



QUIMIAMIL - AMILASE

Substrato Direto

REG. MS: 10159820166

EBRAM PRODUTOS LABORATORIAIS LTDA.

Rua Julio de Castilhos, 500 - Belenzinho
São Paulo - SP - Tel.: +55 11 2291 2811
CEP 03059-001 | Indústria Brasileira
CNPJ.: 50.657.402/0001-31

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Dra. Nadjara Novaes Longen | CRF-SP - 37.451

Para mais informações, entrar em contato com o **SAC EBRAM**
0800 500 2424 ou ☎ 11 2574 7110
sac@ebram.com | www.ebram.com

Revisão: Agosto/2022

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.



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 mmo/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
- Cronômetro.

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. Hemoglobina a partir de 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 µL
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	Padrão	Amostra/S.C.
Água destilada	20µL	-	-
Calibrador	-	20µL	-
Amostra / S.C.	-	-	20µL
Reagente	1,0mL	1,0mL	1,0mL

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

- Adicionar 1,0 mL do reagente em dois tubos e adicionar 20µL do calibrador e 20µL de água destilada em cada tubo, deixar em banho maria (BM) a 37°C por 1 minuto. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio.
- Zerar o espectrofotômetro a 405nm com o tubo do branco.
- 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 minuto de intervalo.
- Determinar as duas diferenças de absorvância/min (Δ Abs/min), subtraindo cada leitura de sua anterior.

6. 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)

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

Amilase da Amostra (U/L) =

$$\frac{\Delta \text{ Abs /min (amostra)}}{\Delta \text{ Abs /min (Calib)}} \times \text{concentração Calib (U/L)}$$

Cálculo para Urina de 24 horas:

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

EXEMPLO:

Absorvância com o Calibrador

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

Média Δ Abs/min =

$$\frac{(0,098 - 0,078) + (0,118 - 0,098)}{2}$$

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

Cálculo para Urina de 24 horas

Amilase na Urina = 349 x 1 x 0,95

Amilase na Urina = 331 U/24hs

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

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

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 ≥ 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 Bioquímica Geral: 6 x 10 mL

Linha Bulk: 1 x 200mL

Linha SAT: 2 x 45mL

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, Canalias F. Determination of total and pancreatic α -amylase in human serum with 2 choro-4- nitrophenyl- α -D-maltotriose 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 determinacion en rutina de la concentracion catalitica de α -amilasa em suero sanguineo 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.

SÍMBOLOS UNIVERSAIS UTILIZADOS EM EMBALAGENS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

 CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO	 REAGENTE	 FABRICADO POR
 O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTES	 DATA DE VALIDADE (ÚLTIMO DIA DO MÊS)	 NÚMERO DO LOTE
 LIMITE DE TEMPERATURA (CONSERVAR A)	 PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO	 NÚMERO DO CATÁLOGO