

Alfa-Amilase InviVET

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*. Uso exclusivo veterinário.

FUNDAMENTO:

O Gal-G2- α -CNP [α -(2-Cloro-4-nitrofenil)- β 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 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 transmitam 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 [α -(2-Cloro-4-nitrofenil)- β 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 reagente indicam uma contaminação como saliva ou suor.

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. Termostatar 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 H₂O (aumento de absorbância)

C. Procedimento:

Pipetar na cubeta	25°C	37°C
Amostra	20 μ L	10 μ L
RGT	1000 μ L	1000 μ 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:

Espécie	U/L
Canina	1519 - 2665
Felina	315 - 1181
Equino	75 - 150 U/L

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

CONTROLE DE QUALIDADE:

Todo soro controle contendo valores determinados pelo método Gal-G2- α -CNP para alfa-Amilase pode ser empregado. Recomendamos o uso de Controle 1 InviVET e Controle 2 InviVET.

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 Blook & 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 α -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
400	RGT	1 x 50 mL	50

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- β -D-galactopyranosylmaltoside, Toiobo Biochem (Enzymes and Protein Markers) Nº 3026. Clinical Chemistry 46:7 2000
2. Toshihico Saganuna; Yoshiski Maeda; Kanefurni Kitahara, Tomonori Nagahama, Study of the action of human salivary alpha-amylase on 2-chloro-4-nitrophenyl- α -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
7. Eclinpath – Cornell University College of Veterinary Medicine.
8. Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária, STOCKHAM, S.; SCOTT, M., Guanabara Koogan, 2a Edição, 2020.
9. Manual de Patologia Clínica Veterinária, LOPES, S.; BIONDO, A., SANTOS, A., UFSM, 3ª Edição, 2007.
10. Large Animal Interne Medicine, SMITH, B., Mosby Elsevier, 4ª Edition.

DEPARTAMENTO DE SERVIÇOS ASSOCIADOS

Para esclarecimentos de dúvidas do consumidor quanto ao produto.
Telefone: 31-3654-6366 e-mail: invitroms@invitro.com.br





Produzido e Distribuído por In Vitro Diagnóstica Ltda.

Rua Cromita, 278, Distrito Industrial – Itabira/MG CEP: 35903-053

Telefone: 31-3067-6400 e-mail: invitroms@invitro.com.br

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

SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS DO PRODUTO

	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