

FINALIDADE

Sistema colorimétrico para determinação de amilase no soro e na urina.

Somente para uso diagnóstico in vitro.

PRINCÍPIO

O soro é incubado com solução de amido tamponado em pH 7. Em contato com o iodo, a solução de amido torna-se azulada. À medida que a molécula de amido é hidrolisada pela amilase o tom azulado esmaece. Dentro de certos limites, a alteração produzida na cor pelo amido degradado com o iodo é proporcional à concentração de amilase no soro.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

O kit **Doles** de amilase é uma modificação do método de Caraway. O substrato tem por base amido solúvel que propicia condições ótimas para a atividade amiloclástica da amilase.

METODOLOGIA

Caraway modificado.

REAGENTES

Substrato: solução tampão fosfato 0,19M contendo Cloreto de Sódio 0,03mol, Ácido Benzóico 0,07mol, estabilizantes e 400mg de Amido solúvel, por litro. O pH da solução é 7,0 +/- 0,1.

Solução de iodo concentrado: solução 0,45M de Iodeto de Potássio e 0,25M de Iodo.

APRESENTAÇÃO

Substrato 3 x 20mL
Solução de iodo concentrado 1 x 4mL

NÚMERO DE TESTES

60 testes/20µL amostra
120 testes/10µL amostra

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir as absorvâncias em **660nm** ou **filtro vermelho**.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipeta semiautomática de 20µL.
- Ponteiras descartáveis.
- Água deionizada ou destilada.
- Cronômetro.
- Banho maria (37°C).
- Frasco de vidro âmbar com capacidade volumétrica de 100mL.
- Balão volumétrico de 100mL.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Substrato: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Solução de iodo concentrada: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo da ampola, obedecidas as condições de armazenamento.

Solução de iodo (uso): armazenar em frasco âmbar ao abrigo da luz. Estável por 2 anos, sob refrigeração (2-8°C), obedecidas as condições de preparo e manuseio.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Todos os reagentes são somente para **uso diagnóstico in vitro**. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se contato

com pele e mucosas. A solução concentrada de Iodo deverá ser manuseada com cautela, pois o contato com a pele pode causar lesões úmidas, bolhosas e dermatite de sensibilização. A solução de uso, embora diluída, deverá ser pipetada com o auxílio de pera. Em caso de contaminação acidental, lavar a área afetada em água corrente. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais. Observar ainda a simbologia constante nos rótulos do produto:



Corrosivo



Irritante

AMOSTRA

Soro ou plasma (colhido com heparina), urina e líquidos duodenal ascítico e pleural. A enzima permanece estável no soro por 8 horas, à temperatura de 20-30°C, e por 30 dias, à temperatura de 2-8°C. Todos os anticoagulantes, com exceção da heparina, inibem a atividade da amilase, por sequestrarem o cálcio necessário à otimização da atividade amilásica.

A amilase na urina permanece estável por 15 dias à temperatura ambiente (20-30°C). O volume coletado pode oscilar entre 1 e 24 horas, porém o tempo de coleta recomendado é de 2 horas. O volume urinário deve ser medido, pois a interpretação é baseada na quantidade de unidades de amilase excretada por hora.

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Preparo da solução de iodo (uso):

Transferir todo o conteúdo de uma ampola de iodo concentrado para um balão volumétrico de 100mL. Lavar internamente a ampola com água deionizada e transferir o líquido para o balão. Acertar o volume à marca com água deionizada e guardar em frasco âmbar. A solução de iodo (uso) permanece estável por 2 anos à temperatura de 2-8°C.

Rotular dois tubos de ensaio com **C** (controle) e **T** (teste).

Proceder como segue:

	C	T
Substrato	1,0mL	1,0mL

Incubar durante 5 minutos em banho maria (37°C).

Amostra	-	20µL
---------	---	------

Agitar e incubar durante, exatamente, 7 minutos e 30 segundos, em banho maria (37°C).

Solução de iodo (uso)	1,0mL	1,0mL
Água destilada ou deionizada	8,0mL	8,0mL

Misturar bem e determinar as absorvâncias do **C** (controle) e **T** (teste) em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **660nm** ou **filtro vermelho**, zerando o aparelho com água deionizada. A cor final permanece estável por 5 minutos, à temperatura de 20-30°C.

