



Amylase

Finalidade

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

Significado clínico

A amilase, produzida principalmente no pâncreas exócrino e nas glândulas salivares; lisa as ligações α -1-4 glicosídicas dos polissacarídeos (amido e glicógeno).

Encontra-se aumentada no soro de pacientes com pancreatite aguda, alcançando os valores mais elevados entre 24 e 30 horas após o ataque, declinando logo para voltar aos níveis normais nas 24 e 48 horas seguintes.

A excreção urinária da enzima também está aumentada neste caso, persistindo a hiperamilasúria por 3 a 5 dias, tão logo a atividade sérica tenha alcançado níveis normais.

Também é possível encontrar valores aumentados em qualquer caso de "abdômen agudo" ou intervenção cirúrgica em regiões próximas ao pâncreas.

As parotidites bacterianas e caxumba também estão relacionadas com elevações nos níveis de amilase sérica.

Fundamentos do método

A α -amilase hidrolisa o substrato definido 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido (CNP-G3) para liberar 2-cloro-p-nitrofenol (CNP), formando-se 2-cloro-nitrofenil- α -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

A. 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

Reagente A: pronto para uso.

Precauções

O Reagente A é para uso diagnóstico "in vitro".

O Reagente A é irritante. H319 Provoca irritação ocular grave. P262 Não pode entrar em contato com os olhos, a pele ou a roupa. P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTATO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Caso use lentes de contato, retire-as, se for possível. Continuar enxaguando. P302 + P352 SE ENTRAR EM CONTATO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/óculos de proteção/proteção facial.

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

Reagente Fornecido: 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

a) Coleta: caso seja utilizado soro, obter da maneira usual, separando o soro do coágulo o mais rapidamente possível. Caso seja utilizado plasma, este deve ser heparinizado. Se for empregada urina, a determinação pode ser feita em amostra de urina ocasional.

b) Aditivos: caso de se utilizar plasma, deve-se utilizar heparina para a sua obtenção. Se for utilizada urina, ver c).

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, se a amostra não for processada no dia, é conveniente ajustar o pH aproximadamente a 7 (com hidróxido de sódio), dado que o pH ácido inativa a enzima irreversivelmente. À pH 7, pode ser conservada sob refrigeração pelo menos 10 dias, sem perda de atividade, se não houver contaminação bacteriana.

Interferências

Não são observadas interferências por bilirrubina até 22 mg/dL (220 mg/L), hemoglobina até 180 g/L, triglicérides até 1400 mg/dL (14 g/L), nem heparina até 50 U/mL. No caso de urina, não deve ser adicionado ácido clorídrico como conservante.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

Material necessário (não fornecido)

- Espectrofotômetro.
- Micropipetas e pipetas para medir os volumes indicados.
- Cubetas espectrofotométricas de faces paralelas.
- Banho-maria à temperatura de reação selecionada.
- Cronômetro.

Condições de reação

- Comprimento de onda: 405 nm
- Temperatura de reação: 25, 30 ou 37°C
- Tempo de reação: 2 minutos

Procedimento

A) 25-30°C

Em uma cubeta mantida à temperatura selecionada, colocar:

Reagente A	2 mL
Pré-incubar por 3-4 minutos. Adicionar, a seguir:	
Amostra	100 uL

Misturar imediatamente e 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. Os volumes podem ser diminuídos proporcionalmente, utilizando 1 mL de Reagente A e 20 uL de Amostra.

B) 37°C

Como a atividade sob esta temperatura é maior, utilizar 50 uL de Amostra. Seguir o procedimento segundo A). Os volumes podem ser diminuídos proporcionalmente, utilizando 1 mL de Reagente A e 20 uL de Amostra.

Cálculo dos resultados

Amylase (U/l) = $\Delta A/\text{min} \times \text{fator}^*$

Temperatura	Reagente A	Amostra	Fator
25-30°C	2 mL	100 uL	1628
	1 mL	50 uL	1628
37°C	2 mL	50 uL	3178
	1 mL	20 uL	3953

*os fatores são calculados segundo a seguinte fórmula geral:

$$\text{Fator} = \frac{VT}{VA \times b \times \epsilon_{\text{CNP}} \times 10^{-3}}$$

onde:

VT: volume total

VA: volume da amostra

b: passo óptico

ϵ_{CNP} : coeficiente de absorvância molar do CNP

10^{-3} : fator de conversão (absorvância molar a micromolar)

Exemplo:

(Os dados apresentados a seguir são ilustrativos)

	Amostra	Diferença	Promédio
Absorvância A_1	0,423		
Absorvância A_2	0,455	0,032	0,032

Utilizando Fator teórico (37°C):

$$\text{Amilase (U/L)} = 0,032 \times 3953 = 126 \text{ U/L}$$

Quando utilizando o Laborcal como calibrador:

Concentração de amilase no calibrador: 253 U/L (37°C)

	Calibrador	Diferença	Promédio
Absorvância A_1	0,358		
Absorvância A_2	0,423	0,065	0,065

Obtenção do fator de calibração:

$$\text{Fator} = \frac{[\text{Amilase}_{\text{calibrador}}]}{\Delta A/\text{min}_{\text{calibrador}}} = \frac{253 \text{ U/L}}{0,065} = 3892$$

$$\text{Amilase (U/L)} = \Delta A/\text{min}_{\text{Amostra}} \times \text{Fator} = 0,032 \times 3892 = 125 \text{ U/L}$$

Método de controle de qualidade

Se a amostra a ensaiar for soro, processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (Laborcontrol 1 e Laborcontrol 2 da Laborlab) com atividades conhecidas de amilase, com cada determinação.

Valores de referência

Temperatura	25°C	30°C*	37°C
Soro até	84 U/L	100 U/L	125 U/L
Urina ocasional até**	455 U/L	540 U/L	680 U/L

* Calculados

** Estes valores de referência foram obtidos a partir de uma população sadia (n = 40), de ambos os sexos, com idades compreendidas entre 17 e 40 anos, com uma dieta normal, sem sintomas de doença aparente.

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

Conversão de unidades ao sistema SI

Amilase (U/L) x 0,017 = Amilase (ukat/L)

Limitações do procedimento

Vide "Interferências".

Não pipetar com a boca.

A contaminação do Reagente A com saliva, constitui uma causa de resultado errôneo, visto que a mesma contém elevada atividade amilásica. Em tal caso, deve-se descartar o Reagente. Evitar o contato com elementos de borracha (tampões, batoques), porque deterioram o Reagente A.

Desempenho

a) Reprodutibilidade: processando simultaneamente duplicatas de uma mesma amostra em um mesmo dia, obtiveram-se os seguintes valores:

Nível	D.P.	C.V.
51 U/L	± 0,978 U/L	1,9 %
467 U/L	± 2,139 U/L	0,46 %

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 deve ser utilizada a amostra diluída com solução salina. Repetir a determinação e 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 (Cód. 1770020)
- 6 x 10 mL (Cód. 1770025)

Referência

- 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.; Tabora, M. - 44th National Meeting, AACC, 19-23 julho, 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.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

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



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
www.laborlab.com.br