



Método
Cinético – CNP-G3

Finalidade
Kit para determinação da alfa amilase em amostras de soro, plasma e urina.

Princípio do método
A alfa amilase catalisa a hidrólise do 2-cloro-4-nitrofenil-maltotriosídeo (CNP-G3), liberando 2-cloro-4-nitrofenol (CNP), 2-cloro-4-nitrofenil-maltosídeo (CNP-G2), maltotriosídeo (G3) e Glicose. A concentração catalítica é determinada a partir da velocidade de formação do 2-cloro-4-nitrofenol, medido a 405 nm.



Significado clínico
A alfa amilase presente no sangue e na urina dos indivíduos normais é predominantemente de origem pancreática e salivar. As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise de amilopectina, amilose, glicogênio e seus produtos parcialmente hidrolisados.
As elevações séricas e urinárias são observadas em uma grande variedade de distúrbios. A maioria das elevações da amilase séricas são devidas a elevação das taxas de entrada de amilase na corrente sanguínea, diminuição da taxa de depuração ou ambas.
Na maioria dos pacientes com pancreatite aguda, há uma elevação da atividade da amilase sérica com um aumento concomitante da amilase urinária. Contudo, pode haver ocasiões em que a amilase urinária elevada não é acompanhada por um aumento concomitante da amilase sérica. Resultados falso positivos podem ocorrer quando amostras é colhida muito cedo ou muito tarde, ou em casos de necrose fulminante onde a produção de amilase está diminuída ou cessou.

Composição dos reagentes
Substrato
Tampão MES.....200mmol/L
2-Cloro-4-nitrofenil-matotrisídeo (G3CNP).....5 mmol/L
Cloreto de Sódio.....400 mmol/L
Azida Sódica.....15 mmol/L

Apresentação

Código	Substrato
0031	2x30 mL

Condições de uso e armazenagem
A data de validade aparece no rótulo da embalagem. Não usar reagentes cuja data de validade tenha expirado.
Todos os reagentes devem ser mantidos sob refrigeração na faixa entre 2 a 8°C e ao abrigo da luz. Os reagentes devem permanecer fora do refrigerador somente o tempo necessário para as dosagens.

Não utilizar os reativos nas condições abaixo:
Presença de partículas, turbidez ou absorbância do branco, contra água destilada, superior a 0,500 D.O a 405 nm (cubeta de 1cm).

Insumos e equipamentos necessários não fornecidos

- Água destilada ou deionizada;
- Banho maria;
- Cronômetro;
- Espectrofotômetro;
- Pipetas manuais ou automáticas;
- Ponteiros descartáveis;
- Vidraria.

Precauções e cuidados especiais

- Somente para uso diagnóstico “in vitro”;
- Não misturar ou trocar lotes de reagentes diferentes;
- Evitar contaminação microbiana dos reagentes e não utilizar reagentes que tenham sinais de contaminação ou precipitação;
- Caso haja contato com quaisquer reagentes, lavar a área afetada com água em profusão. Em caso de ingestão de reagentes, procurar auxílio médico imediato munidos desta instrução de uso;
- Utilizar equipamentos de proteção individual segundo normas de biossegurança;
- A água (destilada ou deionizada) utilizada na limpeza do material ou nos procedimentos deve ser recente e isenta de agentes contaminantes;
- Certificar-se das condições adequadas de funcionamento dos equipamentos de análise;
- O descarte do material utilizado deve ser feito segundo os critérios de biossegurança;
- Lavar as mãos após trabalhar com material potencialmente infeccioso.
- Não pipetar reagentes químicos com a boca.

• **Não contaminar a vidraria ou o reagente com saliva ou suor devido aos seus altos conteúdos em alfa-amilase. Não soprar a pipeta utilizada. Não conversar nas proximidades do frasco destampado, pois o reagente pode se contaminar irreversivelmente. O aparecimento de amarelado no reagente é sinal de contaminação por alfa-amilase.**

Amostra biológica

- Soro, plasma ou urina.

A alfa-amilase em soro, plasma ou urina é estável durante 30 dias quando mantido entre 2 e 8°C. A Alfa Amilase em urina é estável por 30 dias entre 2-8 °C em pH igual a 7. Heparina ou EDTA como anticoagulantes não interferem. Anticoagulantes como citrato ou oxalato interferem produzindo resultados falsamente diminuídos.
Todo o material biológico deve ser processado como sendo potencialmente contaminante. Usar luvas descartáveis durante a manipulação do material biológico. As amostras devem ser descartadas, após o uso, em recipientes específicos para este fim. Não dispensar em coletores de lixo comuns ou nas redes de esgoto.