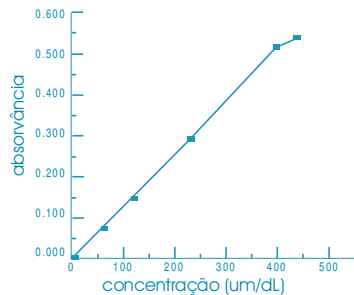
Obs.: Dosando-se a amilase em vários soros ao mesmo tempo, basta a determinação de um controle. Acrescentar o soro a intervalos de 30 segundos. O tempo deve ser controlado com um cronômetro.



Dosagem da amilase na urina

- Coletar urina durante determinado tempo em horas e anotar o volume.
- Ajustar o pH ao nível de 7-7,4. Se a urina for ácida, adicionar Carbonato de Sódio sólido. Se alcalina, acrescentar Fosfato de Potássio Monobásico.
- Proceder de maneira idêntica ao soro.

CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (un/dL)
1	0.000	0
2	0.075	59
3	0.150	118
4	0.297	236
5	0.509	400
6	0.533	442

Obs.: Não utilizar esta curva para determinar o resultado de seu ensaio.

- A curva de calibração é a representação gráfica da relação entre os valores das absorvâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão (**a curva foi construída utilizando-se conjunto de soros de concentrações conhecidas**). São necessários três passos para confeccioná-la: (1) preparo das soluções padrão; (2) medição dos valores de absorvância das soluções padrão, de acordo com o especificado no procedimento técnico da presente instrução de uso, e (3) montagem de um gráfico, em papel especial, linear, onde são relacionados os valores de absorvância com os de concentração, conforme demonstrado na figura acima.

As dosagens para montagem da curva foram feitas em um espectrofotômetro "Ultrospec III", Pharmacia Biotec, comprimento de onda de 660nm e cubetas com passagem de luz de 10mm.

- As absorvâncias relacionadas na tabela acima foram obtidas da relação:

$$\frac{\text{absorvância C} - \text{absorvância T}}{\text{absorvância C}}$$

- A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma determinada concentração, na qual pode ser determinado um fator de calibração (F), de acordo com a Lei de Beer.
- **A reação é linear até 400un/dL (ver curva acima). Para valores mais elevados, diluir a amostra com solução fisiológica e proceder a nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**

$$\text{A relação } \frac{\text{absorvância C} - \text{absorvância T}}{\text{absorvância C}}$$

define a porção de amido hidrolizado pela enzima durante o período de incubação.

A unidade de amilase é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 10mg de amido em 30 minutos e à temperatura de 37°C. Na presente metodologia, 1mL do substrato contém 0,4mg de amido que é incubado durante 7,5 minutos com 20µL de soro e que, transformado em números, gera a seguinte equação:

$$\frac{0,4}{10} \times \frac{30}{7,5} \times \frac{100}{0,02} = 800$$

amido tempo de incubação volume de soro

As unidades são expressas por decilitros de soro, justificando o número 100 no quociente.

CÁLCULOS

$$\text{Amilase un./dL de soro} = \frac{\text{absorvância C} - \text{absorvância T}}{\text{absorvância C}} \times 800$$

Exemplo:

Leituras:

Abs.(C) : 0,412

Abs. (T) : 0,372

$$\text{Amilase un./dL de soro} = \frac{0,412 - 0,372}{0,412} \times 800 = 77,6$$

URINA

Unidade de amilase urinária/hora =

$$\frac{\text{absorvância (C)} - \text{absorvância (U)}}{\text{absorvância C}} \times 800 \times \frac{V}{100} \times \frac{1}{T}$$

V = volume urinário em mL

T = tempo de coleta da amostra em horas

Exemplo:

Leituras:

Abs.(C) : 0,412

Abs. (T) : 0,359

V : 200mL

T : 2 horas

$$\text{Unid. de amilase urinária/hora} = \frac{0,412 - 0,359}{0,412} \times 800 \times \frac{200}{100} \times \frac{1}{2} = 102,9$$

SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADE

A unidade Caraway de amilase não é convertível para Unidade Internacional (U.I.).

