

### Utilização prevista

Para a determinação cinética quantitativa da atividade de  $\alpha$ -amilase no soro humano utilizando os analisadores Yumizen C230 e Yumizen C240. **Rx Only.**

### Relevância clínica

A determinação da atividade da amilase no soro é normalmente realizada para o diagnóstico e tratamento de doenças do pâncreas.

### História dos métodos

A amilase foi medida quantitativamente pela primeira vez através de um método iodométrico introduzido por Wohlegemuth em 1908.<sup>1</sup> Somogyi introduziu um procedimento em 1938 que padronizava os volumes de amido e iodo.<sup>2</sup> O seu trabalho tornou-se a base dos métodos Amiloclástico e Sacarogénico, amplamente utilizados e introduzidos em 1956<sup>3</sup> e 1960,<sup>4</sup> respetivamente. As desvantagens destes métodos incluíam tempos de incubação demorados, interferência da glicose endógena e cores de reação instáveis, que resultavam numa reprodutibilidade e fiabilidade reduzidas.

Rinderknecht et al introduziram um método de amido acoplado a corante em 1967<sup>5</sup> que era relativamente simples de realizar. No entanto, o procedimento utilizava um substrato insolúvel, apresentava falta de linearidade e ainda exigia centrifugação ou filtração.

Foram introduzidos procedimentos turbidimétricos<sup>6</sup> que são relativamente rápidos, mas exigem instrumentos especiais e têm dificuldade em produzir soluções de amidos estáveis e reprodutíveis.

Foram sugeridos diversos procedimentos enzimáticos<sup>7,8</sup>, incluindo um que utilizava o substrato definido maltotetraose.<sup>9</sup> Estes métodos representavam uma melhoria significativa na medição da amilase, mas ainda estavam sujeitos a tempos de pré-incubação relativamente demorados, possível interferência de glicose endógena e uma série de outras possíveis interferências na formação de NADH.<sup>10</sup>

Wallenfels et al<sup>11</sup> introduziram p-nitrofenil glicósidos como substratos definidos para a determinação de  $\alpha$ -amilase num procedimento que eliminou a interferência de glicose e piruvato endógenos. Foram utilizadas várias enzimas de acoplamento para hidrolisar os oligossacarídeos de cadeia curta resultantes da atividade da amilase na amostra. Infelizmente, estas enzimas de acoplamento continham uma atividade residual de amilase que afetava negativamente a estabilidade destes reagentes.

O presente método baseia-se na utilização de um substrato cromogénico, 2-cloro-p-nitrofenol, ligado à maltotriose. A reação da amilase com este substrato resulta na formação de 2-cloro-p-nitrofenol, que pode ser medido com espectrofotómetro a 405 nm. Esta reação ocorre muito rapidamente, não são necessárias enzimas de acoplamento e a reação não é facilmente inibida por fatores endógenos.

### Princípio

$\alpha$ -amilase



A  $\alpha$ -amilase hidrolisa o 2-cloro-p-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriósido (CNP3) para libertar 2-cloro-nitrofenol e forma 2-cloro-p-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltósido (CNP2), maltotriose (G3) e glicose (G). A taxa de aumento da absorvância é medida a 405 nm e é proporcional à atividade da  $\alpha$ -amilase na amostra.

### Reagentes

Tampão de MES, pH 6,0 $\pm$ 0,1, 2-cloro-p-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriósido 1,8 mM, cloreto de sódio 350 mM, acetato de cálcio 6 mM, tiocianato de potássio 900 mM, azida de sódio a 0,1% (consulte "Precauções").

### Preparação dos reagentes

O reagente é fornecido sob a forma de um líquido pronto a utilizar. Não é necessária preparação.

### Armazenamento dos reagentes

1. Armazene o reagente a 2-8°C.
2. O reagente mantém-se estável até à data de validade, quando armazenado conforme as instruções.

### Deterioração dos reagentes

Não utilizar se:

1. A absorvância do reagente de trabalho for superior a 0,600 quando medida a 405 nm em relação à água numa cuvete com 1 cm de comprimento.
2. O reagente não cumprir os parâmetros de desempenho indicados.
3. O reagente estiver turvo ou apresentar outros sinais de contaminação bacteriana.

### Precauções

1. Este kit de reagentes destina-se apenas a diagnóstico *in vitro*.
2. O reagente contém tiocianato de potássio. VENENO. Não ingerir.
3. Este reagente contém azida de sódio (0,1%) como conservante. Não ingerir. Pode reagir com canalização de chumbo e cobre, formando azidas de metal altamente explosivas. Aquando da eliminação, escoe com água abundante para evitar a acumulação de azida.
4. Todas as amostras e controlos devem ser manuseados como potencialmente infecciosos, utilizando procedimentos laboratoriais seguros. (NCCLS M29-T2)<sup>12</sup>

