

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			МІ-10-043
Упутство за методу испитивања амилазе				
Страна 1 од 7	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	1	2024-12-24	mr ph Анђела Митровић руководилац Службе за хематолошку и биохемијску дијагностику	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Алфа-амилаза је ензим мале молекулске масе. Катализује хидролизу 1,4- α -гликозидних веза у полисахаридима (скроб и гликоген). Хидролизом линеарних полигљукана (амилоза) настају малтоза и остаци глукозе. Док хидролизом разгранатих полигљукана (амилопектин и гликоген) настају малтоза, глукоза и остаци ограничених декстрина (садрже мјеста гранања- α -1,6-гликозидне везе, на које амилаза не дјелује). Амилаза се излучује панкреасним соком у дуоденум, при чему један дио прелази у екстрацелуларну течност, те тако доспијева у циркулацију. Амилаза се сматра доста специфичним ензимом за панкреас. Има га и у другим органима: плувачним жлијездама, јетри, бубрезима, мишићима, дуоденалном соку, серуму, урину, млијеку и у траговима у ликвору. Постоје два изоензима амилазе: саливарна-S амилаза и панкреасна-P амилаза. Плувачне жлијезде луче S-тип амилазе која започиње хидролизу скроба док је храна још у устима и једњаку. S-амилаза се инактивира киселином у желуцу. Ацинусне ћелије панкреаса синтетишу P-тип амилазе која се излучује у дванаестопалачно цријево, гдје благо алкална средина погодује дејству ензима. Активност амилазе у крви је физиолошки ниска и константна. Мјерење активности α -амилазе је веома важно у дијагностици панкреатитиса и других обољења панкреаса код којих се може јавити повећање активности α -амилазе у серуму и урину. Амилаза има малу клиничка специфичност за дијагнозу акутног панкреатитиса, јер може бити повишена и код других поремећаја и стања, као што су различите интраабдоминалне болести, генито-уринарне болести, оштећања саливарних жлијезда, дијабетичне кетоацидозе итд.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

α -амилаза хидролизује 2-хлоро-4-нитрофенил- α -D-малтотриозид (CNP3) при чему настају 2-хлоро-4-нитрофенол (CNP), 2-хлоро-4-нитрофенил- α -D-малтозид (CNP2), малтотриоза и глукоза. Активност α -амилазе у узорку је пропорционална брзини формирања 2-хлоро-4-нитрофенола чија се апсорбација мери спектрофотометријски на 404 nm.

Методологија: ензимска (CNP3 супстрат)

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

3.1 Линеарност

Амилазатест за узорке серума линеаран је у опсегу од 4 до 6554 U/L.

3.2 Граница детекције (LOD- eng. Limit of Detection)

LOD је најмања количина анализата у узорку која се може одредити уз вјероватноћу од 95%. LOD за амилазу у серуму је 4 U/L.

3.4 Граница квантификације (LOQ)

Граница квантификације (LOQ) је концентрација анализата која се може одредити уз KV=20 %. (%KV-коэффициент варијације) LOQ за амилазу у серуму је 4 U/L.

3.5 Прецизност

Прецизност амилазатеста је испитана помоћу смјерница CLSI EP05-A3 и приказана је у табели 1 за серуму/плазми, а у табелу 2 за урин.

Табела 1. Резултати прецизности теста за амилазу у серуму/плазми

Узорак	n	Средња вриједност (IU/mL)	Поновљивост		Унутар- лабораторијска прецизност (Укупна)	
			SD	%KV	SD	%KV
Контрола 1	118	37	0,7	1,9	0,7	1,9
Контрола 2	120	114	0,8	0,7	0,9	0,8
Контрола 3	120	335	1,4	0,4	4,0	1,2

SD-стандардна девијација; %KV-коэффициент варијације

Табела 2. Резултати прецизности теста за амилазу у урину

Узорак	n	Средња вриједност (IU/mL)	Поновљивост		Унутар- лабораторијска прецизност (Укупна)	
			SD	%KV	SD	%KV
Контрола 1	120	71	0,6	0,8	0,7	1,0
Контрола 2	120	263	1,2	0,5	1,7	0,6

SD-стандардна девијација; %KV-коэффициент варијације

3.6. Поређење метода

Резултати добијени одређивањем амилазе у серуму на *ALINTYci* анализатору упоређени су са резултатима добијеним на *ARCHITECT ciSystem* анализатору, према смјерницама CLSI EP09-A3 помоћу Pasing-Bablokove методе регресије.

