

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIAMIL – AMILASE II	Página 1 de 3 POPBIOxxx/xx
-------------------------------	---	-------------------------------

USO

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



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.

Hiperamilassemia 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 macroamilassemia.

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

PRODUTO UTILIZADO

Quimiamil – Amilase MS: 10159820166

Fabricante: Ebram Produtos Laboratoriais Ltda.

Rua Julio de Castilhos, 500.

Belenzinho – São Paulo –SP – Brasil - CEP: 03059-001

Para maiores informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM:

Tel. (011) 2291-2811 ou sac@ebram.com

REAGENTES

Reagente único, pronto para uso e sensível à luz. Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: MES 50mmol/L, cloreto de cálcio 5mmol/L, cloreto de sódio 300mmol/L, tiocianato de sódio 450mmol/L, CNPG3 2,25mmol/L, pH 6,1.

O reagente não aberto e 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 à 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.

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIAMIL – AMILASE II	Página 1 de 3 POPBIOxxx/xx
-------------------------------	---	-------------------------------

Indicacao de deterioração do reagente: presença de partículas, turvação, absorbância do branco superior a 0.500 quando medido a 405nm (cuveta de 1cm).

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 acido 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: E recomendado um jejum de 4 horas.

Urina: Deve-se seguir o procedimento operacional padrão do laboratorio para colheita, preparação e armazenamento da amostra.

Todavia, poderá ser modificado segundo orientação medica.

MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO

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

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. 12024/7024 e 12031/7031.

PROCEDIMENTO

• Procedimento Automatizado

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

Aplicação no sistema semiautomático: proceder como demonstrado a seguir no procedimento manual somente ate 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	Calibrador	Amostra/S.C.
Água destilada	20µL	-	-
Calibrador	-	20µL	-
Amostra/S. C.	-	-	20µL
Reagente	1,0mL	1,0mL	1,0mL

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

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIAMIL – AMILASE II	Página 1 de 3 POPBIOxxx/xx
-------------------------------	---	-------------------------------

3. Zerar o espectrofotômetro a 405nm com o tubo do branco.
4. Inserir no equipamento o tubo com o calibrador e registrar as absorbâncias A1, A2, A3, considerando A1 a primeira leitura (logo apos o 1 minuto de incubação) e as seguintes com 1 minuto de intervalo.
5. Determinar as duas diferenças de absorbância/min (Δ Abs/min), subtraindo cada leitura de sua anterior.
6. Determinar a media das diferenças de absorbâncias (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 1,0mL e podem ser ajustados proporcionalmente sem influencia no desempenho do teste. Salientamos que volumes de amostras menores do que 10 μ L aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

CÁLCULOS

(Abs.= Absorbância)

(Conc. = Concentração)

$$\Delta \text{ Abs. /min} = (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2) / 2$$

$$\begin{array}{l} \text{Amilase da} \\ \text{Amostra (U/L)} \end{array} = \frac{\Delta \text{ Abs. /min (amostra)}}{\Delta \text{ Abs. /min (Calib)}} \times \text{Conc. Do} \\ \text{Calib (U/L)}$$

Calculo para Urina 24 horas:

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

Exemplo:

Absorbância com o Calibrador

$$A_1 = 0,078 / A_2 = 0,098 / A_3 = 0,118$$

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

2

$$\text{Media } \Delta \text{ Abs/min (calib)} = 0,02$$

$$\text{Media } \Delta \text{ Abs/min (amostra)} = 0,024 \text{ (calc. Idem acima)}$$

Concentração do Calibrador = 291 U/L

Volume Urinário= 0,950L

$$\text{Amilase na amostra} = (0,024 / 0,020) 291$$

$$\text{Amilase na amostra}= 349 \text{ U/L}$$

Calculo para Urina 24horas

$$\text{Amilase na Urina}= 349 \times 1 \times 0,95$$

$$\text{Amilase na Urina}= 331 \text{ U/24hs}$$

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

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 titulo orientativo. E recomendado que cada laboratorio estabeleça seu próprio intervalo de referencia.

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIAMIL – AMILASE II	Página 1 de 3 POPBIOxxx/xx
-------------------------------	---	-------------------------------

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- **Linearidade / Sensibilidade**

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

Sensibilidade: 1.8 U/L

- **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.

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 enxague da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ mega ohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxague final utilizar água tipo II.

REFERÊNCIAS

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-maltotrioside as substrate. Clin Chim Acta 1997; 259: 147-160
3. Gubern G., Balsells D, Ferragut R, Galan 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 laboratory tests, 3th ed. AACC press, 1997.

	Nome	Assinatura	Data
Elaborado por			
Aprovado por			
Revisado por			
Desativado por			
Razão			

VER Ago/20