



QUIMIAMIL II - Amilase II Substrato Bloqueado(PNP)

Finalidade:

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

Princípio:

O reagente EBRAM utiliza Etíleno-pNP-G7 (E-pNP-G7) como substrato. O uso da etíleno previne exo-enzimas na quebra do substrato, assim, na ausência de alfa-amilase, a mudança de cor não é observada. O substrato é também comumente referido como EPS. Uma vez que o substrato tenha sido quebrado pela alfa-amilase, os menores fragmentos produzidos podem reagir sobre a Alfa-glicosidase, o qual causa a revelação do cromóforo.

Metodologia:

Substrato Bloqueado - PNP

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. Hipramilasemia está também associada com outras desordens abdominais agudas, doenças do trato biliar, cetoadicose diabética, disfunção glomerular severa, desordens da glândula salivar, ruptura de gravidez ectópica e macroamilasemia.

Reagentes:

Reagente único, pó.

O reagente não reconstituído é estável até a data de vencimento impressa no rótulo do produto. Conservar entre 2 - 8°C. Contém: Etíleno-pNP-G7 (E-pNP-G7) 1.1 mmol/L; Alfa-Glicosidase (microbial) > 1000 U/L; Cloreto de Sódio (NaCl) 51 mmol/L, Tampões e Estabilizantes; pH 7.0 ± 0.2

PREPARO:

Reconstituir cada frasco do reagente de Amilase com volume da água destilada especificada na etiqueta do frasco (10mL). Aguardar 10 minutos e homogeneizar gentilmente até completa dissolução do pó. Não agitar. O reagente reconstituído é estável por 4 dias se armazenado entre 2-8°C.

Obs.: O código de barra é exclusivo para os equipamentos Express 550/Plus.

Precauções e Cuidados Requeridos:

Este reagente deve ser usado somente para diagnóstico "in vitro". 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. Não usar se a absorbância do branco ultrapassar 0,600 quando medido a 405 nm, se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco ou se houver formação de grumos o que representa penetração de umidade.

Material Necessário não Fornecido:

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorbância de 405 - 420nm.
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Água destilada/deionizada.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. Soros Controle.
6. Medidor de tempo.

Amostra:

Soro ou plasma heparinizado: A amilase na amostra é estável por 7 dias em temperatura ambiente e 2 meses 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 segundo 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 25.8 mg/dL, Triglicérides até 936 mg/dL, Hemoglobina 200mg/dL não interferem significativamente no resultado.

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 - 420nm

Tipo de Reação: Cinética

Direção: Crescente

Relação Amostra/Reativo: 1: 40

Vol. Amostra: 25 µL

Vol. Reagente: 1.0 mL

Tempo de Incubação: 1 minuto (retardo)

Intervalo de leitura: 1minutos

Número de intervalos: 2 a 3

Calibração:

A calibração deste ensaio é efetuada através de fatoração, obtida através da absorção média milimolar do pNP a 405 nm sobre condições específicas. Os resultados das amostras estão baseadas na variação de absorbância por minuto, portanto todos os parâmetros devem ser conhecidos e controlados.

Procedimento Automatizado:

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

Aplicação no sistema semi-automático: Em um tubo de ensaio acrescentar 1,0 mL de reagente, adicionar 25 µL de amostras/soro controle. Ler imediatamente no equipamento, preparar também um tubo contendo pelo menos 0,50 mL de reagente (os equipamentos no início do procedimento, solicitam que seja introduzido o reagente para verificação da absorbância do reagente), seguir protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema. Pode-se utilizar o fator de calibração enunciado para o procedimento manual, pequenos ajustes podem ser necessários.

Procedimento Manual:

1. Em 1 tubo de ensaio acrescentar 1 mL de reagente e pré aquecê-lo por 1 minuto em banho - maria (BM) a 37°C. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio.
2. Zerar o espectrofotômetro a 405 nm com água destilada.
3. Cuidadosamente, adicionar 25µL do soro controle/amostra no tubo correspondente, homogeneizar e deixar em BM a 37°C.

Acionar o cronômetro.

