



## 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 Etilideno-pNP-G7 (E-pNP-G7) como substrato. O uso do etilideno 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 freqüentemente 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 abdominais agudas, doenças do trato biliar, cetoacidose 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: Etilideno-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.

### Materiais Necessários não Fornecidos:

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

Número de intervalos: 2 a 3

### Calibração:

A calibração deste ensaio é efetuada através de fatoraçoão, 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:

- 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.
- Zerar o espectrofotômetro a 405 nm com água destilada.
- Cuidadosamente, adicionar 25µL do soro controle/amostra no tubo correspondente, homogeneizar e deixar em BM a 37°C. Acionar o cronômetro.
- Registrar as absorbâncias A1, A2 e A3 quando completar 1, 2 e 3 minutos respectivamente.
- Determinar as duas diferenças de absorbância/min (Δ Abs/min), subtraindo cada leitura de sua anterior.
- Determinar a média das diferenças de absorbância (Δ Abs/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:

$$\text{Média } \Delta \text{ Abs/min} = \frac{(A2-A1) + (A3-A2)}{2}$$

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

Fator = 6696

Calculo para Urina 24 horas:

$$\text{Urina: Amilase amostra (U/L)} \times \text{fator de diluição} \times \text{volume (L)}$$

### Exemplo:

$$A1 = 0,078 / A2 = 0,098 / A3 = 0,118$$

Fator = 6696

$$\text{Volume Urinário} = 0,950\text{L}$$

$$\text{Média } \Delta \text{ Abs/min} = \frac{(0,098 - 0,078) + (0,118 - 0,098)}{2}$$

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

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

$$\text{Amilase Amostra} = 0,02 \times 6696$$

Amilase Amostra = 134 U/L

Amilase na Urina= 134 x 1 x 0,95

Amilase na Urina= 127,3 U/24hs

Obs: µkat/L = U/L x 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 e 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)
Coefficiente de Correlação:	0.999
Inclinação:	0.945
Intercepto:	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

### Exatidão:

As amostras foram processadas por 10 dias consecutivos, uma vez por dia e em duplicata. Os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=10	Nível 1	Nível 2
Média (U/L)	23.7	419.8
D.P. (U/L)	0.9	3.0
C.V. (%)	3.7	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:

- 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 ≥ 1 mega ohm ou condutividade ≤ 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 ≥ 0,1 megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágue 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.12033

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:

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

