

### Utilização prevista

Para a determinação cinética quantitativa da atividade de  $\alpha$ -amilase no soro humano utilizando o analisador Yumizen C560. **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.

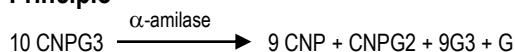
Foram introduzidos procedimentos turbidimétricos<sup>6</sup> que são relativamente rápidos, mas exigem instrumentos especiais e têm dificuldade em produzir soluções de amidos estáveis e reprodutíveis.

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



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±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 e estabilidade dos reagentes

Armazene o reagente a 2-8°C. O reagente mantém-se estável até à data de validade, quando armazenado conforme as instruções. Uma vez colocado no carrossel de reagentes refrigerados (2-10°C), o reagente mantém-se estável durante 30 dias.

### 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 e perigos

1. Este kit de reagentes destina-se apenas a diagnóstico *in vitro*.
2. 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.
3. Todas as amostras e controlos devem ser manuseados como potencialmente infecciosos, utilizando procedimentos laboratoriais seguros. (NCCLS M29-T2)<sup>12</sup>

### Perigos:

**Classificações de perigo:** Perigoso para o ambiente aquático, perigo a longo prazo, Categoria 4

**Advertências de perigo:** H413: Pode provocar efeitos nocivos duradouros nos organismos aquáticos.

**Recomendações de prudência:** **Prevenção:** P273: Evitar a eliminação no meio-ambiente. P280: Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular. **Resposta:** P391: Recolher o produto derramado. Perigoso para o ambiente aquático. **Armazenamento:** P404: Armazenar em recipiente fechado. **Eliminação:** P501: Eliminar o conteúdo numa incineradora de resíduos aprovada. **Consulte a Ficha de Dados de Segurança deste produto (SDS-A7564), disponível através do número de telefone 1-734-487-8300.**



**Palavra-sinal:** Aviso

### 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>

# Conjunto de Reagentes de Amilase (CNP3) Pointe

## 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 lipêmicas 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 C560 e Manual de utilização
2. Controlo de química, número de catálogo C7592-100

## Limitações

1. 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.
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>

## 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.

## 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

1. Intervalo do ensaio: 1-2000 U/L
2. Comparação: Foi realizado um estudo entre o Yumizen C560 e um analisador e método semelhantes, com os seguintes resultados:

Método	Amilase
N	85
Amilase média (U/L)	127,2
Intervalo (U/L)	9-1856
Desvio padrão	257,0
Análise de regressão	$y = 0,964x - 6,5$
Coefficiente de correlação	0,9981

3. Precisão: Foram realizados estudos de precisão utilizando o analisador Yumizen C560 na sequência de uma modificação das diretrizes constantes do documento NCCLS EP5-T2.<sup>21</sup>

Amostra	No mesmo dia			Total		
	LOW	MID	HIGH	LOW	MID	HIGH
N	20	20	20	40	40	40
Média	237,9	679,9	1918,5	242,9	558,6	1988,0
Desvio padrão	0,9	6,8	6,1	6,3	17,2	37,6
Coefficiente de variação (%)	0,4%	1,0%	0,3%	2,6%	3,1%	1,9%

4. Sensibilidade: Limite de deteção de 2 DP (95% de Conf) = 1 U/L

## Bibliografia

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

**PARÂMETROS DE QUÍMICA**

Quím:	AMIL	N.º:	204	Tipo de amostra:	Soro	
Química:	Amilase			Nome em letra de imprensa:	AMIL	
Tipo de reação:	Cinética			Direção de reação:	Positiva	
Onda pri:	412			Onda sec:		
Unidade:	U/L			Decimal	0	
Tempo de branco:	0	0		Tempo de reação:	19	33
	Vol. amostra	Aspirado	Diluyente	Vol. reagente	Diluyente	
Padrão:	3,0 uL	--- uL	--- uL	R1:	120 uL	--- uL
Diminuído:	--- uL	--- uL	--- uL	R2:	--- uL	-- uL
Aumentado:	--- uL	--- uL	--- uL	R3:	--- uL	-- uL
	<input type="checkbox"/> Branco da amostra	<input checked="" type="checkbox"/> Repetição automática		R4:	--- uL	--- uL
<b><u>Ajuste de declive/desvio</u></b>						
Declive: 1		Desvio: 0				

Intervalo de linearidade (padrão)	1	2000	Limite de linearidade:	0,3
Intervalo de linearidade (diminuído)	___	___	Redução de substrato:	25000
Intervalo de linearidade (aumentado)	___	___	Abs de branco misturado:	
Abs de branco R1:	___	___	Tempo para destapar	
Resposta de branco:	___	___	Limite de alarme do reagente:	
Química dupla:			<input type="checkbox"/> Extensão linear da enzima	
<input type="checkbox"/> Verificação prozona		<input type="checkbox"/> Verificação de taxa	<input type="checkbox"/> Adição de antígeno	
Q1:	Q2:	Q3:	Q4:	
PC:	ABS:			

# Conjunto de Reagentes de Amilase (CNP3) Pointe

## PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO

<b>Definição do calibrador</b>						
Calibrador:	*	N.º do lote:			*	
Data de validade:	*					
<b>Carrossel</b>	<b>Pos</b>					
Carrossel de amostras 1	*					
Carrossel de amostras 2						
Carrossel de amostras 3						
<b>Reagente/Calibração</b>						
<u>Calibrador</u>	<u>Pos</u>	<u>N.º do lote</u>	<u>Data de validade</u>	<u>Quím</u>	<u>Conc</u>	<u>Unidade</u>
Água	A	*	*	AMIL	0	U/L
<b>Configuração da calibração</b>						
Quím:	AMIL					
<u>Definições da calibração</u>						
Modelo matemático: Fator K						
Fator:	3178	Réplicas: 1				
<u>Limites de aceitação</u>						
Tempo cal:	24	Hora				
Dif declive:	---	DP:	---			
Sensibilidade:	---	Repetibilidade:	---			
Deter coef:	---					
<u>Calib. auto.</u>						
<input type="checkbox"/> Frasco trocado	<input type="checkbox"/> Lote trocado	<input type="checkbox"/> Tempo cal				

Recomenda-se que dois níveis de material de controlo sejam submetidos a ensaio diariamente.

\* Indica parâmetros definidos pelo utilizador.

**REF** 14-A7564-120



Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand  
5449 Research Drive Canton, MI 48188



### 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.

Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand  
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

#### Legenda dos símbolos

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



Utilizar até (AAAA-MM-DD)



Lote e código



Número de catálogo



Fabricante



Limite de temperatura



Consulte as instruções de utilização



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* **Rx Only:** Utilização apenas mediante receita médica