4. Registrar as absorbâncias A1, A2 e A3 quando completar 1, 2 e 3 minutos respectivamente.

5. Determinar as duas diferenças de absorbância/min ($\Delta \text{Abs}/\text{min}$), subtraindo cada leitura de sua anterior.

6. Determinar a média das diferenças de absorbância ($\Delta \text{Abs}/\text{min}$). Proceder em seguida do mesmo modo com todas as amostras.

Nota: Realizar a incubação das amostras e soro controle individualmente.

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 µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

Cálculos:

$$\text{Média } \Delta \text{ Abs}/\text{min} = (\text{A2}-\text{A1}) + (\text{A3}-\text{A2})$$

$$-----^2$$

$$\text{Amilase Amostra U/L} = \text{Média } \Delta \text{ Abs}/\text{min} \times \text{Fator}$$

Fator = 6696

Calculo para Urina 24 horas:

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

Exemplo:

$$\text{A1} = 0,078 / \quad \text{A2} = 0,098 / \quad \text{A3} = 0,118$$

Fator = 6696

Volume Urinário= 0,950L

$$\text{Média } \Delta \text{ Abs}/\text{min} = (0,098 - 0,078) + (0,118 - 0,098)$$

$$-----^2$$

$$\text{Média } \Delta \text{ Abs}/\text{min} = 0,02$$

Amilase Amostra = Média $\Delta \text{ Abs}/\text{min} \times 6696$

Amilase Amostra = 0,02 x 6696

Amilase Amostra = 134 U/L

Amilase na Urina= 134 x 1 x 0.95

Amilase na Urina= 127,3 U/24hs

Obs: $\mu\text{kat}/\text{L} = \text{U/L} \times 0,01667$

Linearidade:

Quando executado de acordo com o recomendado, o teste é linear até 2000 U/L.

Amostras com valores superiores a 2000 U/L devem ser diluídas com solução salina a ponto de ficarem entre 0 - 2000 U/L 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: 25 - 125 U/L

Urina: 1 - 17 U/hora

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)
Coeficiente 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 10 vezes e os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=10	Nível 1	Nível 2
Média (U/L)	23,7	419,8
D.P. (U/L)	0,8	2,8
C.V. (%)	3,3	0,7

Sensibilidade Metodológica:

4,653 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 ≥ 1 mega ohm ou condutividade ≤ 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 ≤ 10 microsiemens. No enxágüe final utilizar água tipo II.

Apresentação:

Linha Automação: 12 x 10mL - Cód.7033
Linha Hitch-line: 12 x 10mL - Cód.4033
Linha Econômica: 3 x 10mL - Cód.2033

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. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Edition, Philadelphia (PA), W.B. Saunders.p.854-861 (1994)
2. Young, D.S., et al, Clin. Chem, 21:1D (1975)
3. Expert Panel of Enzymes of the International Federation of Clinical Chemistry, Clin. Chem. 24:497-510 (1986)
4. Kaplan, L.A. and Pesce, J.J., Clinical Chemistry: Theory, analysis, and correlation, 3rd Edition, St. Louis (MO), Mosby, p. 567-568 (1996)
5. Miller,O.,Gonçalves,R.R.,Laboratório para o Clínico, 8 ed.,Atheneu,(1998).
6. Arquivos da EBRAM



