam a autodigestão do órgão.

Aumentos discretos a moderados inespecíficos podem ser encontrados em outros quadros abdominais agudos (incluindo a obstrução intestinal) e na insuficiência renal.

### Fundamento do método

A  $\alpha$ -amilase hidrolisa o substrato definido 2-cloro-p-nitrofenil-a-D-maltotriósido (CNP-G3) para liberar 2-cloro-p-nitrofenol (CNP), formando-se 2-cloro-nitrofenil-a-D-maltósido (CNP-G2), maltotriose (G3) e glicose. O CNP absorve a 405 nm e a velocidade de formação da cor é diretamente proporcional à atividade enzimática.

### Reagentes Fornecidos

**Reagente A:** solução contendo CNP-G3 2,25 mmol/L, cloreto de cálcio 5 mmol/L, cloreto de sódio 70 mmol/L, tiocianato de potássio 900 mmol/L e tampão MES pH 6, 100 mmol/L.

### Instruções de Uso

**A.Reagente A:** pronto para uso.

### Precauções

Os reagentes são para uso diagnóstico *in vitro* veterinário. Nocivo se inalado, em contato com a pele e por ingestão. Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas. Todos os reagentes e as amostras devem ser descartados conforme a regulação local vigente.

### Estabilidade e instruções de armazenamento

Estável sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem.

### Indícios de instabilidade ou deterioração dos reagentes

O Reagente A pode desenvolver uma coloração amarelada que não afeta seu funcionamento.

Quando o espectrofotômetro for zerado com água destilada, leituras de absorvância do Reagente A superiores a 0,500 D.O. (a 405 nm) são indícios de deterioração.

### Amostra

Soro, plasma heparinizado ou urina.

- Coleta:** caso seja utilizado soro, obter de forma habitual, separando o soro do coágulo o mais rapidamente possível. Caso seja utilizado plasma, este deve ser heparinizado. Quando for utilizada urina, a determinação pode ser feita em amostra de urina ocasional.
- Aditivos:** caso seja utilizado o plasma como amostra, heparina para a sua obtenção. Se for utilizada urina, ver c).
- Estabilidade e instruções de armazenamento:** no soro, a amilase é estável durante uma semana a temperatura ambiente ou vários meses sob refrigeração. Na urina, caso a amostra não seja processada no dia, é conveniente ajustar o pH aproximadamente a 7 (com

hidróxido de sódio), visto que o pH ácido inativa a enzima irreversivelmente. A pH 7, pode ser conservada sob refrigeração por ao menos 10 dias, sem perda de atividade, se não houver contaminação bacteriana.

### Interferências

Bilirrubina até 22 mg/dL, hemoglobina até 180 g/L, triglicerídeos até 1400 mg/dL e heparina até 50 U/mL não produzem interferências significativas. No caso de a amostra ser urina, não deve ser adicionado ácido clorídrico como conservante.

### Material necessário (não fornecido)

- Espectrofotômetro;
- Micropipetas e pipetas capazes de medir os volumes indicados;
- Banho-maria à temperatura indicada no procedimento e,
- Cronômetro.

### Condições da reação

- Comprimento de onda: 405 nm
- Temperatura de reação: 37°C
- Tempo de Reação: 2 minutos.
- Volume de amostra: 50  $\mu$ L

Os volumes de Amostras e Reagente podem mudar proporcionalmente sem que variem os fatores de cálculo.

### Procedimento

#### I - Técnica com reagente único

Em uma cubeta mantida a 37°C, colocar:

Reagente A	2,0 mL
Pré-incubar por 3 a 4 minutos. Adicionar a seguir:	
Amostra	50 $\mu$ L

Misturar imediatamente e disparar simultaneamente o cronômetro. Ler a absorvância nos tempos 1 e 2 minutos. Determinar a diferença entre a segunda e a primeira leitura. Utilizar este valor para os cálculos.

