

# α-AMILASE

## MÉTODO:

Gal-G2-α-CNP.

## FINALIDADE:

Reagente para a determinação da atividade da α-Amilase em soro, plasma heparinizado e urina. Somente para diagnóstico de uso *in vitro*.

## FUNDAMENTO:

O Gal-G2-α-CNP [ $\alpha$ -(2-Cloro-4-nitrofenil)- $\beta$  1,4-galactopiranosilmaltosídeo] é o substrato responsável pela reação e formação do cromógeno, na reação:



A liberação do 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) do substrato e o aumento da absorbância resultante por minuto estão diretamente relacionados com a atividade da α-amilase na amostra.

## SIGNIFICADO CLÍNICO:

É uma enzima predominantemente de origem glandular pancreática e salivar. Níveis elevados são encontrados na pancreatite, lesões das glândulas salivares (caxumba), úlceras pépticas perfuradas, apendicite, gravidez ectópica rãta, aneurisma dessecante aórtico e doença do trato biliar.

Na pancreatite aguda, o nível de amilase pode atingir 4 a 6 vezes o limite de referência superior e retornar ao normal dentro de 3 a 4 dias. Com a formação do pseudocisto pancreático os níveis frequentemente permanecem elevados. A amilase é a única proteína que pode ser eliminada pelos rins.

Na insuficiência renal, os níveis séricos de amilase estão elevados como resultado do declínio da depuração renal.

Na macroamilasemia, a amilase está ligada a imunoglobulina e o complexo é muito grande para ser filtrado pelos glomérulos. Portanto, esta condição proporciona aparente hiperamilasemia (chamada macroamilasemia) que não indica doença. Para se diferenciar pancreatite aguda de uma macroamilasemia utiliza-se clearance de amilase e creatinina:

$$\text{CAM/CCREA} = \frac{(\text{AMI}) \text{ Urina}}{(\text{AMI}) \text{ Soro}} \times \frac{(\text{CREA}) \text{ Soro}}{(\text{CREA}) \text{ Urina}}$$

Valor de Referência: 1 a 4%

Na pancreatite aguda o valor aumenta, na macroamilasemia o valor é diminuído, e na hiperamilasemia salivar o valor está normal e baixo.

Drogas que causam aumento da amilase (efeito fisiológico): colinérgicos, etanol, narcóticos.

Drogas que causam diminuição da amilase (interferência química): citrato, oxalato, fluoreto.

## PRECAUÇÕES:

- Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes.

- O kit não deve ser utilizado e deve ser adequadamente descartado em caso de coloração amarelada ou elevação repentina da absorbância do branco do reagente.

- O reagente contém azida sódica e KSCN; não ingerir ou aspirar. Evitar contato com a pele e mucosa;

- Como não se pode assegurar que amostras biológicas e soros controle não transmite infecções, recomenda-se manuseá-los de acordo com as instruções de biossegurança;

- Para o descarte seguro dos reagentes e materiais biológicos, sugerimos utilizar as regulamentações normativas locais, estaduais ou federais para a preservação ambiental.

- Os riscos residuais do kit, de acordo com critérios pré-determinados, são aceitáveis em comparação aos benefícios proporcionados pelo uso. A análise de risco foi realizada de acordo com a ISO 14971, relacionada à data final e levando em consideração a atual informação de registro.

## IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO:

Conservar entre 2 a 8°C.

## RGT – Solução Reagente

Tampão MES ~ 9,8 g/L; Ativador ~ 17,0 g/L; Estabilizante ~ 0,7 g/L; KSCN ~ 16,0 g/L; Detergente 0,75 mL/L; Gal-G2-α-CNP [ $\alpha$ -(2-Cloro-4-nitrofenil)- $\beta$  1,4-galactopiranosilmaltosídeo] ~ 1,72 g/L, azida sódica 1,7 g/L.

## PREPARO DO REAGENTE:

O reagente já se encontra pronto para uso.

## ESTABILIDADE:

A Solução Reagente é estável, quando fechada, até o vencimento da data de validade quando armazenada a 2 – 8°C.

A Solução Reagente está pronta para uso. Depois de aberto o frasco, ela é estável por 12 semanas quando armazenada entre 2 – 8°C, e por 4 semanas entre 15 – 25°C.

A contaminação do reagente pode ser ocasionada por suor ou saliva, devido aos altos conteúdos de alfa amilase. Não soprar a pipeta utilizada. Não conversar nas proximidades do frasco destampado, pois o reagente pode se contaminar irreversivelmente. O aparecimento de cor amarelada no reagente é sinal de contaminação por alfa-amilase. Elevações repentinas da absorbância do branco do reagente indicam uma contaminação como saliva ou suor.

