



## QUIMIAMIL - AMILASE Substrato Direto

### Finalidade:

Reação cinética para determinação quantitativa de amilase em amostras de soro, plasma e urina humanos. Somente para uso diagnóstico "in vitro".

### Princípio:

A  $\alpha$ -amilase cataliza a hidrólise de 2-cloro-4-nitrofenil-maltotriósido (CNP-G3) a 2-cloro-4-nitrofenol (CNP). A concentração catalítica determina-se a partir da velocidade de formação do 2-cloro-4-nitrofenol, medido a 405nm.

$\alpha$  - amilase

CNP -- G3 -----> CNP + maltotriosa

### Metodologia:

Substrato Direto

### Significado Clínico:

A alfa-amilase é derivada principalmente das glândulas salivares e do pâncreas exócrino. A enzima é uma molécula relativamente pequena que é rapidamente filtrada pelos rins e excretada na urina. A alfa-amilase é mais frequentemente medida no diagnóstico de pancreatite aguda quando níveis no soro podem estar grosseiramente elevados. Na pancreatite aguda a alfa-amilase começa a aumentar aproximadamente 4 horas após o início da dor, atingindo picos em 24 horas e permanecendo elevados de 3 - 7 dias.

Hiperamilasemia está também associada com outras desordens como insuficiência renal, abdominais agudas, tumor nos pulmões e ovários, doenças do trato biliar, cetoacidose diabética, disfunção glomerular severa, desordens da glândula salivar, ruptura de gravidez ectópica e macroamilasemia.

O diagnóstico clínico não deve ser realizado com o resultado de somente um teste, mas deve integrar-se nos dados clínicos e de laboratório.

### Reagentes:

Reagente único, pronto para uso e sensível a luz. Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: MÉS 50mmol/L, cloreto de cálcio 5 mmol/L, cloreto de sódio 300 mmol/L, tiocianato de sódio 450 mmol/L, CNP-G3 2,25 mmol/L, pH 6, 1

O reagente não aberto é estável até a data de vencimento impressa no rótulo do produto, e on board (no compartimento refrigerado do analisador) possui estabilidade de aproximadamente 30 dias, durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

### Precauções e Cuidados Requeridos:

Este reagente deve ser usado somente para diagnóstico "in vitro". O reagente é sensível a luz, portanto deve ser armazenado em ambiente escuro.

Pipetar com a boca, soprar no reagente, usar material contaminado com saliva e conversar junto ao frasco destampado, são ações que podem contaminar o reagente com quantidade microscópicas de saliva, capazes de deteriorar irremediavelmente o reagente. Evitar contato com a pele e roupa. No caso de contato com os olhos, lavar com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

Deve-se monitorar a temperatura do ambiente de trabalho bem como o tempo de reação para obtenção de resultados corretos. Indicação de deterioração do reagente: presença de partículas, turvação, absorvância do branco superior a 0,500 quando medido a 405 nm (cuveta de 1cm).

### Material Necessário não Fornecido:

- Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorvância de 405nm.
- Pipetas para medição de amostras e reagente.
- Consumíveis do analisador quando usado.
- Calibrador e Soros Controle
- Medidor de tempo.

### Amostra:

Soro ou plasma heparinizado: A amilase na amostra é estável por 7 dias em temperatura ambiente e 1 mês entre 2 - 8°C.

Urina: Amostras de urina são estáveis por 7 dias quando armazenadas a 2 - 8°C, sendo necessário ajustar o pH a 7 (com NaOH), dado que o pH ácido inativa a enzima irreversivelmente. Todas as amostras são consideradas potencialmente infantecentes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

### Preparo do Paciente:

Soro: É recomendado um jejum de 4 horas.

Urina: Deve-se seguir o procedimento operacional padrão do laboratório para colheita, preparação e armazenamento da amostra. Todavia, poderá ser modificado segundo orientação médica.

### Interferências:

Amostras hemolisadas não devem ser usadas uma vez que os eritrócitos contêm contaminantes e enzimas, os quais irão interferir no teste.

Bilirrubina até 20 mg/dL e Triglicérides até 10 g/L não interferem significativamente no resultado. A Hemoglobina (2,5 g/L) interfere. Amostras com citrato, EDTA ou oxalato não devem ser usadas porque produzem resultados falsamente diminuídos. Algumas drogas e substâncias afetam a concentração da Amilase, sugerimos consultar Young et al.