Preparo do reagente
O reagente se encontra pronto para uso.

Procedimento

1. Permitir que reagentes e amostras atinjam a temperatura ambiente;
2. Pipetar, em diferentes tubos de ensaio, como a seguir:

	Macro	Micro
Amostra	20 µL	10 µL
Substrato	1,0 mL	0,5 mL

3. Homogeneizar rapidamente e inserir em um porta cubetas termostatizada a 37°C;
4. Ler e registrar a absorbância inicial (A0), em 340 nm;
5. Realizar novas leituras (A1, A2 e A3), em intervalos de 1 minuto durante 3 minutos;

6. Calcular a média das diferenças das absorbâncias (ΔA/min), que será usada nos procedimentos de cálculo.

Cálculos
Considerando que o coeficiente de absorção molar do CNP a 405 nm no meio da reação é 15490, se deduzem os seguintes fatores para calcular a concentração catalítica em U/L a partir das leituras de ΔA/min:

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

Concentração da Amostra (U/L) = Δ A /min x 3292 (Soro ou Plasma)
Concentração da Amostra (U/L) = Δ A /min x 6520 (Urina)

Exemplo:
A0 = 0,070
A1 = 0,077
A2 = 0,098
A3 = 0,129

Então ΔA/min será:

$$\Delta A / \text{min} = \frac{((0,077 - 0,070) + (0,098 - 0,077) + (0,129 - 0,098))}{(3)}$$

Δ A /min = 0,019

Concentração da amostra (Soro ou Plasma):
Δ A /min x 3292 = 0,019 x3292 = 62 U/L

Unidades SI: Amilase U/L x 0,0167 = µKat

Depuração da Amilase/Depuração da Creatinina
Na maioria dos pacientes com pancreatite aguda, há uma elevação da atividade da amilase sérica com um aumento concomitante da atividade da amilase urinária. Contudo, pode haver ocasiões, em que a amilase urinária elevada não é acompanhada por um aumento na amilase sérica. Sendo assim, o aumento da depuração renal da amilase justifica o maior valor diagnóstico da atividade da amilase urinária no diagnóstico da pancreatite aguda e recidivante. Para estabelecer a relação Depuração da Amilase/Depuração da creatinina, é necessário dosar a amilase e a creatinina (sérica e urinária), aplicando os resultados na seguinte fórmula:

$$\text{Relação} = \frac{((AAU((U/L))) \times (CRS((\text{mg/dL}))))}{(AAS(U/L) \times CRU(\text{mg/dL}))} \times 100$$

Sendo:
AAU = Alfa Amilase Urinária
CRS= Creatinina Sérica
AAS= Alfa Amilase Sérica
CRU = Creatinina Urinária

Linearidade
A reação é linear até 1317U/L em soro e 2600 em urina . Para valores maiores do que os referidos, diluir a amostra com água destilada e repetir a dosagem. Multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Valores de referência

- Soro ou Plasma = 22-80 U/L (37°C)
- Urina = < 321 (37°C)
- Depuração Amilase/Depuração Creatinina = 1- 4%

Estes valores são dados apenas a título orientativo. É recomendável que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência.

Controle de qualidade

O laboratório deve ter como prática de rotina o uso de soros controle comerciais. Preferencialmente deve participar de programas de controle externo de qualidade, a exemplo daqueles oferecidos pela SBAC e SBPC.

Dados estatísticos de desempenho do teste

Repetitividade

Concentração média	n	CV
64 U/L	20	1,8%
338 U/L	20	0,5 %

Reprodutibilidade

Concentração média	n	CV
64 U/L	25	3,5%
338 U/L	25	1,0 %

Especificidade analítica: A comparação com método similar validado (que também utiliza a metodologia cinética, empregando o substrato Etilideno – G7-p-nirofenilfosfato) demonstrou um coeficiente de correlação, igual a 0,999 a partir da análise de amostras aleatórias oriundas de pacientes de ambulatorio. A equação de regressão obtida foi: y = 1,035x + 0,0146

Sensibilidade analítica: O método é sensível a partir de valores de 1,8 U/L de Alfa Amilase na amostra.