APLICAÇÃO PARA COBAS MIRA

GENERAL	
Measurement Mode:	ABSORB
Reaction Mode:	R-S
Calibration Mode:	Factor
Reagent Blank:	Reao/Dil
Cleaner:	Bafre
Wavelength:	405 nm
Decimal Position:	0
Unit:	U/L
ANALYSIS	
Dilution Name:	STD
Factor:	Main STD:
Time:	Samola Dil Name: H2O
Post Dil Factor:	2.00
Sample:	Cycle: 1
Volume:	5ul
Reagent:	Cycle: 1
Volume:	175ul
Start Reagent 1:	Cycle:
Volume:	Dil:
Start Reagent 2:	Cycle:
Volume:	Dil:
CALCULATION	
Sample Limit:	0.7000
Point:	T1
Reaction Direction:	Increase
Check:	On
Conversion Factor:	1.00000
Offset:	0.00000
Test Range Low:	0
High:	2000
Norm Range Low:	25
High:	125
Number of Steps:	1
Calculation Step A:	Kinsearch
Readings First:	2
Last:	7
Reaction Limit:	No
Point:	
Calib. interval:	On Request
CALIBRATION	
Reagent Blank:	
Reagent Range:	
Reagent Range Low:	-0.0100
High:	0.4000
Factor:	11591
Calibrator Pos:	
STD1:	STD2:
STD3:	STD4:
STD5:	STD6:
STD7:	STD8:
Calc Model:	
Correction STD:	
Replicate:	
Deviation:	
CONTROL	
CS1 - Pos (*) Assion (**) Low (**) High (**)	
CS2 - Pos (*) Assion (**) Low (**) High (**)	
CS3 - Pos (*) Assion (**) Low (**) High (**)	

(*) colocar a posição correspondente do Rack CAL/CS

(**) colocar o valor correspondente do soro controle

(***)

APLICAÇÃO PARA EXPRESS 550

Test Name: Amilase	Test: AMI
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: 40	Samola Blank: No
Factor: 6896	
Calibration interval: 999	
Normalization interval:	
Nº of Calibrators: 1	Nº of Replicates: 2
Low Blank A Limit: -0.010	High Blank A Limit: 1.125
Low A Limit: -0.010	High A Limit: 2.000
Low Normal: 25	High Normal: 125
Linearity Limit: 2000	Curve S.D Limit: 3.0
Test Name: Amilase	Test: AMI
Sample Volume: 7ul	Sample Diluent:
Reagent Dilution: 2	Pradilution Ratio: 1
Reagent 1	Reagent Volume
Reagent 2	Bar Code
Reagent 3	Diluent Volume
Reagent 4	Lag Time
Controls:	

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 CRM- 37.451

Nº do Reg. MS: 10159820084

Edição: ago/10

APLICAÇÃO PARA SELECTRA

Name:	Amilase
Abbr Name:	AMI
Mode:	Kinetic
Wavelength:	405 nm
Units:	U/L
Decimals:	0
Low Conc:	0
High Conc:	2000
Calibrator Name:	-
Repeat:	
Number:	
Concentration:	
Interval:	
Cut off:	

Prozone Check:	NO
Ref Male Low:	25
Ref Male High:	125
Ref Female Low:	35
Ref Female High:	140
Ref Ped Low:	(*)
Ref Ped High:	(*)
Control 1:	(*)
Control 2:	(*)
Control 3:	(*)
Correlat Factor:	1.000
Correlat Offset:	0.000

DUAL MODE

Name:	Amilase
Sample Blank:	NO
R1 Bottle:	25 ml
Normal Volume:	250 ul
Rerun Volume:	253ul
SAMPLE	
Normal Volume:	5ul
Rerun Volume:	2ul
R2 Bottle:	5 ml
Normal Volume:	0
Rerun Volume:	0
Prediction:	NO
Slope Blank:	NO
Delay Min Time:	77. 159 sec
Linearity Limit:	10%
Point One, Two:	
Incubation Time:	
Low Absorbance:	0.000
High Absorbance:	3.000
R ABS L Limit:	0.000
R ABS H Limit:	0.500
Substr Depletion:	
Reagent Blank:	3.000
R ABS Deviation:	YES #
Cal Low Limit:	
Cal High Limit:	
Factor:	6272(***)

MONO MODE	
Name:	Amilase
Sample Blank:	NO
R1 Bottle:	25 ml
Normal Volume:	250ul
Rerun Volume:	253ul
SAMPLE	
Normal Volume:	5 ul
Rerun Volume:	2ul
Delay Min Time:	70. 156 sec
Linearity Limit:	10%
Prediction:	
Incubation Time:	
Point One, Two:	
Low Absorbance:	0.000
High Absorbance:	3.000
R ABS L Limit:	0.000
R ABS H Limit:	0.500
Substr Depletion:	1.8
R ABS Deviation:	3.000
Reagent Blank:	YES #
Cal Low Limit:	(*)
Cal High Limit:	(*)
Factor:	6272(***)