### Parâmetros do Sistema:

Temperatura: 37°C  
Comprimento de Onda: 405 nm  
Tipo de Reação: Cinética  
Direção: Crescente  
Relação Amostra/Reativo: 1: 50  
Vol. Amostra: 20  $\mu$ L  
Vol. Reagente: 1,0 mL  
Tempo de Incubação: 1 minuto (retardo)  
Intervalo de leitura: 1 minuto  
Número de intervalos: 3

### Calibração:

Utilizar Quimicalib Ebram cód.7023/12023 que possui a concentração rastreável ao método de referência proposto pelo CLSI, ou realizar a calibração através de fatoração, obtida através da absorção média milimolar do CNP a 405 nm (15.490) sob condições específicas.

### Procedimento Automatizado:

Aplicação no sistema automatizado: vide manual para utilização do equipamento e instruções de uso do reagente.

Aplicação no sistema semi-automático: proceder como demonstrado a seguir no procedimento manual somente até o item 1 (preparação dos tubos), em seguida utilizar o equipamento para leitura, seguindo protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema.

Nota: Adicionar as amostras no tubo somente no momento que antecede a aspiração do equipamento.

### Procedimento Manual:

- Separar 3 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

	Branco	Calib.	Amostra/S.C.
Água destilada	20 $\mu$ L	-	-
Calibrador	-	20 $\mu$ L	-
Amostra/S.C.	-	-	20 $\mu$ L
Reagente	1,0mL	1,0 mL	1,0 mL

Nota: Realizar a incubação das amostras, calibrador e soro controle (S.C.) individualmente.

2. Adicionar 1,0 mL do reagente em dois tubos e adicionar 20 $\mu$ L do calibrador e 20 $\mu$ L de água destilada em cada tubo, deixar em banho - maria (BM) a 37°C por 1 minutos. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio.

4. Zerar o espectrofotômetro a 405nm com o tubo do branco.

5. Inserir no equipamento o tubo com o calibrador e registrar as absorvâncias A1, A2, A3, considerando A1 a primeira leitura (logo após o 1 minuto de incubação) e as seguintes com 1 minutos de intervalo.

6. Determinar as duas diferenças de absorvância/min ( $\Delta$  Abs/min), subtraindo cada leitura de sua anterior.

7. Determinar a média das diferenças de absorvância ( $\Delta$  Abs/min). Proceder em seguida do mesmo modo com os controles e todas as amostras.

Obs.: Procedimento sugerido para espectrofotômetros que requerem volume mínimo de 1,0 mL e podem ser ajustados proporcionalmente sem influência no desempenho do teste. Salientamos que volumes de amostra menores do que 10  $\mu$ L aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

### Cálculos:

(Abs.=Absorvância)  
(Conc. = Concentração)  
 $\Delta$  Abs. /min = (A2 - A1) + (A3 - A2) / 2  
Amilase da  $\Delta$  Abs /min (amostra) Conc. Do  
Amostra (U/L) = ----- x Calib (U/L)  
 $\Delta$  Abs /min (Calib)

Cálculo para Urina 24 horas:

Urina: Amilase amostra (U/L) x fator de diluição x volume (L)

### Exemplo:

Absorvancia com o Calibrador  
A1 = 0,078 / A2 = 0,098 / A3 = 0,118  
Média  $\Delta$  Abs/min = (0,098-0,078) + (0,118-0,098)

-----  
2  
Média  $\Delta$  Abs/min (calib) = 0,02  
Média  $\Delta$  Abs/min (amostra) = 0,024 (calc. Idem acima)  
Concentração do Calibrador = 291 U/L  
Volume Urinário= 0,950L

Amilase na amostra = (0,024 / 0,020) 291  
Amilase na amostra= 349 U/L

Calculo para Urina 24horas  
Amilase na Urina= 349 x 1 x 0,95  
Amilase na Urina= 331 U/24hs  
Obs:  $\mu$ kat/L = U/L x 0,01667

### Linearidade:

Quando executado de acordo com o recomendado, o teste é linear até 1317 U/L. Amostras com valores superiores devem ser diluídas com água destilada a ponto de ficarem abaixo da linearidade e os resultados devem ser multiplicados pelo fator de diluição.

### Controle de Qualidade:

Cada laboratório deve manter um programa interno de qualidade que defina objetivos, procedimentos, normas, limites de tolerância e ações corretivas. Deve-se manter também um sistema definido para se monitorar a variação analítica do sistema de medição. Aconselhamos o uso dos soros controle Quimicontrol Normal e Quimicontrol Anormal Ebram Cód. 7024/12024 e 7031/12031.

### Valores Esperados:

Os seguintes valores são baseados nas medições desempenhadas a 37°C.

Soro ou plasma: 22 - 80 U/L

Urina: < 321 U/L

Estes valores são dados unicamente como título orientativo. É recomendado que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

### Estudos Comparativos:

Estudos executados entre este procedimento e uma metodologia similar produziram os seguintes resultados:

Número de Amostras:	30
Intervalo dos resultados	4 - 1101 ( U/L)
Coefficiente de Correlação:	0,999
Inclinação:	0,945
Intercepta:	3,4 (U/L)

### Precisão:

Estudos de precisão foram executados com dois níveis (normal e patológico) sendo que cada amostra fora processada por 20 vezes e os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=20	Nível 1	Nível 2
Média (U/L)	64	338
C.V. (%)	1,8	0,5

### Exatidão:

Estudos de precisão foram executados com dois níveis (normal e patológico) sendo que cada amostra fora processada por 25 vezes e os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=25	Nível 1	Nível 2
Média (U/L)	64	338
C.V. (%)	3,5	1,0

### Sensibilidade Metodológica:

1,8 U/L

### Especificidade:

Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

### Observações:

- A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade  $\geq$  1 mega ohm ou condutividade  $\leq$  1 microsiemens e concentração de silicatos < 0,1 mg/L (água tipo II). Para o enxágue da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade  $\geq$  0,1 megaohms ou condutividade  $\leq$  10 microsiemens. No enxágue final utilizar água tipo II.

### Apresentação:

Linha Bioquímica Geral: 6 x 10 mL

Linha Bulk: 1 x 200mL

Linha SAT: 2 x 45mL

Para mais informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM - tel. (011) 2291-2811, sac@ebram.com ou www.ebram.com

### Referência Bibliográfica:

- Winn-Deen ES, David H, Sigler G and Chavez R. Development of a direct assay for  $\alpha$ -amylase. Clin Chem 1988; 34:2008-2008
- Gella FJ, Gubem G, Vidal R, Canalias F. Determination of total and pancreatic  $\alpha$ -amylase in human serum with 2 choro-4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotriose as substrate. Clin Chim Acta 1997; 259: 147-160
- Gubem G, Balsells D, Ferragut R, Galán A, Gella FJ, et al. Procedimiento recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de  $\alpha$ -amilasa en suero sanguíneo humano. Quim Clin 1996; 15: 51-52
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co., 1999.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratoru testes, 3th ed. AACC press, 1997.



### APLICAÇÃO PARA COBAS MIRA

<b>GENERAL</b>	
Measurement Mode:	ABSORB
Reaction Mode:	R-S
Calibration Mode:	Calib (Slope AVG)
Reagent Blank:	REAG/DIL
Cleaner:	NO
Wavelength:	405nm
Decimal Position:	2
Unit:	U/L
<b>ANALYSIS</b>	
Dilution Name: H2O	STD
Factor:	Main STD
Time:	Sample Dil Name:
Post Dil Factor: 2.00	Conc. Factor: NO
Sample:	Circle: 5
Volume:	Dil: 20.0ul
Reagent:	Circle: 1
Volume:	
Start Reagent 1:	Circle:
Volume:	Dil:
Start Reagent 2:	Circle:
Volume:	Dil:
<b>CALCULATION</b>	
Sample Limit:	NO
Point:	INCREASE
Reaction Direction:	
Check:	ON
Conversion Factor:	1.00000
Offset:	0.00000
Test Range Low:	0.00
High:	1300
Norm Range Low:	0.00
High:	60.00
Number of Slats:	1
Calculation Step A:	KINSEARCH
Readings First:	6
Last:	13
Reaction Limit:	NO
Point:	
Calib Interval:	ON REQUEST
<b>CALIBRATION</b>	
Reagent Blank:	
Reagent Range:	
Reagent Range Low: NO	Blank Range Low: -0.0200
High: NO	High: 0.0200
Factor:	
Calibrator Pos:	(*)
STD1:	(**)
STD2:	STD2:
STD5:	STD6:
STD7:	STD8:
Calc Model:	
Correction STD:	
Replicate:	
Deviation:	
<b>CONTROL</b>	
CS1 - Pos(*) Assay(**) Low(**)	
CS2 - Pos(*) Assay(**) Low(**)	
CS3 - Pos(*) Assay(**) Low(**)	

(\*) colocar a posição correspondente do controle do Rack CAL/CS  
 (\*\*) colocar o valor correspondente do calibrador  
 (\*\*\*) colocar o valor correspondente do soro controle

### APLICAÇÃO PARA EXPRESS 550

Test Name: AMIL	Test: AMIL			
Test Bar Code:				
Test Type: KINETIC	Curve Type: ENZYME LINEAR			
Units: U/L	Nº of Decimal Places: 0			
Primary Wavelength: 405	Secondary Wavelength: 600			
Read Time Interval: 60	Sample Blank: NO			
Factor:				
Calibration Interval: (*)				
Normalization Interval: (*)				
Nº of Calibrators: 2	Nº of Replicates: 2			
Low Blank A Limit: -0.010	High Blank A Limit: 0.500			
Low A Limit: -0.010	High A Limit: 2.000			
Low Normal: 22	High Normal: 60			
Linearity Limit: 1300	Curve S.D Limit: 3.00			
Test Name: AMIL	Test: AMIL			
Test Bar Code:				
Sample Volume: 5 ul	Sample Diluent:			
Reagent Dilution Ratio: 2	Predilution Ratio: 1			
Reagent Dilution:				
Reagent 1	Reagent Volume	Bar Code	Diluent Volume	Lag Time
Reagent 2	250	YC1A	-	60 sec
Reagent 3				
Reagent 4				
Controls:				

(\*) Introduzido pelo operador ( 1 - 999)

Ebram Prods.Laboratoriais Ltda.  
 Rua Júlio de Castilhos, nº 500 - Belenzinho  
 São Paulo - SP - Cep: 03059-001  
 Tel.: (11) 2291-2811  
 Indústria Brasileira  
 CNPJ.: 50.657.402/0001-31  
 www.ebram.com  
 sac@ebram.com  
 SAC.: (11) 2291-2811  
 Resp.Téc.: Nadjara Novaes Longen  
 CRF-SP - 37.451  
 Nº do Reg. MS: 10159820166  
 Edição: Abr/2019

### APLICAÇÃO PARA SELECTRA

Name:	AMILASE
Abbr Name:	AMI
Mode:	KINETIC
Wavelength:	405nm
Units:	U/L
Decimals:	0
Low Conc:	0.000
High Conc:	1300
Calibrator Name:	(*)
Repeat:	2
Number:	1
Concentration:	(**)
Interval:	(*)
Cut off:	NO
Prozone Check:	NO
Ref Male Low:	(*)
Ref Male High:	(*)
Ref Female Low:	(*)
Ref Female High:	(*)
Ref Pad Low:	(*)
Ref Pad High:	(*)
Control 1:	
Control 2:	
Control 3:	
Comet Factor:	1.000
Comet Offset:	0.000 U/L
<b>DUAL MODE</b>	
Name:	AMILASE
Sample Blank:	NO
R1 Bottle:	25 ml
Normal Volume:	250 ul
Run Volume:	253 ul
<b>SAMPLE</b>	
Normal Volume:	5 ul
Run Volume:	3 ul
R2 Bottle:	5 ml
Normal Volume:	0 ul
Run Volume:	0 ul
Predilution:	NO
Slope Blank:	NO
Delay Min Time:	77.230
Linearity Limit:	15.0%
Point One, Two:	
Incubation Time:	
Low Absorbance:	-0.100
High Absorbance:	3.000
R ABS L Limit:	-0.100
R ABS H Limit:	1.000
Substr Depletion:	
Reagent Blank:	3.000
R ABS Deviation:	yes (***)
Cal Low Limit:	
Cal High Limit:	
Factor:	(***)
<b>MONO MODE</b>	
Name:	AMILASE
Sample Blank:	NO
R1 Bottle:	25 ml
Normal Volume:	250 ul
Run Volume:	253 ul
<b>SAMPLE</b>	
Normal Volume:	5 ul
Run Volume:	3 ul
Delay Min Time:	70.188
Linearity Limit:	15.0%
Predilution:	
Incubation Time:	
Point One, Two:	
Low Absorbance:	-0.100
High Absorbance:	3.000
R ABS L Limit:	-0.100
R ABS H Limit:	1.000
Substr Depletion:	
R ABS Deviation:	3.000
Reagent Blank:	YES (*8*)
Cal Low Limit:	(*)
Cal High Limit:	(*)
Factor:	(***)
(*)	Introduzido pelo operador
(**)	Colocar valor correspondente do calibrador
(***)	Dados calculados pelo analisador
(#)	

### APLICAÇÃO PARA BTR 810

Name:	AMIL
Point Final:	U/L
Units:	CINETICO
Mode Label:	405
Filter:	
Tempo Estab:	
Factor:	
Tempo de Incubação:	60
Tempo de Intercalação:	30
Nº de Intercalações:	3
Temperatura:	37°C
Volume Amostra:	0.000
Tempo Reação:	CRESCENTE
Estandart:	(**)

### APLICAÇÃO PARA QUICK LAB

Mode:	CINETICA
Label:	MONOCROM
Filter:	405
Temperatura:	37°C
Volume Amc:	400
Unidade:	U/L
Limite Lin:	1300
Inclinação:	CRESCENTE
Cálculo:	PADRAO
Padão:	(**)
Factor:	
Delay Inicial:	60
Quant Interc:	2
Tempo Interc:	30
Tempo Estab:	

### APLICAÇÃO PARA BIO 2000

Mode:	CIN
WL1:	405
Blank:	
Blk Amoa Pad:	
Tempo:	37°C
Vol Amostr:	0.000
Rel:	0.00
Pad:	
Padão:	SIM
Pad:	UNICA
Pad:	(**)
Unit:	U/L
Dec:	0
Int Cn:	0.00
nº Int:	3
dAMIN:	0.380
%Lim Lin:	10
Dir:	INCR
Lim Lin - Min/Max:	
Abs Real - Min/Max:	0.000
Abs Pad - Min/Max:	1.000
Vol/Vn - Min/Max:	22 / 80

### APLICAÇÃO PARA RA-XT

Name:	AMI
Immunosay:	NO
Chemistry Type:	ZERO ORDER
Biotype:	
Immuno Chemistry:	NO
% Sample Volume:	14 (Tot.)
Wavelength:	405 nm
Biochemical Chemistry:	
Biochemical Factor:	NO
K1:	
K2:	
Bio Limit 1:	
Bio Limit 2:	
Detection Limit:	
Delay Time:	1.00
Blank Type:	NO BLANK
Incubation:	
% Reagent Volume:	70 (350ul)
2nd Reagent:	0 (No)
2nd Reagent Volume:	
A2 Delay:	
Units:	3 (U/L)
Unit Factor:	1
Decimal Point:	0
RBL Low:	0.0000
RBL High:	0.700
Range Low:	0
Range High:	1300
Calibration Factor:	(*)
Reagent Rate:	0.0
Standard Value:	(**)
Normal Low:	22
Normal High:	60
Slope:	1
Intercept:	0
C1*10E-6:	0.0
C2*10E-6:	88989.01
D1*10E-6:	120.00
Delta R:	0.050
Linear Factor:	
Final Limit:	
Endpoint Limit:	
(*)	Colocar 1 como valor inicial. O valor CAL FACT é determinado pelo analisador
(**)	Colocar a concentração do calibrador

### APLICAÇÃO PARA AIRONE

Measure Unit:	U/L	Decimals:	0	Reaction Type:	KINETIC
Volume (ul):	5	Reagent:	8	Plasma:	8
		Reagent 1:	400	Reagent 2:	0
Abs Range (m Abs):	Min: 0	Max:	2000		
Linearity Limit:	1300	Reagent Blank:	NO		
Contaminating:	NO	Differential:	NO		
Filter 1:	405	Filter 2:	NONE		
Time (sec):	Mix 1: 2.00	Incubation 1:	60	Lag Phase:	20
	Mix 2: 0.00	Incubation 2:	0	Measure:	30
Measurement Type:	STANDARD	Factor:	0.00		
Normal Range					
		Homens		Mulheres	
Age (yrs)	Min.	Max.	Min.	Max.	
Below 10:	0.00		0.00		
From 10 to 60:	22.00	80.00	22.00	80.00	
Over:	0.00		0.00		

Disponos de programações para outros analisadores. Para solicitações entre em contato com SAC EBRAM.