

AMILASE CNPG Liquiform

Instruções de Uso

Ref.: 142

ANVISA 10009010053

Finalidade . Sistema para determinação da α -Amilase em amostras de sangue, urina e outros líquidos biológicos.

Uso profissional.

[Somente para uso diagnóstico in vitro]

Princípio . A α -Amilase hidrolisa o substrato *2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido* (CNPG3), liberando *2-cloro-4-nitrofenol* (CNP) e formando *2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltosídeo* (CNPG2), maltotriose (G3) e glicose (G). A velocidade de formação de *2-cloro-4-nitrofenol* pode ser medida fotometricamente e proporciona uma medida direta da atividade da α -Amilase na amostra.



Características do sistema . Os métodos mais recentes para determinação da α -Amilase se baseiam na produção de p-nitrofenol a partir da hidrólise de substratos oligossacarídeos bem definidos, com grupos bloqueadores ligados ao resíduo de carboidrato terminal. A ação hidrolítica da α -Amilase nesses oligossacarídeos produz várias cadeias de tamanhos diferentes, sendo necessária acoplar reações enzimáticas auxiliares para liberar o p-nitrofenol. Em muitos casos, a presença de traços de amilase como contaminante das enzimas auxiliares diminui consideravelmente a estabilidade desses substratos.

O ensaio proposto utiliza um substrato cromogênico, *2-cloro-p-nitrofenol*, ligado a maltotriose. A α -Amilase atua diretamente nesse substrato, liberando uma quantidade maior que 90% do cromóforo CNP, cuja velocidade de formação pode ser medida em modo cinético. Utiliza-se um substrato em meio líquido, que não requer o emprego de enzimas auxiliares para a formação do produto corado, obtendo-se então uma prolongada estabilidade do substrato.

O sistema Labtest é facilmente aplicável em analisadores automáticos e semiautomáticos capazes de medir uma reação cinética em 405 nm. A elevada linearidade do ensaio diminui consideravelmente o número de amostras que necessitam ser diluídas.

Metodologia . Substrato *2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido* (CNPG3).

Reagente

1. - Substrato - Armazenar entre 2-8°C

Contém tampão ≤ 100 mM, pH 6,2; *2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido* 560 μ M; cloreto de sódio 350mM; acetato de cálcio 6,0 mM; tiocianato de potássio 900 mM e azida sódica 14,6 mM.

O reagente não aberto, quando armazenado nas condições indicadas, é estável até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem resultar na redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Ações como pipetar o substrato com a boca, soprar no substrato, usar material contaminado com saliva, suor e conversar junto ao frasco destampado podem contaminar o reagente com quantidades microscópicas de saliva ou suor, capazes de deteriorar irreversivelmente o substrato.

Como ocorre em toda reação enzimática, a rigorosa observação do tempo e da temperatura de incubação é de grande importância para a qualidade dos resultados obtidos.

Estudos de estabilidade mostraram que a absorvância do substrato, medida contra a água, apresenta um acréscimo de 0,0015 por mês. Elevações repentinas da absorvância do substrato indicam contaminação e sua utilização deve ser suspensa.

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação do reagente. O reagente contém azida sódica que é tóxica. Não ingerir e, no caso de contato com os olhos deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico. A azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo ou cobre. Portanto, utilizar grande volume de água para descartar o reagente.

O reagente contém também tiocianato de potássio, que é venenoso. Não ingerir. Em contato com substâncias ácidas, libera gases altamente tóxicos.

Materiais necessários e não fornecidos.

1. Fotômetro com cubeta termostatizada capaz de medir com exatidão a absorvância em 405 nm.
2. Pipetas para medir amostra e reagente.
3. Cronômetro.
4. Calibrador - Linha Calibra H - Ref. 80, Labtest.

Amostra

Usar soro, plasma (heparina), urina e líquidos (ascítico, duodenal ou pleural). Amostras contendo citrato, EDTA ou oxalato produzem resultados falsamente diminuídos.

A atividade enzimática é estável 7 dias entre 15-25°C e vários meses entre 2-8°C. Não usar amostras com sinais de contaminação microbiana.

As amostras de urina devem ser recolhidas em intervalo de 2 a 24 horas. Quando se determina a amilase na amostra de urina, deve-se também determinar a creatinina na mesma amostra. O resultado deverá ser reportado como Relação Amilase/Creatinina (U/g) com o objetivo de compensar as variações da atividade de amilase em amostras obtidas em cada micção. As amostras de urina devem ser armazenadas entre 2-8°C. Não adicionar preservativo.

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) para coleta, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muitos maiores que erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitem infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las, devem-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Valores de bilirrubina até 10 mg/dL, hemoglobina até 200 mg/dL e triglicérides até 1800 mg/dL não interferem significativamente na reação.

