Alfa Amilase - SNIBE

MÉTODO
Gal-G2-α-CNP.

FINALIDADE
Reagente para a determinação da atividade da alfa amilase em soro, plasma heparinizado e urina. Somente para diagnóstico de uso *in vitro* profissional.

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:

Gal-G2-α-CNP + H_2O → Gal-G2 + CNP (2-cloro-4-nitrofenol)

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 rôta, 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 clearence de amilase e creatinina:

$$CAM/CCREA = \frac{(AMI)\ Urina}{(AMI)\ Soro} \times \frac{(CREA)\ Soro}{(CREA)\ Urina}$$

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.

IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO
Conservar entre 2 a 8ºC.

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 – 8ºC. Depois de aberto o frasco, ela é estável por 12 semanas quando armazenada entre 2 – 8ºC, e por 4 semanas entre 15 – 25ºC.
A contaminação do regente 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 37ºC.

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA
O fabricante garante a qualidade do produto, se este for armazenado como descrito acima e em sua embalagem original.

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 transmitem 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.

AMOSTRAS BIOLÓGICAS
Tipo de amostra: Soro, plasma (heparina), urina. Não utilizar amostras com sinais de contaminação microbiana.

Estabilidade das amostras: Soro e plasma: 7 dias de 20...25°C / temperatura ambiente; 1 mês de 2...8°C; 1 ano a -20°C
Urina: coletar a amostra com intervalos determinados de 2 a 24 horas. A estabilidade é de 1 mês entre 2...8°C, desde que o pH seja ajustado para 7,0.

• 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
Equipamento de bioquímica automático, pipeta, ponteira e lixo para descarte. Os materiais não fornecidos podem ser adquiridos no mercado especializado de artigos para Laboratórios de Análises Clínicas.

MÉTODO DE ANÁLISE
A. Termostatizar o reagente de uso na temperatura desejada. A temperatura deve permanecer constante (±0,5 ºC) durante a execução do teste.

B. Leitura em espectrofotômetro:
Comprimento de onda: Hg 405 nm (400 – 410 nm).
Cubeta: 1cm
Temperatura: 25ºC ou 37ºC
Medida: Contra H_2O (aumento de absorbância)

C. Procedimento de teste:

Pipetar na cubeta	25ºC	37ºC
Amostra	20 µL	10 µL
RGT	1000 µL	1000 µL
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.		

CÁLCULOS:
D. Dosagem em soro, e plasma:
A partir das leituras, determinar a mudança da média da absorbância por minuto (ΔA/min) e usar este valor para o cálculo da atividade da alfa-amilase na amostra.

Calcular a média das diferenças das extinções por minuto

$$(\Delta A/min) = \frac{(A1-A0)+(A2-A1)+(A3-A2)}{3}$$

Para calcular a atividade de Alfa-Amilase aplicar ao ΔA/min os seguintes fatores:

U/L (25ºC) = ΔA/min x 9864
U/L (37ºC) = ΔA/min x 24820
IFCC (37ºC) = ΔA/min x 10183

Exemplo
Temperatura a 25 C e ΔA/min (405 nm):
A0 = 1,156
A1 = 1,193
A2 = 1,231
A3 = 1,270

$$\Delta A/min = \frac{(1,193-1,156)+(1,231-1,193)+(1,270-1,231)}{3} = 0,038$$

U/L = 0,038 x 9864 = 375 U/L

Fator de converção de unidades internacionais (U/L) para o sistema internacional – SI (Kat/L):
1 U/L = 16,67 x 10^3 µKat/L
1 µKat/L = 60 U/L.

E. Dosagem na urina:
Coleta e preparo da amostra: O paciente deve ser instruído corretamente para a coleta da amostra no período estipulado pelo médico (determinado número de horas). Homogeneizar, medir e anotar o volume em mL e o tempo de coleta da amostra.

Dosagem:
Seguir os mesmos procedimentos da técnica e os cálculos utilizados para amostras de soro /plasma. Calcular o resultado em Unidades de Amilase/hora (U/h).

Unidade U/h:
Amilase U/h = (Amilase U/L x V) / (H x 1000)
V= volume da urina em mL
H= número de horas da coleta da urina

Exemplo:
Amilase U/L = 93 U/L
V = 210 mL
H = 2 horas
Amilase U/h = (93 x 210) / (2 x 1000) = 9,8 U/h

Relação Amilase / Creatinina na urina (U/g)
U/g = (Amilase em U/L x 100) / (Creatinina mg/dL)

Relação Clareamento Amilase / Clareamento Creatinina
Determinar a atividade da amilase e a concentração da creatinina nas amostras de soro e urina.