(*) Dados colocados pelo usuário
 (**) Pode ser necessário efetuar pequeno ajuste no fator.
 (#) Dados calculados pelo analisador

APLICAÇÃO PARA BTR 810

Name:	Amilase
Ponto Final:	
Unidade:	U/L
Modo Leitura:	
Filt:	400
Tempo Fase:	
Fase:	6685
Tempo de Incubação:	60
Nº de Intervalos:	3
Temperatura:	37°C
Volume Aspirado:	900
Flux Recato:	Crescente
Estandard:	

APLICAÇÃO PARA QUICK LAB

Modo:	Cinética
Lekura:	
Filt:	405
Temperatura:	37°C
Volume Asp:	400
Unidade:	U/L
Límite Lin:	2000
Inclinação:	Crescente
Cálculo:	Fator
Padrão:	
Pad:	
Unid:	
Dec:	
Ini Cinc:	60
nº int:	3
dAMIN:	0.390
%lin Lin:	10
Dir:	Increasing
Lim Lin - Min/Max:	
Abs Real - Min/Max:	0.000 / 1.000
Abs Pad - Min/Max:	
Vt/Vn - Min/Max:	25 / 125

APLICAÇÃO PARA BIO 2000

Modo:	Cinético
WL1:	405
Blank:	Não
Bk Anos Pad:	
Tam:	37°C
Vol Asp:	400
Rel:	60
Filt:	6685
Padão:	
Pad:	
Unid:	U/L
Dec:	0
Ini Cin:	60
nº int:	3
dAMIN:	0.390
%lin Lin:	10
Dir:	Increasing
Lim Lin - Min/Max:	
Abs Real - Min/Max:	0.000 / 1.000
Abs Pad - Min/Max:	
Vt/Vn - Min/Max:	25 / 125

APLICACÃO PARA RA-XT

Name:	AMILASE
Imunossav:	NO
Chamistriz Type:	Zero Order
Bic type:	
Inverse Chemistry:	0
% Sample Volume:	10 (8ul)
Wavelength:	405
Bichromatic Chemistry:	
Bichromatic Factor:	
K1:	
K2:	
Bic Limit 1:	
Bic Limit 2:	
Depletion Limit:	
Delay Time:	1:00
Blank Type:	
Incubate:	
% Reagent Volume:	70 (350ul)
2nd Reagent:	
2nd Reagent Volume:	0 (10)
A2 Delay:	
Units:	U/L
Uni Factor:	1.0000
Decimal Point:	0
RBL Low:	0.000
RBL High:	0.700
Range Low:	0
Range High:	2000
Calibration Factor:	9940.14
Percent Rel:	0.0001
Standard Value:	Normal Low:
Normal High:	125
Slope:	1.000
Intercept:	0.0000
C1*10E-6:	0.00
C2*10E-6:	99999.01
D1*10E-6:	120.00
Delta #:	0.050
Linear Factor:	
Final Lim:	
Endpoint Lim:	

(*) Pode ser necessário efetuar pequeno ajuste no fator.

(**)

APLICAÇÃO PARA AIRONE

Measure Unit: U/L	Decimals: 0	Reaction Type: Kinetic
Volume (u):	Serum: 10	Plasma: 10
Reagent 1:	400	Reagent 2: 0
Abs Range (m Abs):	Min: 0	Max: 2.000
Linearity Limit:	2.000	Reagent Blanking: No
Contaminating:	No	Differential: No
Filter 1:	405	Filter 2: None
Time (sec):	Mix 1: 2.00	Incubation 1: 50
	Mix 2: 0.00	Lag Phase: 20
		Measure: 30
Measurement Type: Factor		Factor: 6684
Normal Range		
Homens		Mulheres
Age (yrs)	Min.	Max.
Below 10:		
From 10 to 60:	25	125
Over:		

Dispomos de programações para outros analisadores, entre em contato com SAC EBRAM.