### Colheita e manuseamento de amostras

1. O soro não hemolisado é a amostra preferível. As amostras devem ser colhidas de acordo com o documento NCCLS H4-A3.<sup>13</sup>
2. Os anticoagulantes, como citrato e EDTA, ligam o cálcio que é necessário para a atividade da amilase. Não deve ser utilizado plasma com estes anticoagulantes.
3. A amilase no soro mantém-se estável durante uma semana à temperatura ambiente (18-25°C) e durante dois meses quando armazenada refrigerada a 2-8°C.<sup>14</sup>

### Interferências

1. Diversos medicamentos e substâncias afetam a determinação de amilase.<sup>15,16</sup> Young et al publicaram uma lista exaustiva destas substâncias.<sup>17</sup>
2. A macroamilase na amostra pode causar a medição de hiperamilasemia, o que pode resultar num falso diagnóstico de pancreatite aguda. No entanto, geralmente não se verificam sintomas clínicos associados à macroamilasemia.<sup>18</sup>
3. Verificou-se que a bilirrubina (30 mg/dL) e a hemoglobina (500 mg/dL) têm um efeito negligenciável neste procedimento.
4. Foi apurado que as amostras lipémicas até 1000 mg/dL não têm qualquer efeito nas determinações de amilase sérica.<sup>19</sup>

### Materiais fornecidos

Reagente de amilase (CNP3).

### Materiais necessários, mas não fornecidos

1. Analisador Yumizen C230/Yumizen C240
2. Manual de utilização do Yumizen C230/Yumizen C240
3. Controlo de química, número de catálogo C7592-100

### Parâmetros de teste

Teste:	AMY	Química:	Amilase
N.º de química:	204	Nome em letra de imprensa:	Amilase
Tipo de reação:	Cinética	Direção de reação:	Positiva
Onda pri.:	405 nm	Onda Onda	
Decimal.:	0	Tipo de amostra:	Soro
Tempo de branco:		Tempo de reação:	3 11
Unidade:	U/L	Tempo de incubação:	0

	Vol. de amostra	Aspirado	Diluído	Vol. de reagente	Diluído
Padrão;	5	uL	uL	R1: 200	uL uL
Diminuído;		uL	uL		
Aumentado;		uL	uL		

Intervalo de linearidade (padrão):	0-2000	Limite de linearidade:	0.3
Intervalo de linearidade (diminuído):		Redução de substrato:	25000
Intervalo de linearidade (aumentado):		Abs. de branco misturado:	- 40000 40000
Abs. de branco R1:	- 40000 40000	Estabilidade no equipamento:	30 Dia(s)
Resposta de branco	- 40000 40000	Limite de alarme do reagente:	5
Química dupla:			

Verificação prozona:			
Q1:	Q2:	Q3:	
Q4:	PC:	ABS:	

Utilizar resultado qualitativo:		
Intervalo:		Referência:

Desvio de declive:			
Declive	Desvio	Uint	
1	0	U/L	

# Conjunto de Reagentes de Amilase (CNP3) Pointe

Pré-tratamento:			
Vol. de amostra pré-tratada:	uL	Vol. de reagente pré-tratado:	uL

Intervalo de ref.:					
Tipo de amostra:	Sexo:	Intervalo de idades:	Intervalo de ref.:	Intervalo crítico:	Unidade:

## Parâmetros de configuração da calibração

Quím:	AMY	Calibrador	Conc.	Pos	N.º do lote
Definição da calibração		Água	0,0	W	
Modelo matemático:	Fator K				
Fator:	3178000				
Réplicas:	2				
Limites de aceitação					
Tempo cal:	24 h				
Dif declive:	DP:				
Sensibilidade:	Repetibilidade:				* Definida pelo utilizador
Deter coef:					
Calib. auto.					
	<input type="checkbox"/> Tempo cal				

## Limitações

- As amostras que excedem o limite de linearidade (2000 U/L) devem ser diluídas com um volume igual de solução salina, novamente submetidas a ensaio e o resultado deve ser multiplicado por dois.
- A macroamilase na amostra pode causar a medição de hiperamilasemia, o que pode resultar num falso diagnóstico de pancreatite aguda. No entanto, geralmente não se verificam sintomas clínicos associados à macroamilasemia.<sup>18</sup>

## Calibração

O procedimento é padronizado através da capacidade de absorção milimolar do 2-cloro-p-nitrofenol, que é de 12,9 a 405 nm nas condições de teste descritas.

## Cálculos (exemplo)

$$\frac{\Delta \text{Abs./min} \times \text{VT} \times 1000}{\text{AMM} \times \text{VA} \times \text{TL}} = \text{U/L } \alpha\text{-amilase na amostra}$$

Em que:  $\Delta \text{Abs./min}$  = Diferença de absorvância por minuto  
 $\text{VT}$  = Volume total do ensaio (1,025 mL)  
 1000 = Conversão de U/mL para U/L  
 $\text{AMM}$  = Capacidade de absorção milimolar de 2-cloro-p-nitrofenol  
 $\text{VA}$  = Volume de amostra (0,025 mL)  
 $\text{TL}$  = Trajetória de luz (1 cm)

$$\frac{\Delta \text{Abs./min} \times 1,025 \times 1000}{12,9 \times 0,025 \times 1,0} = \Delta \text{Abs./min} \times 3178 = \text{U/L } \alpha\text{-amilase}$$

Exemplo: Se  $\Delta \text{Abs./min} = 0,03$ , então  $0,03 \times 3178 = 95 \text{ U/L}$

NOTA: Para converter em unidades do SI (nKat/L), multiplique o valor U/L por 16,67.