Interferentes

A hemoglobina (2,5 g/L) interfere. Outros medicamentos e substâncias podem interferir.

Referências bibliográficas

- 1. WINN-DENN ES, et al. Clin Chem 1988; 34:2005-2008
- 2. GUBERN G, et al. Quim Clin 1996; 15:51-52
- 3. 3.GELLA FJ, et al. Clin Chim Acta 1997

Número de testes

Código	Técnica Macro (1 mL)	Técnica Micro (0,5 mL)
0031	60	120

Dados do fabricante

MBiolog Diagnósticos Ltda.
Rua Gama, 337 – Vila Paris – Contagem – MG – CEP 32.372-120
Responsável Técnico: Fabrício Galvão de Brito – CRF-MG 9587

SAC - Serviço de Atendimento ao Cliente

☎(31) 3507 – 0707
✉ sac@mbiolog.com.br

www.mbiolog.com.br

Parâmetros para programação

COBAS MIRA / COBAS MIRA PLUS	
GENERAL	
MEASUREMENT MODE	ABSORB
REACTION MODE	R-S
CALIBRATION MODE	FACTOR
REAGENT BLANK	REAG/DIL
CLEANER	NO (1)
WAVELENGTH	340 nm
DECIMAL POSITION	0
UNIT	U/L
ANALYSIS	
POST. DIL FACTOR	2
CONC. FACTOR	NO - SPACE
SAMPLE CYCLE	5
VOLUME	4 µL
DILUTION NAME	H2O - 0
VOLUME	20 µL
REAGENT CYCLE	1
VOLUME	200 µL
CALCULATION	
SAMPLE LIMIT	NO - SPACE
REACTION DIRECTION	INCREASE (1)
CHECK	ON (1)
CONVERSION FACTOR /OFFSET	1/0
TEST RANGE LOW	0
HIGH	1300
NORMAL RANGE LOW	0
HIGH	60
NUMBER OF STEPS	1
CALCULATION STEP A	KINSEARCH
READING FIRST	6
LAST	13
CALIBRATION	
CALIBRATION INTERVAL	ON REQUEST - 3
TIME	NO - SPACE
REAGENTE RANGE LOW	NO - SPACE
HIGH	NO - SPACE
BLANK RANGE LOW	NO
HIGH	NO
FACTOR	6601

* Parâmetros inserido pelo usuário.

EXPRESS 550/550 PLUS

TEST NAME: AA	TEST: AA				
TEST BAR CODE: *					
TEST TYPE: KINETIC	CURVE TYPE: BLAN. LINEAR				
UNITS:U/L	Nº OF DECIMAL PLACE: 1				
PRIMARY WAVELENGTH: 405	SECONDARY WAVELENGTH: NO				
READ TIME / INTERVAL: 30	SAMPLE BLANK: NO				
FACTOR: - 4350					
CALIBRATION INTERVAL: *	Nº OF REPLICATES: *				
Nº OF CALIBRATOR: 2					
LOW BLANK A LIMIT: - 0.100	HIGH BLANK A LIMIT: 2.000				
LOW A LIMIT: 0,000	HIGH A LIMIT: 2.500				
LOW NORMAL: 0	HIGH NORMAL:60				
LINEARITY LIMIT: 690	CURVE S.D. LIMIT: 8				
SAMPLE VOLUME: 7 µL	TEST: AA				
SAMPLE DILUENTE BOTTLE TYPE: *	PREDILUTION RATIO: 1				
REAGENT DILUENTE BOTTLE TYPE:*					
Reagent Volume	Bar Code	Diluent Volume	LAG TIME	BT	
REAGENT 1	300	AA1A	-	60	*

* Parâmetros inserido pelo usuário.

BIOPLUS 2000 / 200

MODO	CIN	INTERVALO CIN	60
WLI	405	Nº DE INTERVALOS	3
WL2	-	ΔA/min	0,200
TEMP?	37 °C	% LIM LIN	10
VOL ASP	400	DIR	CRESCENTE
RETARDO	003	ABS REAT MIN	0
FATOR	3292	ABS REAT MAX	0.500
UNIDADE	U/L	VR/VN MIN	*
IMPRESSÃO	EXTENSA	VR/VN MAX	*

* Parâmetros inserido pelo usuário.

Verificar os parâmetros das programações utilizando soros controles comerciais.