

**Ref. BA028**
**MS 81666810010**

**Método**  
Cinético (Gal-G2 - α CNP).

**Finalidade**

Sistema para a determinação quantitativa da α-Amilase no soro, plasma, urina e líquidos biológicos. **Somente para uso diagnóstico in vitro.**

**Princípio**

A α-Amilase hidrolisa o substrato de α-2-cloro-4-nitrofenil-1,4- β galactopiranosilmaltoside (Ga-G2-α-CNP), liberando 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) e 1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2). A velocidade de formação do 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) de cor amarela é medida fotometricamente em 405 nm, possibilitando uma determinação direta da atividade da α-amilase na amostra analisada.

**Significado Clínico**

A amilase é predominantemente secretada pelo pâncreas e glândulas salivares. O fígado e órgãos da reprodução também são fontes potenciais da amilase sérica. O aumento da amilase sérica não é representação específica da pancreatite, sendo que níveis elevados são encontrados em infarto mesentérico, uremia, carcinoma de cabeça do pâncreas, úlcera gástrica perfurada, acidose diabética e insuficiência renal.

Drogas como diuréticos tiazídicos, morfina, meperidina e codeína provocam elevações da amilase sérica. Níveis plasmáticos diminuídos são observados na hepatite, cirrose hepática, toxemia de gravidez, eclampsia e carcinoma pancreático. A determinação da amilase na urina, assim como a dosagem no soro, pode ser útil para o diagnóstico das doenças pancreáticas. Nas pancreatites a taxa de amilase na urina estará sempre elevada.

**Reagente**

**Reagente nº 1 - Substrato** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Tampão Fosfato (pH 6,0) 50 mmol/L, Azida Sódica 14,5 mmol/L, Cloreto de sódio 300 mmol/L, 2-Cloro-4-Nitrofenil-Maltotriosídeo (G3CNP) 5 mmol/L.

**Estabilidade, Condições de Armazenamento e Transporte**

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo do produto, quando conservados na temperatura recomendada (2 a 8°C), bem vedados e se evitado de contaminação durante o uso. Antes de serem abertos, os reagentes podem ser transportados em temperatura que não excede 30°C, até um limite de 120 horas. **Não congelar.**

**Cuidados Especiais e Precauções**

- As amostras a serem analisadas devem ser tratadas como material potencialmente infectante.
- Quantidades microscópicas de saliva e suor são capazes de deteriorar o substrato. Soprar com a boca, conversar junto ao frasco destampado pode contaminar facilmente o substrato.
- Utilizar os EPI's de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
- O Substrato (1) contém azida sódica que é tóxica e irritante para pele e mucosa.
- As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) deste produto, disponível em [www.bioanalitica.com.br](http://www.bioanalitica.com.br) ou pelo telefone 0800 006 8111.
- Reagentes de lotes diferentes não devem ser misturados.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, a fim de evitar contaminação cruzada.
- Não utilizar o reagente quando se apresentar turvo.
- Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
- O tempo de reação, pipetagens e temperatura de trabalho são muito importantes para obtenção de resultados corretos.
- Usar pipetas de vidro e ponteiras descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.

**Materiais Necessários e Não Fornecidos**

- Analisador bioquímico automático, semiautomático;
- Pipetas de vidro e/ou automáticas;
- Ponteiras;
- Tubos de ensaio;
- Cronômetro.

**Amostra**

Soro, plasma (Heparina/EDTA), urina, líquidos biológicos (ascítico, pleural e sinovial). O analito é estável por 3 dias armazenada entre 2 e 8°C e 6 meses a 10°C negativos, quando livres de contaminação.

Amostras de urina devem ser colhidas em intervalo de 2 a 24 horas. Quando se determina a amilase na amostra de urina, deve-se determinar também a creatinina na mesma amostra. O resultado deverá ser declarado como Relação Amilase/Creatinina (U/g) com objetivo de compensar as variações da atividade da amilase em amostras obtidas em cada coleta. Não adicionar preservativo na amostra de urina e conservar entre 2 e 8°C. Para descarte dos reagentes e materiais biológicos deve-se seguir as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

**Interferências e Limitações**

A saliva contém grande quantidade de amilase, portanto deve-se evitar pipetar com a boca, conversar junto ao frasco destampado evitando assim a contaminação dos reagentes.

Concentrações de bilirrubina até 43,2 mg/dL, triglicérides até 1216 mg/dL e ácido ascórbico até 20 mg/dL não produzem interferências significativas. Valores de hemoglobina maior que 140 mg/dL produzem interferências significativas nas amostras.

**Preparação dos Reagentes**

Reagente pronto para uso.