## Controlo da qualidade

A validade da reação deve ser monitorizada utilizando soros de controlo com valores de amilase normais e anormais conhecidos. Estes controlos devem ser efetuados, pelo menos, em cada turno de trabalho em que sejam realizados ensaios de amilase. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça a sua própria frequência de determinação de controlo. Os requisitos de controlo de qualidade devem ser executados em conformidade com os requisitos de acreditação e regulamentação local, estatal e/ou federal.

## Valores esperados

Soro: 25-125 U/L para um método cinético semelhante.<sup>20</sup> Uma vez que os valores esperados são afetados pela idade, sexo, dieta e localização geográfica, cada laboratório é vivamente incentivado a estabelecer o seu próprio intervalo de referência para este procedimento.

## Desempenho

- Linearidade: 0-2000 U/L
- Comparação: Foi realizado um estudo entre o analisador da série Yumizen 200 e um analisador e método semelhantes, tendo resultado num coeficiente de correlação de 0,999 e uma equação de regressão linear de  $y=0,963x + 1,7$  (n=33).

- Precisão: Foram realizados estudos de precisão utilizando o analisador da série Yumizen 200 na sequência de uma modificação das diretrizes constantes do documento NCCLS EP5-T2.<sup>21</sup>

Na mesma determinação (n=20)			Entre dias (n=20)		
Média	D.P.	% C.V.	Média	D.P.	% C.V.
50,4	2,3	4,5	64,6	2,0	4,7
537,0	17,0	3,2	425,6	12,1	2,8

- Sensibilidade: A sensibilidade do reagente de amilase foi investigada através da leitura das alterações na absorvância por minuto a 405 nm para uma amostra de solução salina e um soro com concentração conhecida. Foram realizadas dez réplicas de cada amostra. Os resultados desta investigação indicaram que, no analisador utilizado, o reagente de amilase líquido exibiu pouco ou nenhum desvio de reagente numa amostra zero. Nas condições de reação descritas, 1 U/L de atividade de amilase resulta numa  $\Delta \text{Abs./Min.}$  de 0,0003.

## Bibliografia

- Wohlegemuth, J., Bio Chem. 29:1 (1908).
- Somogyi, M., J. Biol Chem. 125:399 (1938).
- Street, H.V., Close, J.R., Clin Chim Acta 1:256 (1956).
- Henry, R.J., Chiamori, N., Clin. Chem. 6:434 (1960).
- Rinderknecht, H.P., et al, Experientia 23:805 (1967).
- Zinterhofer, L., et al, Clin. Chem. Acta 43:5 (1973).
- Tietz, N.W., et al, Abs. of Proc. Of Int'l Seminar and Workshop on Enzymology, Chicago, IL (May 1972).
- Schiwara, H.W., Artzl. Lab 17:340 (1971).
- Pierre, K.J., et al, Clin. Chem. 22:1219 (1976).
- Kaufman, R.A., Tietz, N.W., Clin. Chem. 26:7:851 (1980).
- Wallenfels, K., et al, Carbohydrate Research 61:359 (1978).
- NCCLS document "Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue", 2nd Ed. (1991).
- NCCLS document "Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Skin Puncture", 3rd Ed. (1991).
- Tietz, N.W. Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 725-734 (1986).
- Elking, M.P., Kabot, H.J., Amer. J. Hosp. Pharm. 25:485 (1968).
- Bogoch, A., et al, Gastroenterology 26:697 (1954).
- Young, D.S., et al, Clin Chem 21:1D (1975).
- Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p. 627 (1982).
- Young, D.S. and Friedman, D.S., Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests, 2nd Ed., AACC Press (1989).
- Tietz, N.W., Clinical Guide to Laboratory Tests, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p. 54 (1983).
- NCCLS document "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2nd Ed. (1992).

## Legenda dos símbolos

Utilizar até (AAAA-MM-DD)	Lote e código
Número de catálogo	Fabricante
Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	Limite de temperatura
Consulte as instruções de utilização	<b>Rx Only:</b> Utilização apenas mediante receita médica
Marcação CE	Representante autorizado na Comunidade

12-A7564-120	Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188		
--------------	--	--	--

Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand 5449 Research Drive, Canton, MI 48188		
Representante Europeu Autorizado: Obelis s.a. Boulevard Général Wahis 53 1030 Brussels, BÉLGICA Tel.: (32)2.732.59.54 Fax: (32)2.732.60.03 e-mail: mail@obelis.net		

## Certificada para executar reagentes

Os reagentes Pointe são certificados para serem fabricados de acordo com parâmetros especificados. Qualquer produto de reagente Pointe que não cumpra as especificações até à data de validade indicada será regularizado imediatamente sem quaisquer custos.