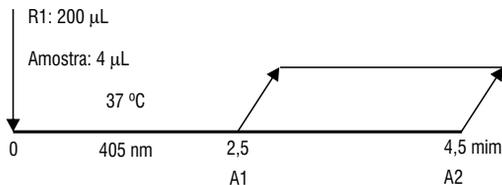
Medicamentos colinérgicos, narcóticos (morfina) e álcool produzem resultados falsamente elevados da amilase sérica.

A presença de macroamilase na amostra de soro, que é resultante da complexação da amilase com proteínas de elevado peso molecular, pode produzir resultados falsamente elevados na ausência da pancreatite. Nestes casos não se observa aumento de atividade da amilase na urina.

Procedimento

Parâmetros para analisadores automáticos

Parâmetros	Aplicação
Tipo de Reação	Cinética
Direção da Reação	Crescente
λ primário	405 nm
λ secundário	700 nm
Temperatura	37°C
Calibração	2 pontos Ponto 0: Branco (Água deionizada/Salina) Ponto 1: Calibrador 1
Modelo da Calibração*	Linear
Volume de Amostra**	4 µL
Volume de R1**	200 µL
Leitura 1 (Absorbância 1)	150 segundos após adição de R1 + amostra
Leitura 2 (Absorbância 2)	270 segundos após adição de R1 + amostra



*A definição de modelo de calibração deve ser adequada a cada modelo de equipamento. Em caso de dúvida entre em contato com o Serviço de Apoio ao Cliente Labtest.

**Os volumes de amostra e reagentes podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a medição fotométrica.

Procedimento manual

Condições ótimas de reação:

Comprimento de onda: 405 nm;
 Cubeta termostatizada a 37 ± 0,2°C com 1,0 cm de espessura de solução;
 Banda de passagem ≤ 2 nm;
 Luz espúria ≤ 0,1.

Quando são atendidas as condições ótimas de reação citadas acima, pode-se optar pela utilização do fator 6829.

Tomar 2 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Teste	Calibrador
Amostra	0,02 mL	----
Calibrador*	----	0,02 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL

*Aconselha-se utilização de calibrador Calibra H - Labtest.

1. Após a adição do reagente, homogeneizar e transferir imediatamente para a cubeta de reação termostatizada a 37 ± 0,2°C. Esperar 30 segundos.

2. Fazer a leitura da absorvância inicial (A1) em 405 nm disparando simultaneamente o cronômetro. Repetir a leitura após 2 minutos (A2).

Como ocorre em toda medição da atividade enzimática, a rigorosa observação do tempo e da temperatura de incubação é de grande importância para a qualidade dos resultados obtidos.

Para avaliar a linearidade da reação, registrar a absorvância com intervalos de 1 minuto e verificar se as diferenças de absorvância em cada minuto são equivalentes.

Caracterização de desempenho⁴

Exatidão . Em três amostras com valores de 182, 542 e 886 U/L foram adicionadas quantidades diferentes do analito obtendo-se recuperações entre 104,8 e 107,6%. O erro sistemático total médio obtido foi de 6,4%, o que atende a especificação desejável baseada nos componentes da Variação Biológica de erro total que é $\leq \pm 7,4\%^2$.

Estudos de comparação de métodos . O método proposto foi comparado com outro produto de metodologia semelhante, sendo obtidos os seguintes resultados:

	Método Comparativo	Amilase CNPG
Número de amostras	40	40
Intervalo de concentração (U/L)	30 - 999	33 - 1027
Equação da regressão	Método Labtest = 1,0104 x Método Comparativo - 1,80	
Coefficiente de correlação	0,996	

Utilizando a equação da regressão, o erro sistemático (bias) estimado é igual a 2,55% para uma amostra com atividade de amilase igual a 50 U/L, 0,46% para uma amostra com atividade de amilase igual a 120 U/L e 0,14% para uma amostra com atividade de amilase igual a 200 U/L. Esses erros são menores que o erro sistemático analítico da especificação desejável baseada na variação biológica que é $\leq \pm 7,4\%$.

Estudos de precisão . Os estudos de precisão foram realizados utilizando amostras com valores de atividade iguais a 52, 120 e 202 U/L.

Repetitividade - imprecisão intraensaio

	N	Média	DP (U/L)	CV (%)
Amostra 1	20	52	0,77	1,55
Amostra 2	20	120	1,60	1,09
Amostra 3	20	202	2,71	0,54

Reprodutibilidade - imprecisão total

	N	Média	DP (U/L)	CV (%)
Amostra 1	20	52	0,89	2,22
Amostra 2	20	120	1,68	1,83
Amostra 3	20	202	2,47	1,64

A imprecisão total obtida para as amostras atende a especificação desejável para imprecisão total baseada na variação biológica que é $\leq 4,4\%^6$.