**Procedimento Técnico**
**Equipamentos Automáticos**

Para uso em analisadores automáticos, verificar o protocolo de automação no site [www.bioanalitica.com.br](http://www.bioanalitica.com.br) ou através do SAC.

**Nota:** Recomendamos o uso do Calibrador – Ref. BA052 para calibração. Para avaliar a precisão das dosagens, recomendamos o uso do Controle N – Ref. BA115 e Controle P – Ref. BA118.

Identificar 2 tubos de ensaio: T (Teste), C (Calibrador) e proceder como a seguir:

	<b>Teste</b>	<b>Calibrador</b>
<b>Amostra</b>	20 µL	-
<b>Calibrador</b>	-	20 µL
<b>Reagente 1</b>	1,0 mL	1,0 mL

Após a adição do reagente, homogeneizar imediatamente e transferir para cubeta termostatizada. Esperar 30 segundos. Realizar a leitura inicial (A1), disparando o cronômetro simultaneamente em 405 nm. Realizar a segunda leitura (A2) após 2 minutos. Tratando se de uma reação de atividade enzimática, é imprescindível que a leitura seja realizada no momento correto para garantir a qualidade dos resultados obtidos.

**Dosagem da Amilase na Urina**

A coleta e preparo da amostra. Instruir o paciente para coletar corretamente a urina no período de tempo (por exemplo, 2 horas).

Homogeneizar, medir e anotar o volume urinário em mL, e também o tempo de coleta da amostra.

Medir o pH da urina e ajustá-lo entre 7,0 a 7,4 utilizando carbonato de sódio quando o pH for menos que 7,0 e fosfato de potássio monobásico quando for maior que 7,4.

Homogeneizar, medir e anotar o volume urinário em mL e o tempo de coleta da amostra. Proceder a dosagem como descrito para o soro.

**Cálculos e Exemplo**

$\Delta A/\text{minuto Teste ou Calibrador} (A_2 - A_1) / 2$

Fator =  $\frac{\text{Atividade do Calibrador (Concentração)}}{\Delta A/\text{minuto Calibrador}}$

Amilase =  $\Delta A/\text{minuto Teste} \times \text{Fator}$

**Calibrador**

$A_1 = 0,161$        $A_2 = 0,301$   
 $\Delta A/\text{minuto Calibrador} = \frac{0,301 - 0,161}{2} = 0,070$

**Teste**

$A_1 = 0,097$        $A_2 = 0,145$   
 $\Delta A/\text{minuto Teste} = \frac{0,145 - 0,097}{2} = 0,024$

Atividade do Calibrador (Concentração): 458 U/L

$$\text{Fator} = \frac{458}{0,70} = 6543$$

$$\text{Amilase} = 0,024 \times 6543 = 157 \text{ U/L}$$

#### **Amilase Urinária / Hora**

$$\text{Amilase Urinária (U/h)} = \frac{\text{Amilase(U/L) x volume urinário (mL)}}{1000 \times \text{tempo de coleta (h)}}$$

$$\text{Amilase urinária (U/L)} = 143$$

$$\text{Volume urinário (mL)} = 190$$

$$\text{Tempo de coleta (h)} = 2$$

$$\text{Amilase Urinária (U/h)} = \frac{143 \times 190}{1000 \times 2} = 13,6$$

#### **Relação Amilase / Creatinina**

$$\text{Relação Amilase / Creatinina (U/g)} = \frac{\text{Amilase (U/L) x 100}}{\text{Creatinina (mg/dL)}}$$

#### **Relação Depuração da Amilase / Depuração da Creatinina**

Na maioria dos casos de pancreatite aguda, ocorrem elevações concomitantes da amilase sérica e urinária, mas em certos casos, a elevação da amilase urinária não é acompanhada por uma elevação paralela da amilase sérica. Portanto, a relação entre a depuração ou clareamento da amilase e a depuração ou clareamento da creatinina, expressa em porcentagem, proporciona maior valor diagnóstico nos casos de pancreatite aguda e pancreatite recorrente.

Determinar a atividade da amilase e a concentração da creatinina nas amostras de soro e urina, e aplicar os resultados na seguinte fórmula:

$$\text{Relação (\%)} = \frac{\text{Amilase na urina (U/L) x Creatinina no soro (mg/dL) x 100}}{\text{Amilase no soro (U/L) x Creatinina na urina (mg/dL)}}$$

#### **Características do Desempenho**

##### **Comparação de Métodos**

O método foi comparado com outro produto com metodologia semelhante através de 40 amostras de soro humano. Através de modelos estatísticos, os resultados foram analisados e resultaram na equação de regressão linear onde Método Bioanalítica ( $y$ ) =  $3,492 + 0,952 * \text{Método comparativo (x)}$  e coeficiente de correlação igual a 0,994.