O kit não deve ser utilizado e deve ser adequadamente descartado em caso de coloração amarelada ou elevação repentina da absorbância do branco do reagente.

## TRANSPORTE:

O transporte do kit deve ser feito pela rota mais direta evitando-se as chegadas nos finais de semana e feriados no local de destino. O kit não é afetado pelo transporte desde que seja entregue ao destinatário no período máximo de 07 dias e em uma temperatura de até 37°C.

## TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA:

O fabricante garante a qualidade do produto, se este for armazenado como descrito acima e em sua embalagem original.

## AMOSTRA:

Soro, plasma heparinizado, urina.

Não ocorre perda de atividade se a amostra é armazenada entre 4 – 25° durante de 5 dias.

O transporte da amostra biológica, quando necessário, deve ser feito pela rota mais direta e evitando sua chegada nos finais de semana e feriados no local de destino. A amostra biológica deve ser acondicionada em recipiente hermeticamente fechado, embalada de forma a mantê-la em temperatura recomendada (4-25°C) desde o remetente até a entrega ao destinatário. Esta amostra deve ser identificada com o símbolo de amostra biológica.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS:

- Fotômetro UV/VIS
- Pipetas
- Cronômetro
- Banho ou incubador

## MÉTODO DE ANÁLISE:

**A. Termostatizar** o reagente de uso na temperatura desejada. A temperatura deve permanecer constante ( $\pm 0,5$  °C) durante a execução do teste.

## B. Leitura em espectrofotômetro:

Comprimento de onda: Hg 405 nm (400 – 410 nm).

Cubeta: 1cm

Temperatura: 25°C ou 37°C

Medida: Contra H<sub>2</sub>O (aumento de absorbância)

## C. Procedimento:

Pipetar na cubeta	25°C	37°C
Amostra	20 $\mu$ L	10 $\mu$ L
RGT	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L

Homogeneizar, incubar por 1 minuto na temperatura desejada. Ler a absorbância inicial após este tempo (1 minuto) e acionar o cronômetro imediatamente. Ler a absorbância novamente após exatamente 1, 2 e 3 minutos.

## D. Cálculo:

A partir das leituras, determinar a mudança da média da absorbância por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ) e usar este valor para o cálculo da atividade da alfa-amilase na amostra.

Calcular a média das diferenças das extinções por minuto

$$(\Delta A/\text{min}) = \frac{(A1-A0)+(A2-A1)+(A3-A2)}{3}$$

Para calcular a atividade de Alfa-Amilase aplicar ao  $\Delta A/\text{min}$  os seguintes fatores:

$$\text{U/L (25°C)} = \Delta A/\text{min} \times 9864$$

$$\text{U/L (37°C)} = \Delta A/\text{min} \times 24820$$

$$\text{IFCC (37°C)} = \Delta A/\text{min} \times 10183$$

## Exemplo

Temperatura a 25 C e  $\Delta A/\text{min}$  (405 nm):

$$A0 = 1,156$$

$$A1 = 1,193$$

$$A2 = 1,231$$

$$A3 = 1,270$$

$$\Delta A/\text{min} = \frac{(1,193-1,156)+(1,231-1,193)+(1,270-1,231)}{3} = 0,038$$

$$\text{U/L} = 0,038 \times 9864 = 375 \text{ U/L}$$

Fator de conversão de unidades internacionais (U/L) para o sistema internacional – SI (Kat/L):

$$1 \text{ U/L} = 16,67 \times 10^3 \mu\text{Kat/L}$$

$$1 \mu\text{Kat/L} = 60 \text{ U/L}$$

## VALORES DE REFERENCIA:

	25°C (U/L)	37°C (U/L)	IFCC (U/L)
Soro, plasma	até 120	até 220	28 - 100
Urina	até 600	até 1000	$\leq 460$
Urina de 24 horas	até 450 U/24 h	até 900 U/24 h	$\leq 410 \text{ U/24 h}$

## LINEARIDADE:

α-amilase é linear até uma concentração de 4000 U/L (1538 U/L padronizado pelo IFCC). Se a absorbância por minuto exceder a  $\Delta A/\text{min} = 0,300$ , diluir 0,1 mL de amostra com 0,5 mL de solução de NaCl (0,9%) e repetir o teste utilizando esta diluição. Multiplicar o resultado por 6.

## SENSIBILIDADE:

12,84 U/L

## INTERFERENTES:

Nenhuma das substâncias abaixo, nas concentrações descritas, apresentou interferência nos testes.