%Relação CA/CC = (Amilase Urina U/L x Creatinina Soro mg/dL) / Amilase Soro U/L x Creatinina Urina mg/dL) x 100

CALIBRAÇÃO
O Fator utilizado deve ser verificado regularmente. Para a calibração recomenda-se o uso do Multicalibrador de Bioquímica – Snibe de acordo com os procedimentos descritos em sua instrução de uso e tabela com valores. Inserir no analisador o valor definido para este parâmetro. Recomendamos a verificação da validade da calibração antes de cada corrida. A recalibração deve ser realizada quinzenalmente ou:
-Sempre que os controles se encontrarem fora da faixa;
-Depois da troca de lote de reagente;
-De acordo com o requerido no controle de qualidade interno.

VALORES DE REFERÊNCIA

	25°C	37°C	IFCC
Soro, plasma (U/L)	até 120	até 220	28 - 100
Urina (U/L)	até 600	até 1000	≤ 460
Urina (U/h)	até 450 U/h	até 900 U/h	≤ 410 U/h
Relação Amilase / Creatinina na urina	Até 400 U/g		
Relação clareamento amilase/ clareamento creatinina	1 a 4%		

Os valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência com base na população atendida.

CONTROLE DE QUALIDADE
Todo soro controle contendo valores determinados para o teste de Amilase, método Gal-G2-α-CNP, pode ser utilizado. Recomendamos a utilização de nossos soros controle da linha Multicontrole de Bioquímica - Snibe.

AUTOMAÇÃO
Adaptação especial para analisadores automáticos de bioquímica está disponível e será enviada ao consumidor quando solicitada para o Departamento de Serviços Associados.

RASTREABILIDADE
O kit Alfa Amilase é padronizado para o método IDMS.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Exatidão
O kit Alfa 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 Bablok & Passing. A regressão linear obtida foi descrita como:
r = 0,969091
Y = 3,277889 + 0,994748 X
$X_{médio}$ = 150,96
$Y_{médio}$ = 153,45
Ambos os métodos mostraram uma boa concordância e um desvio não significativo foi observado em algumas amostras específicas.

Precisão
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

Sensibilidade Analítica
A partir da média do desvio-padrão do resultado encontrado do soro controle de concentração mais baixa da imprecisão dia-a-dia (reprodutibilidade), a sensibilidade pode ser calculada utilizando 3 desvios - padrões (DP):
Sensibilidade (3 x DP): 3 x 4,28 = 12,84 U/L.

Linearidade
O Alfa Amilase é linear até uma concentração de 4000 U/L (1538 U/L padronizado pelo IFCC). Se a absorbância por minuto exceder a ΔA/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.

Interferentes
Nenhuma das substâncias abaixo, nas concentrações descritas, apresentou interferência nos testes.
Ácido Ascórbico até 500 mg/dL
Glicose até 5 g/dL
Hemoglobina até 500 mg/dL
EDTA até 500 mg/dL
Fluoreto até 500 mg/dL
Citrato até 500 mg/dL.

Recuperação em soro controle
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

APRESENTAÇÃO DO KIT

Cat. Nº	Reagente	Volume
802-2	RGT	2 x 60 mL

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–maltotrioside in the presence of potassium thiocyanate, Department of Biochemical Science and Technology, Faculry 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 18° 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

DEPARTAMENTO DE SERVIÇOS ASSOCIADOS
Para esclarecimentos de dúvidas do consumidor quanto ao produto:
Telefone: +55(31) 3067-6400 E-mail: invitroms@invitro.com.br
N.º DO LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO, DATA DE VALIDADE VIDE RÓTULO DO PRODUTO.

Fabricado e Regularizado por: In Vitro Diagnóstica Ltda. Rua Cromita, 278, Distrito Industrial, Itabira/MG. CEP: 35903-053. CNPJ: 42.837.716/0001-98.
Telefone: +55(31) 3067-6400 e-mail: invitroms@invitro.com.br
Resp. Téc.: Patrícia C. C. Vilela – CRF 4463

ANVISA: 10303460576 Classe de Risco: II

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