LIMITAÇÕES DO SISTEMA

- Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso. Qualquer alteração poderá levar a resultados errôneos.
- O tempo deve ser controlado com um cronômetro.
- A pipeta não deverá ser soprada, para evitar contaminação pela amilase salivar.
- A atividade da amilase apresenta valores falsamente elevados com o paciente em uso de aspirina, colinérgicos, codeína, etanol, morfina, tetraciclina e anticoncepcionais orais.

CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

1. Limpeza e secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A água utilizada na limpeza do material, no preparo dos reagentes e na dosagem, deve ser de boa qualidade.
3. Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, aminas e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
4. As pipetagens devem ser precisas.
5. O nível da água do banho maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio e a temperatura (37°C), rigorosamente observada.
6. O uso de soro controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar um soro controle com valor na faixa de normalidade (**soro controle N - Doles**) e outro soro controle de valor elevado (**soro controle P - Doles**).



- 7.O tempo deve ser rigorosamente controlado por cronômetro.
 8.Na pipetagem, não soprar a pipeta, para evitar contaminação pela amilase salivar.
 9.A estabilidade do substrato é verificada, em cada determinação, pela leitura do controle.

VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida.

Como orientação sugerimos os seguintes valores:

Soro 60 - 160 un/dL

Urina 50 - 140 un/hora

SIGNIFICADO CLÍNICO

A amilase sérica apresenta-se aumentada nas pancreatites agudas e crônicas. Pode ainda estar aumentada nas condições em que o paciente é portador de pseudo-cisto pancreático, perfuração intestinal com peritonite, gravidez ectópica e patologias que comprometam as vias biliares.

A dosagem da amilase sérica é utilizada como meio laboratorial diagnóstico na parotidite epidêmica (caxumba) que ocorre principalmente em crianças.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Foram realizados 46 testes em amostras cujo teor de Amilase situava-se no intervalo de 52 a 309 un/dL. A comparação do kit de Amilase Doles (Y) com um método de referência (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 3,042 + 0,956X$, sendo o coeficiente de correlação 0,99.

Adição de amilase (amilase salivar) em soros cujas concentrações oscilaram entre 60 e 190 unidades Caraway, mostraram recuperação de $99 \pm 5\%$.

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas, em duas amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (un/dL)	60,84	178,30
Desvio padrão	3,20	3,61
Coefficiente de variação (%)	5,26	2,02

Reprodutibilidade: foram realizadas 20 dosagens, durante 20 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (un/dL)	73,28	165,58
Desvio padrão	3,64	4,78
Coefficiente de variação (%)	4,97	2,89

Especificidade: a presente metodologia de Caraway modificado é específica para determinação da amilase sérica.

Sensibilidade: a diferença de absorvância, de 0,010, corresponde a 20un/dL de concentração de Amilase, quando realizados os testes em espectrofotômetro, a 660nm. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório.

Diluição da matriz: estudos sucessivos de diluição da matriz mostraram que não há interferência na sensibilidade diagnóstica da presente metodologia de Caraway modificado.

Substâncias interferentes: todos os anticoagulantes, com exceção da heparina, inibem a atividade da amilase por quelação com o cálcio. Quando contamina o material de ensaio, a amilase salivar interfere decisivamente nos valores da amilase sérica, levando a resultados falsamente elevados. Certas drogas interferem nos teores de amilase. Para controle de tal interferência, recomenda-se que o paciente seja questionado quanto ao uso de medicamentos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Caraway, W.T.: *Amer. J.Clin.Path.* 32, 97-99, 1959.
- Pesce. J.A., Kaplan. A.L.: *Química Clínica Métodos*, 830 - 842, 1990.
- Tibúrcio, H.M.: *Controle Interno da Qualidade Analítica*, 1ªed. março/1995.
- Doles: dados de arquivo.

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - **Código de Defesa do Consumidor**.

Todos os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento dos mesmos, se obedecidas as condições abaixo:

- 1.O usuário do sistema seguir, rigorosamente, o procedimento técnico.
- 2.As condições de armazenamento deverão estar de acordo com o estabelecido nas instruções de uso.
- 3.Os materiais necessários e não fornecidos deverão estar em boas condições técnicas.

Todos os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda

CNPJ: 01.085.513/0001-05

Rodovia BR 153, Km 1273, Lt.07 Chácara Retiro

CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil

Caixa Postal 1051

email: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810051

Revisão: 14 (10/2009)

NBR ISO 9001

Sistema da Qualidade certificado desde 1999

