

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; divide as ligações α -1-4 glicosídicas dos polissacarídeos (amido e glicogênio). Encontra-se aumentada no soro de pacientes com pancreatite aguda, alcançando os valores mais elevados entre 24 e 30 horas após a crise, declinando para retornar 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 “abdôme 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 absorbância 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 seja utilizado 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 por 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 absorbância 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

Amilase (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:

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

onde:

VT: volume total

VA: volume da amostra

b: passo óptico

ϵ_{CNP} : coeficiente de absorvidade milimolar do CNP

10^{-3} : fator de conversão (absortividade milimolar a micromolar)

Exemplo:

(Os dados apresentados a seguir são ilustrativos)

	Amostra	Diferença	Média
Absorbância A_1	0,423		
Absorbância A_2	0,455	0,032	0,032

Utilizando Fator teórico (37°C):

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

Quando utilizado o Laborcal como calibrador:

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

	Calibrador	Diferença	Média
Absorbância A_1	0,358		
Absorbância A_2	0,423	0,065	0,065

Obtenção do fator de calibração:

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

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 saliva 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 ΔA/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)
- 4 x 20 mL (Cód. 1779603)

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.; 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.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.
- NCCLS document "Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods", EP6-P (1986).

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 Européia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado na Comunidade Européia



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



Amylase

Fin y uso

Método cinético a 405 nm para la determinación de amilasa en suero, plasma u orina. Sustrato CNPG3

Significación clínica

La amilasa, producida principalmente en el páncreas exócrino y en las glándulas salivales, escinde los enlaces α -1-4 glucosídicos de los polisacáridos (almidón y glucógeno).

Se encuentra elevada en el suero de pacientes con pancreatitis aguda alcanzando los valores más elevados entre las 24 y 30 horas posteriores al ataque, declinando luego para volver a los niveles normales entre las 24 y 48 horas siguientes. También se ve aumentada en este caso la excreción urinaria de la enzima, persistiendo la hiperamilasuria 3 a 5 días, luego de que la actividad sérica ha alcanzado los niveles normales.

También es posible encontrar valores aumentados en cualquier caso de "abdomen agudo" o intervención quirúrgica en regiones próximas al páncreas.

La parotiditis bacteriana y papeiras se asocian también con elevaciones en los niveles de amilasa sérica.

Fundamentos del método

La α -amilasa hidroliza el sustrato definido 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido (CNP-G3) para liberar 2-cloro-p-nitrofenol (CNP), formándose 2-cloro-nitrofenil- α -D-maltósido (CNP-G2), maltotriosa (G3) y glucosa. El CNP absorbe a 405 nm y la velocidad de aparición del color es directamente proporcional a la actividad enzimática.

Reactivos provistos

A. Reactivo A: solución conteniendo CNP-G3 2,25 mmol/l, cloruro de calcio 5 mmol/l, cloruro de sodio 70 mmol/l, tiocianato de potasio 900 mmol/l y buffer MES pH 6, 100 mmol/l.

Instrucciones para su uso

Reactivo A: listo para usar.

Precauciones

El Reactivo A es para uso diagnóstico "in vitro".

El Reactivo A es irritante. H319: Provoca irritación ocular grave. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

Estabilidad e instrucciones de almacenamiento

Reactivo Provisto: estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Indicios de inestabilidad o deterioro de los reactivos

El Reactivo A puede presentar una coloración amarillenta que no afecta su funcionamiento.

Cuando el espectrofotómetro ha sido llevado a cero con agua destilada, las lecturas de absorbancia del Reactivo A superiores a 0,500 D.O. (a 405 nm) son indicio de deterioro del mismo.

Muestra

Suero, plasma heparinizado u orina

a) Recolección: si se utiliza suero, obtener de la manera usual. Separar el suero del coágulo lo más rápidamente posible. En caso de usar plasma éste debe ser heparinizado. Si se emplea orina, la determinación puede efectuarse en una muestra de orina ocasional.

b) Aditivos: en caso de usar plasma, debe utilizarse heparina para su obtención. Si se usa orina ver d).

c) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: en suero la amilasa es estable durante una semana a temperatura ambiente (si se evita la contaminación bacteriana) o varios meses refrigerada.

En orina, si la muestra no se procesa en el día, es conveniente ajustar el pH aproximadamente a 7 (con hidróxido de sodio) dado que el pH ácido inactiva la enzima irreversiblemente. A pH 7 puede conservarse refrigerada por lo menos 10 días sin pérdida de actividad, si no existe contaminación bacteriana.

Interferencia

No se observan interferencias por bilirrubina hasta 22 mg/dl (220 mg/l), hemoglobina hasta 180 mg/dl, triglicéridos hasta 1400 mg/dl (14 g/l), ni heparina hasta 50 U/ml. En el caso de orina no debe agregarse ácido clorhídrico como conservador. Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

Material requerido (no provisto)

- Espectrofotómetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a la temperatura de reacción seleccionada.
- Cronómetro.