O erro total (erro aleatório + erro sistemático) estimado em atividades de 50, 120 e 200 U/L são iguais a 6,22; 3,48 e 2,85%, respectivamente.

Os resultados indicam que o método atende a especificação desejável para o erro total ($\leq \pm 14,6\%$) baseada nos componentes desejável da Variação Biológica².

Sensibilidade metodológica . Uma amostra protéica contendo 47 U/L referente à atividade de amilase foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio tendo sido encontrado um valor igual a 2,4 U/L, equivalente a 3 vezes o desvio padrão de 20 replicatas da amostra.

Efeitos da diluição da matriz . Duas amostras com valores iguais a 1613 e 1629 U/L foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Utilizando fatores de diluição que variaram de 2 a 4 foram encontradas recuperações entre 105 e 114%. Os resultados indicam que o método atende a especificação desejável para o erro total ($\leq \pm 14,6\%$) baseada nos componentes desejável da Variação Biológica².

Significado clínico . A amilase sanguínea provém de duas fontes principais: pâncreas e glândulas salivares. Outras fontes potenciais de amilase sérica são os órgãos da reprodução e o fígado.

A elevação da amilase sérica não é um achado específico para pancreatite, pois níveis elevados são encontrados em infarto mesentérico, gravidez ectópica rota, uremia, colelitíase, parotidite epidêmica e em indivíduos portadores de macro-amilasemia. Nessa última condição a amilase não se encontra elevada na urina.

Medicamentos colinérgicos, narcóticos (morfina) e álcool produzem resultados falsamente elevados da amilase sérica.

A determinação da amilase sérica e urinária são os testes mais úteis para o diagnóstico da pancreatite e em muitos casos a relação entre as depurações de amilase e da creatinina pode ser útil no diagnóstico da pancreatite aguda. Neste caso o valor da relação se encontra entre 7,0 e 15,0%.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, a água deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências

- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981;27:493-501.
- Ricos C, Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. Disponível em: <http://westgard.com/biodatabase1.htm> (acesso em 24/01/2012).

3. Basques JC. Especificações da Qualidade Analítica. Labtest Diagnóstica 2005.

4. Labtest: Dados de arquivo.

5. Genzyme Diagnostics. α -Amylase Teste Reagent, 1996.

6. Kaufman RA, Tietz NW. Clin Chem 1980;26:846-53.

7. Pesce AJ Kaplan LA. Methods in Clinical Chemistry, St, Louis: The C.V. Mosby Co., 1987;817-830.

8. Roseblum JL. Clin Chem 1992;38:920.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Amilase CNPG Liquiform	142-2/30	 2 x 30 mL
Amilase CNPG Liquiform Labmax 560/400	142-4/33	 4 x 33 mL

Estão disponíveis aplicações **para sistemas automáticos e semiautomáticos**.

O número de testes em aplicações para sistemas automáticos **depende dos parâmetros de programação**.

Algumas apresentações podem ser disponibilizadas mediante consulta.

Informações ao consumidor

[Termos e condições de garantia]

A **Labtest Diagnóstica** garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296 / 0001 - 38

Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP 33240-152

Lagoa Santa - Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br

Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

Edição: Novembro, 1996

Revisão: Abril, 2013

Ref.: 280122(01)

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.

Reprodução sob prévia autorização

Símbolos utilizados com produtos diagnósticos in vitro

Símbolos usados con productos diagnósticos in vitro

Symbols used with ivd devices

	Conteúdo suficiente para < n > testes Contenido suficiente para < n > tests Contains sufficient for < n > tests		Risco biológico Riesgo biológico Biological risk
	Data limite de utilização (aaaa-mm-dd ou mm/aaaa) Estable hasta (aaaa-mm-dd o mm/aaaa) Use by (yyyy-mm-dd or mm/yyyy)		Marca CE Marcado CE CE Mark
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Tóxico Tóxico Poison
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Reagente Reactivo Reagent
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limitation (store at)		Fabricado por Elaborado por Manufactured by
	Representante Autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community		Número do lote Denominación de lote Batch code
	Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use		Controle Control Control
	Número do catálogo Número de catálogo Catalog Number		Controle negativo Control negativo Negative control
	Adições ou alterações significativas Cambios o suplementos significativos Significant additions or changes		Controle positivo Control positivo Positive control
	Produto diagnóstico in vitro Dispositivo de diagnóstico in vitro In vitro diagnostic device		Controle Control Control
	Liofilizado Liofilizado Lyophilized		Corrosivo Corrosivo Corrosive
	Período após abertura Período post-abertura Period after-opening		Uso veterinário Uso veterinario Veterinary use
	Instalar até Instalar hasta Install before		

Ref.: 140214 |