



# Amilasa 405

## cinética unitest y AA

Método cinético a 405 nm para a determinação de amilase em soro, plasma e urina

### SIGNIFICADO CLÍNICO

A amilase, produzida principalmente no pâncreas exócrino e nas glândulas salivares; divide as uniões  $\alpha$  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  $\alpha$ -amilase hidrolisa o substrato definido 2-cloro-p-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriósido (CNP-G3) para liberar 2-cloro-p-nitrofenol (CNP), formando-se 2-cloro-nitrofenil- $\alpha$ -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.

O uso deste substrato definido, substância de estrutura e peso molecular conhecidos possibilita a expressão dos resultados em U/l e não requer enzimas auxiliares.

### REAGENTES FORNECIDOS

**A. Reagente A:** frascos contendo CNP-G3.

**B. Reagente B:** tampão MES pH 6; 100 mmol/l.

#### Concentrações finais

CNP-G3.....	2,25 mmol/l
Acetato de cálcio.....	6 mmol/l
Cloreto de sódio.....	70 mmol/l
MES.....	100 mmol/l
Tiocianato de potássio.....	900 mmol/l

### INSTRUÇÕES DE USO

**Reagente B:** pronto para uso.

**Reagente A,** preparação: reconstituir cada frasco com o volume de Reagente B indicado no rótulo. Tampar e agitar até dissolução completa.

### PRECAUÇÕES

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".

O Reagente B contém tiocianato de potássio. H315+H320

Provoca irritação cutânea e ocular. P262 Não pode entrar

em contacto com os olhos, a pele ou a roupa. P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P302 + P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

Para reduzir possíveis contaminações do reagente com amilase salivar não se deve pipetar com a boca, nem o Reagente B nem o Reagente A reconstituído.

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

### ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

**Reagentes Fornecidos:** são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem.

**Reagente A reconstituído:** estável por 15 dias a temperatura ambiente e 60 dias sob refrigeração (2-10°C).

### INDÍCIOS DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES

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

### AMOSTRA

Soro, plasma ou urina

**a) Coleta:** caso seja utilizado soro, obter da maneira usual, separando o soro do coágulo o mais rapidamente possível. No caso de se utilizar plasma, este deve ser heparinizado. Se for empregada urina, a determinação pode ser feita em amostra de urina ocasional.

**b) Aditivos:** não são necessários para soro. Se for utilizada urina, ver d). Para plasma utilizar heparina.

**c) Substâncias interferentes conhecidas:** hemólise, anticoagulantes (citrato, oxalato e EDTA). No caso de urina, não se deve adicionar ácido clorídrico como conservante. Não se observam interferências por bilirubina até 200 mg/l, hemoglobina até 0,5 g/dl nem triglicerídeos até 13 g/l. Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

**d) Estabilidade e instruções de armazenamento:** no soro, a amilase é estável durante uma semana a temperatura am-

biente (se a contaminação bacteriana for evitada) 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. A pH 7, pode ser conservada sob refrigeração pelo menos 10 dias, sem perda de atividade, se não houver contaminação bacteriana.

#### MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Espectrofotômetro.
- Micropipetas e pipetas capazes 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:

<b>Reagente A reconstituído</b>	2 ml
---------------------------------	------

Preincubar por 3-4 minutos. Adicionar, a seguir:

<b>Amostra</b>	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. Podem-se diminuir proporcionalmente os volumes utilizando 1 ml de Reagente A reconstituído e 50 ul de Amostra.

##### B) 37°C

Como a atividade a esta temperatura é maior, empregar 50 ul de Amostra. Seguir os procedimentos segundo A). Podem-se diminuir os volumes utilizando 1 ml de Reagente A reconstituído 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	1.628
	1 ml	50 ul	1.628
37°C	2 ml	50 ul	3.178
	1 ml	20 ul	3.953

\*os fatores foram calculados de acordo com a seguinte fórmula geral:

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

onde:

VT: volume total

VM: volume de amostra

b: percurso óptico

$\epsilon_{\text{CNP}}$ : coeficiente de absorvidade milimolar do CNP

$10^{-3}$ : fator de conversão (absorvidade milimolar à micromolar)

#### MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Se a amostra a ensaiar for soro, processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (**Standatrol S-E 2 níveis**) 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 obtiveram-se a partir de uma população sadia (n = 40), de ambos sexos, com idades compreendidas entre 17 e 40 anos, com uma ingestão 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 Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA. Não pipetar com a boca.

A contaminação do Reagente com saliva, constitui uma causa de resultado errôneo, desde 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, obteve-se:

Nível	D.P.	C.V.
50,6 U/l	± 1,76 U/l	3,48 %
417,3 U/l	± 6,29 U/l	1,51 %

Processando a mesma amostra em dias diferentes, obteve-se:

Nível	D.P.	C.V.
48,0 U/l	± 2,65 U/l	5,53 %
389,9 U/l	± 7,62 U/l	1,95 %

**b) Limite de detecção:** depende do fotômetro empregado e da comprimento de onda. Em espectrofotômetros com cubetas de faces paralelas de 1 cm de espessura, para um

$\Delta A$ /min de 0,001 a mudança mínima de atividade detectável será de 1,6 U/l (a 25°C).

**c) Faixa dinâmica:** a faixa útil de leitura estende-se até 0,250 D.O., para valores superiores deve-se utilizar amostra diluída com solução fisiológica (no caso de urina, diluir 1/10) e corrigir conseqüentemente os resultados.

#### PARÂMETROS PARA ANALISADORES AUTOMÁTICOS

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

#### APRESENTAÇÃO

##### **Amilasa 405 cinética unitest:**

- 20 x 2 ml (40 ml Reagente B) (Cód. 1999760).

##### **Amilasa 405 cinética AA:**


- 3 x 10 ml (40 ml Reagente B) (Cód. 1021403).

#### 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, 4<sup>th</sup> ed., 2001.


#### SÍMBOLOS

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.

 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 a 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

 **Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina