



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 α -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.

α - amilase

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

Metodologia:

Substrato Direto

Significado Clínico:

A α -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 α -amilase é mais freqüentemente medida no diagnóstico de pancreatite aguda quando níveis no soro podem estar grosseiramente elevados. Na pancreatite aguda a α -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) possuem 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.

O reagente contém azida sódica como conservante (0,1%). Este componente pode reagir com cobre e chumbo podendo tornar-se um metal explosivo. Ao descartá-lo, adicionar grande quantidade de água.

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:

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorvância de 405nm.
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Consumíveis do analisador quando usado.
4. Calibrador e Soros Controle
5. 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 infectantes, 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 μ 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:

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

	Branco	Calib.	Amostra/S.C.
Água destilada	20 μ L	-	-
Calibrador	-	20 μ L	-
Amostra/S.C.	-	-	20 μ 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 tubo e adicionar 20 μ L do calibrador e 20 μ 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 (Δ Abs/min), subtraindo cada leitura de sua anterior.
7. Determinar a média das diferenças de absorvância (Δ 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 μ L aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

Cálculos:

(Abs. = Absorvância)
(Conc. = Concentração)
 Δ Abs. /min = (A2 - A1) + (A3 - A2) / 2

CKNAC da Δ Abs /min (amostra) Conc. Do
Amostra (U/L) = ----- x Calib (U/L)
 Δ Abs /min (Calib)

Calculo 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 Δ Abs/min = (0,098-0,078) + (0,118-0,098)

2

Média Δ Abs/min (calib) = 0,02

Média Δ 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 24 horas
Amilase na Urina= 349 x 1 x 0,95
Amilase na Urina= 331 U/24hs

Obs: μ 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:

1. A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. 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 enxágüe da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade \geq 0,1 megaohms ou condutividade \leq 10 microsiemens. No enxágüe final utilizar água tipo II.

Apresentação:

Linha Bioquímica Geral: 6 x 10 mL

Linha Hitachi 917 / Advia: 2 x 65mL

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:

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



APLICAÇÃO PARA COBAS MIRA

GENERAL	
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
ANALYSIS	
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:	200ul
Start Reagent 1:	Circle:
Volume:	Dil:
Start Reagent 2:	Circle:
Volume:	Dil:
CALCULATION	
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
CALIBRATION	
Reagent Blank:	
Reagent Range:	
Reagent Range Low: NO	Blank Range Low: -0.0200
High: NO	High: 0.0200
Factor:	
Calibrator Pos:	(*)
STD1:	(**)
STD2:	STD2:
STD3:	STD4:
STD5:	STD6:
STD7:	STD8:
Calc Model:	
Correction STD:	
Replicate:	
Deviation:	
CONTROL	
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/2018

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:	
Comelat Factor:	1.000
Comelat Offset:	0.000 U/L
DUAL MODE	
Name:	AMILASE
Sample Blank:	NO
R1 Bottle:	25 ml
Normal Volume:	250 ul
Runn Volume:	253 ul
SAMPLE	
Normal Volume:	5 ul
Runn Volume:	3 ul
R2 Bottle:	5 ml
Normal Volume:	0 ul
Runn 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:	(***)
MONO MODE	
Name:	AMILASE
Sample Blank:	NO
R1 Bottle:	25 ml
Normal Volume:	250 ul
Runn Volume:	253 ul
SAMPLE	
Normal Volume:	5 ul
Runn 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 Amostrado:	0.000
Tipo Reação:	CRESCENTE
Estandart:	(**)

APLICAÇÃO PARA QUICK LAB

Mode:	CINETICA
Label:	MONOCROM
Filter:	405
Temperature:	37°C
Volume Ass:	400
Units:	U/L
Linearity Lin:	1300
Inclinação:	CRESCENTE
Cálculo:	PADRAO
Padrão:	(**)
Factor:	
Delay Initial:	60
Quant Intery:	2
Tempo Intery:	30
Tempo Estab:	

APLICAÇÃO PARA BIO 2000

Mode:	CIN
WL1:	405
Blank:	
Blk Area Pad:	
Temp:	37°C
Vol Assair:	0.000
Ref:	0.00
Path:	
Padrão:	SIM
Path:	UNICA
Path:	(**)
Unit:	U/L
Dec:	0
Int Cln:	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:	
Immune 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:	
Endoint 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 (µl):	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.