##### **Sensibilidade**

Uma amostra proteica não contendo Amilase, foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio. A média encontrada foi 1,5350 U/L equivalente a 20 determinações, com desvio padrão de 0,2126 U/L.

A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde à média mais 3 vezes o desvio padrão, que é igual a 2,1728 U/L.

##### **Linearidade**

A reação é linear até 2000 U/L. Para amostras com valores acima de 2000 U/L, diluir a amostra com Cloreto de Sódio 150 mmol/L (0,85%), repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

##### **Repetitividade**

A repetitividade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração média (U/L)	29,55	90,45	193,98
Desvio padrão (U/L)	0,30	0,73	1,48
Coeficiente de Variação (%)	1,02	0,80	0,76

##### **Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 20 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração média (U/L)	35,06	98,76	213,68
Desvio padrão (U/L)	1,32	1,84	2,16
Coeficiente de Variação (%)	3,76	1,86	1,01

##### **Valores de Referência**

Estes valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores para população atendida. Os resultados dos testes devem ser analisados por um profissional responsável.

**Soro ou plasma: 25 a 125 U/L**

**Urina: até 30 U/L**

**Relação Amilase Urinária / Creatinina Urinária: até 400 U/g**

**Depuração da Amilase / Depuração da Creatinina: 1,0 a 4,0 %**

##### **Controle Interno da Qualidade**

O laboratório clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, para assegurar que todos os procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente definidos. Ressaltamos que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica, que deve ser monitorada pelos laboratórios. Portanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens. Sugere-se utilizar soluções estabilizadas da linha de controles e calibradores Bioanalítica.

##### **Observações**

- A limpeza e secagem adequadas do material usado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes. A limpeza da vidraria deve ser feita com detergente neutro. O enxágue deve ser exaustivo sendo os últimos com água destilada ou deionizada.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, a água deve ser do Tipo II, com resistividade  $> 1$  megaohms/cm ou condutividade  $< 1$  microsiemens/cm e concentração de silicatos  $< 0,1$  mg/L. Para o enxágue inicial da vidraria, a água pode ser do Tipo III, com resistividade  $> 0,1$  megahoms ou condutividade  $< 10$  microsiemens. No enxágue final, utilizar água do Tipo II. Coluna deionizadora com sua capacidade saturada libera água alcalina, vários íons e também substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando de maneira imprevisível os resultados. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

##### **Referências Bibliográficas**

- 1 - Toyobo Bioche. Study on determination of Amilase activity using 2-chloro-4-nitrofenil- $\alpha$ -galactopyranosilmaltoside (Gal-G2- $\alpha$ -CNP), 1999.
- 2 - Winn-Deen ES, David H, Sigler G and Chavez R. Development of a direct assay for  $\alpha$ -amylase. Clin Chem 1988; 34: 2005-2008
- 3 - Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co., 1994.
- 4 - Balsells D, Gella FJ, Gubern G, Canalas F. Reference values for  $\alpha$ -amylase in human serum and urine using 2-Chloro-4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Maltotrioside as substrate. Clin Chim Acta 1998; 274: 213-217.
- 5 - Westgard JO, Barry PL, Hunt MR. Clin Chem 1981; 27:493-501.
- 6 - Rosembum JL. Clin Chem 1992; 38:920.
- 7 - Kaufman RA, Tietz NW. Clin Chem 1980;26:846-53.
- 8 - Bioanalítica: Dados internos de arquivo do P&D.

##### **Termos e Condições de Garantia**

A Bioanalítica Diagnóstica garante o desempenho e a qualidade deste produto, dentro das especificações, até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que utilizados, armazenados e transportados nas condições adequadas.

##### **Apresentações**

Ref.	Volume	Reagente 1
BA028-30	30 mL	1 x 30 mL
BA028-60	60 mL	2 x 30 mL

##### **Bioanalítica Diagnóstica Ltda**

Rua Álvares da Silva, 12 - União

CEP: 31160-360 – Belo Horizonte MG - Brasil

Tel. +55 31 3657-0051

[www.bioanalitica.com.br](http://www.bioanalitica.com.br)

E-mail: [bioanalitica@bioanalitica.com.br](mailto:bioanalitica@bioanalitica.com.br)

CNPJ: 20.264.948/0001-61 – Indústria Brasileira

SAC: 0800 006 8111

E-mail: [sac@bioanalitica.com.br](mailto:sac@bioanalitica.com.br)

Revisão: Abril / 2021.