### Cálculo dos Resultados

Amilase (U/L) = ( $\Delta A$ /min x fator)

Fator = 3178

Exemplo:

(Os dados apresentados a seguir são ilustrativos)

	Amostra	Diferença	Média
Absorvância A <sub>1</sub>	0,423		
Absorvância A <sub>2</sub>	0,455	0,032	0,032

Utilizando Fator teórico:

Amilase (U/L) = 0,032 x 3178 = 101,7 U/L

Caso seja utilizado o calibrador Laborcal Vet:

Concentração da Amilase no calibrador: 253 U/L

	Calibrador	Diferença	Média
Absorvância A <sub>1</sub>	0,345		
Absorvância A <sub>2</sub>	0,423	0,078	0,078

Obtenção do fator de calibração:

$$\text{Fator} = \frac{[\text{Amilase}_{\text{calibrador}}]}{\Delta A/\text{min}_{\text{calibrador}}} = \frac{253 \text{ U/L}}{0,078} = 3243$$

Amilase (U/L) =  $\Delta A/\text{min}_{\text{Amostra}} \times \text{Fator} = 0,032 \times 3243 = 103,8 \text{ U/L}$

**Valores de Referência**  
**Espécie (U/L)**

Canina	185 a 700
Felina	< 500
Equina	75 - 150

Os valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população de animais atendida, seus próprios valores de referência.

#### Método de Controle de Qualidade

Processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (Laborcontrol Vet 1 e 2) com atividades conhecidas de amilase, com cada determinação.

#### Limitações do procedimento

Vide "Interferências".

Não pipetar com a boca.

A contaminação do Reagente A com saliva, constitui uma causa de resultado errôneo, já que há atividade amilásica nela. Neste caso, descartar o Reagente.

Evitar o contato com elementos de borracha (tampões, batoques) porque deterioram o Reagente A.

#### Desempenho

- a) **Reprodutibilidade:** processando 20 determinações simultaneamente de uma amostra canina e outra equina com valores dentro do intervalo de referência, obteve-se o seguinte:

Amostra Canina:

Concentração	D.P.	C.V.
1008	4,23	0,42
598	1,92	0,32

Amostra Equina:

Concentração	D.P.	C.V.
127	1,47	1,16
353	3,17	0,90

- b) **Sensibilidade:** depende do fotômetro empregado. Em espectrofotômetro a 405 nm com cubetas de faces paralelas de 1 cm de espessura, para um  $\Delta A/\text{min}$  de 0,001, a menor alteração detectável será de 4 U/L (a 37°C).
- c) **Linearidade:** a reação é linear até uma atividade de amilase de 2000 U/L. Para valores superiores, a amostra deve ser diluída com solução salina e a determinação repetida. Multiplicar o resultado pelo fator de diluição.

#### Parâmetros para analisadores automáticos

Para a programação consultar o manual de uso do analisador a ser utilizado.

Apresentação

2 x 30 mL **Reagente A**

(Cód. 1774024)

#### Referências

- Rauscher, E. et al - Clin. Chem. 31/1:14 (1985).
- Tietz, N. - Fundamentals of Clinical Chemistry - W.B. Saunders Co. (1970).
- Lorenzo, L.; Demaría, I.; Setta, F.; Taborda, M. - 44th National Meeting, AACC, 19-23 julio, 1992, Chicago, Illinois. - Clin. Chem. 38/6:935, Abs.3, 1992.
- Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular - Química Clínica 15/1:51, 1996.
- Thrall, M. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária 2 ed. Guanabara koogan: Rio de Janeiro, 2015.






















- González, F. H. D.; SILVA, S. C. Introdução a bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

- Kerr, Morag G. Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária 2ª ed., Roca: São Paulo, 2003.

#### Termo de garantia

Este Kit como um todo tem garantia de troca, desde que esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado pelo Departamento Técnico da Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda. que não houve falhas técnicas na execução e manuseio deste kit, assim como em sua conservação.

#### SÍMBOLOS

	Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"
	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Uso médico-diagnóstico "in vitro"
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Data de validade
	Limite de temperatura (conservar a)
	Não congelar
	Risco biológico
	Volume após da reconstituição
	Conteúdo
	Número de lote
	Elaborado por:
	Nocivo
	Corrosivo / Caústico
	Irritante
	Consultar as instruções de uso
	Calibrador
	Controle
	Controle Positivo
	Controle Negativo
	Número de catálogo



Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda.

Estrada do Capão Bonito, 489

Guarulhos/SP – Brasil – CEP: 07263-010

CNPJ: 72.807.043/0001-94

Atendimento ao cliente:

+55(11) 2480-0529/+55(11) 2499-1277

[sac@laborlab.com.br](mailto:sac@laborlab.com.br)

[www.laborlab.com.br](http://www.laborlab.com.br)

Revisão 00

Agosto, 2020