Ácido Ascórbico até 500 mg/dL

Glicose até 5 g/dL

Hemoglobina até 500 mg/dL

EDTA até 500 mg/dL

Fluoreto até 500 mg/dL

Citrato até 500 mg/dL

## COMPARAÇÃO DE METODOS:

O kit α-Amilase foi comparado com outro kit para dosagem de α-Amilase comercialmente disponível. Soros controle assim como amostras de pacientes foram usados na comparação. Foram avaliados os resultados obtidos pelos métodos

utilizados e também através de uma equação de regressão não-paramétrica de acordo com Bablok & Passing. A regressão linear obtida foi descrita como:

$$r = 0,969091$$

$$Y = 3,277889 + 0,994748 X$$

$$X_{\text{médio}} = 150,96$$

$$Y_{\text{médio}} = 153,45$$

Ambos os métodos mostraram uma boa concordância e um desvio não significativo foi observado em algumas amostras específicas.

#### RECUPERAÇÃO:

Soros controle comercialmente disponíveis foram utilizados. Os soros controle foram reconstituídos/preparados de acordo com as instruções do fabricante. 5 determinações dos soros controle foram realizadas com o kit  $\alpha$ -Amilase. As médias das 5 determinações foram calculadas e comparadas com os valores alvos.

Soro Controle	Valor alvo	Média do valor recuperado	Recuperação, %
SC1	190	200,9	106
SC2	360	359,9	99,97
SC3	1215	1110	91,35

#### REPETIBILIDADE:

Soro controle	N	Média	DP	CV
SC1	25	204,2	2,51	1,23
SC2	25	382,6	4,19	1,09
SC3	25	1166,16	17,19	1,47

#### REPRODUTIBILIDADE:

Soro controle	N	Média	DP	CV
SC1	5	204,7	4,28	2,09
SC2	5	375	11,05	2,94
SC3	5	1086,8	18,53	1,71

#### APRESENTAÇÃO:

Cat. Nº	Reagente	Volume	Nº Teste
024A	RGT	3 x 10 mL	30
025A	RGT	6 x 10 mL	60
027	RGT	12 x 10 mL	120
025-IV1/2	RGT	3 x 20 mL	Varia de acordo com o equipamento
025-IV3/4	RGT	3 x 20 mL	Varia de acordo com o equipamento

#### DEPARTAMENTO DE SERVIÇOS ASSOCIADOS:

Para esclarecimentos de dúvidas do consumidor quanto ao produto:

Telefone: **31 3067-6400** E-mail: [invitroms@invitro.com.br](mailto:invitroms@invitro.com.br)

N.º DO LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO, DATA DE VALIDADE VIDE RÓTULO DO PRODUTO.

#### BIBLIOGRAFIA:

1. Yoshitaka Morishita; Yoshitsugu Iinuma; Nobuo Nakashima; Keiichi Majima; Katsuhiko Mizuguchi; Ypshihisa Kawamura, Total and Pancreatic Amylase Measured with 2-Chloro-4-nitrophenyl-4-O- $\beta$ -D-galactopyranosylmaltoside, Toiobo Biochem (Enzymes and Protein Markers) Nº 3026. Clinical Chemistry 46:7 2000
2. Toshihico Saganuna; Yoshiki Maeda; Kanefurni Kitahara, Tomonori Nagahama, Study of the action of human salivary alpha-amylase on 2-chloro-4-nitrophenyl- $\alpha$ -maltotrioxide in the presence of potassium thiocyanate, Department of Biochemical Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Karimoto, Kagoshima 890 Japan, Toyobo Biochem (Carbohydrate Reserarch 303) Nº 3026 – Elsevier Science Ltd 1997.
3. Henry John Bernard, Diagnósticos Clínicos & Tratamento Por Métodos Laboratoriais 18ª Edição, Ed Manole LTDA 1995 pg 612 – 617
4. Toyobo Enzymes 2002 – 2003, Toyobo Co LTD Japão 2002
5. Budavari Susan, The MERCK INDEX, Eleventh Edition, Centennial Edition, Rahway, N.J., U.S.A. 1989
6. AMIL-IFCC, Fluitast, Vöhl/Marienhagen, Germany 2002

**Fabricante:** In Vitro Diagnóstica Ltda. Rua Cromita, 278, Distrito Industrial, Itabira/MG. CEP: 35903-053.

**Regularizado por:** In Vitro Diagnóstica Ltda. Rua Cromita, 278, Distrito Industrial, Itabira/MG. CEP: 35903-053. CNPJ: 42.837.716/0001-98.

Telefone: 31 3067-6400 e-mail: [invitroms@invitro.com.br](mailto:invitroms@invitro.com.br)

Resp. Téc.: Patrícia C. C. Vilela – CRF 4463

ANVISA: 10303460309 Classe de Risco: II

#### SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS DO PRODUTO



O conteúdo é suficiente para <n> testes



Data limite de utilização



Limite de temperatura (conservar a)



Número do Catálogo



Consultar Instrução de Uso



Número do lote



Produto Diagnóstico In Vitro



Data de Fabricação