Condiciones de reacción

- Longitud de onda: 405 nm
- Temperatura de reacción: 25, 30 ó 37°C
- Tiempo de reacción: 2 minutos

Procedimiento

A) 25-30°C

En una cubeta mantenida a la temperatura seleccionada, colocar:

Reactivo A	2 ml
------------	------

Preincubar 3-4 minutos. Luego agregar:

Muestra	100 ul
---------	--------

Mezclar inmediatamente y leer absorbancia luego de 1 y 2 minutos. Determinar la diferencia entre la segunda y la primera lectura. Utilizar este valor para los cálculos. Se pueden disminuir proporcionalmente los volúmenes usando 1 ml de Reactivo A y 50 ul de Muestra.

B) 37°C

Como la actividad a esta temperatura es mayor, emplear 50 ul de Muestra. Seguir el procedimiento según A).

Se pueden disminuir los volúmenes usando 1 ml de Reactivo A y 20 ul de Muestra.

Cálculo de los resultados

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

Temperatura	Reactivo A	Muestra	Factor
25-30°C	2 ml	100 ul	1.628
	1 ml	50 ul	1.628
37°C	2 ml	50 ul	3.178
	1 ml	20 ul	3.953

*los factores están calculados de acuerdo a la siguiente fórmula general:

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

donde:

VT: volumen total

VM: volumen de muestra

b: paso óptico

ϵ_{CNP} : coeficiente de absortividad milimolar del CNP

10^{-3} : factor de conversión (absortividad milimolar a micromolar)

Ejemplo:

(Los datos presentados a continuación son ilustrativos)

	Muestra	Diferencia	Promedio
Absorbancia A_1	0,423		
Absorbancia A_2	0,455	0,032	0,032

Utilizando factor teórico (37°C):

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

Si se utiliza Laborcal como calibrador:

Concentración de amilasa en el calibrador: 253 U/L (37°C)

	Calibrador	Diferencia	Promedio
Absorbancia A ₁	0,358		
Absorbancia A ₂	0,423	0,065	0,065

Obtención del factor de calibración:

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

$$\text{Amilasa (U/L)} = \Delta A/\text{min}_{\text{muestra}} \times \text{Factor} = 0,032 \times 3892 = 125 \text{ U/L}$$

Método de control de calidad

Si la muestra a ensayar es suero, procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Laborcontrol 1** y **Laborcontrol 2** de Laborlab) con actividades conocidas de amilasa, con cada determinación.

Valores de referencia

	25°C	30°C*	37°C
Temperatura	25°C	30°C*	37°C
Suero hasta	84 U/l	100 U/l	125 U/l
Orina ocasional hasta**	455 U/l	540 U/l	680 U/l

* Calculados

** Estos valores de referencia se obtuvieron de una población sana (n = 40), de ambos sexos, con edades comprendidas entre 17 y 40 años, con una dieta mixta normal, sin síntomas de enfermedad aparente.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

Conversión de unidades al sistema SI

Amilasa (U/l) x 0,017 = Amilasa (ukat/l)

Limitaciones del procedimiento

Ver "Interferentes".

No pipetear con la boca.

Constituye una causa de resultado erróneo la contaminación del Reactivo A con saliva, dada la elevada actividad amilásica de la misma. En tal caso, descartar el Reactivo.

Evitar el contacto con elementos de goma (tapones, contratapas) que deterioran el Reactivo A.

Performance

a) Reproducibilidad: procesando simultáneamente replicados de una misma muestra en un mismo día se obtienen los siguientes valores:

Nivel	D.S.	C.V.
51 U/l	± 0,978 U/l	1,9 %
467 U/l	± 2,139 U/l	0,46 %

b) Sensibilidad: depende del fotómetro empleado. En espectrofotómetro a 405 nm con cubetas de caras paralelas de 1 cm de espesor, para un $\Delta A/\text{min}$ de 0,001 el mínimo cambio de actividad detectable será de 4 U/l (a 37°C).

c) Linealidad: la reacción es lineal hasta una actividad de amilasa de 2000 U/l. Para valores superiores, usar muestra diluida con solución salina, repetir la determinación y multiplicar el resultado por el factor de dilución.

Parámetros para analizadores automáticos

Para las instrucciones de programación consulte el manual del usuario del analizador en uso.

Presentación

- 2 x 30 mL (Cód. 1770020)
- 6 x 10 mL (Cód. 1770025)
- 4 x 20 mL (Cód. 1779603)

Bibliografía

- Rauscher, E. et al - Clin. Chem. 31/1:14, 1985.
- Tietz, N. - Clinical Guide to Laboratory Tests - W.B. Saunders Co., 1983.
- 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.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.
- NCCLS document "Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods", EP6-P (1986).

SIMBOLOS



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Uso diagnóstico "in vitro"



Contenido suficiente para <n> ensayos



Fecha de caducidad



Límite de temperatura (conservar a)



No congelar



Riesgo biológico



Volumen después de la reconstitución



Contenido



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Cáustico



Irritante



Consultar instrucciones de uso



Calibrador



Control



Control Positivo



Control 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