Табела 3. Поређење метода *Alinity ci* амилаза vs *ARCHITECT ci* амилаза

врста узорка	јединица	n	коэффициент корелације	одсјечак на у оси	нагиб	интервал концентрације
серум	U/L	113	1	0,41	1,00	8-6309
Урин	U/L	51	41	-0,28	0,996	5-5780

Болница Бијељина	Страна 3 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-043
		1	2024-12-24	

4. ВРСТА УЗОРКА

Врста узорка: За тестирање се могу користити узорци серума, плазме и урина.

Чување узорака: Анализа узорака се врши у што краћем временском периоду. Избјегава се вишекратно замрзавање и одмрзавање узорака. Ако се узорци не тестирају у року од 24 сата серум или плазма се одвајају од угрушка или гела у епрувети. Стабилност узорака приказана је у табели 4.

Табела 4. Стабилност узорака

Врста узорка	Температура	Максимално вријеме чувања
Серум/плазма	2 до 8 °C	7 дана
	-20 °C и нижа т	1 година
	2 до 8 °C	10 дана
Урин	-20 °C и нижа т	> 3 недеље

Транспорт узорка: Узорке до мјеста обраде је потребно доставити у одговарајућем положају и на сталцима, при чему крв не смије да буде у додиру са чепом. Препоручено вријеме доставе до лабораторије је 2 сата од узимања узорка.

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

Препорука је да се узорак крви узима наште, ујутру најмање 12 сати након последњег оброка, као и да вријеме за вађења крви буде између 7 и 10 h. Дан прије вађења крви треба узимати уобичајне оброке, али не премасне. За вечеру конзумирати лакшу храну. Вечера треба да буде најкасније до 19 h. Послије 19 h може се пити течност, изузев алкохола, кафе и претјерано заслађених напитака. Дан прије узимање крви треба избјегавати интензивну физичка активност. На дан узимања крви, ујутру, не треба ништа јести, пити ни пушити. Уобичајну терапију узети након вађења крви уколико љекар није другачије одредио. Уколико неки лијекови значајно утичу на концентрацију глукозе у крви, треба ако је могуће, избјегавати њихово узимање најмање два дана прије узорковања крви, у консултацији са љекаром. Такође, потребно је избјегавати дијететске суплементе и биљне препарате, које љекар није одредио као обавезне, као и интензивну физичку активност, конзумирање алкохолних и енергетских пића, два до три дана прије узимања узорка крви. Узорци урина су произвољни узорци.

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

За узорковање крви се користе пластичне епрувете, односно вакутајнери. За добијање серума користе се епрувете са активатором когулације (црвени чеп). Када се амилаза одређује из плазме узорковање крви се врши у епрувету са литијум/натријум хепарином као антикоагулансом (сиви чеп).

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

Од опреме и регенаса за извођење овог теста потребне су: заштитне рукавице, заштитна одјећа, аутоматска пипета, наставци за пипету, реакционе чашице, реагенс сет и анализатор Alinity ci, Abbott, сет реагенаса за одређивање амилазе у течном облику, спреман за употребу, чије су компоненте приказане у табели 5.

Болница Бијељина	Страна 4 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-043
		1	2024-12-24	

Табела 5. Компоненте реагенса

Реактивне компоненте	Концентрација
R1	
2-хлоро-4-нитрофенил- α -D-малтотриозид	2,25 mmol/L
Натријум хлорид	350 mmol/L
Калицијум ацета	6mmol/L
Калијум тиоцијанат	900mmol/L
Конзерванс: натријум азид <0,1%	

Додатни материјали за спровођење теста су: *Consolidated Chemistry Calibrator*, контролни материјал, физиолошки раствор.

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Обезбјеђивање услова радне средине представља систем мјера и активности за остваривање услова које захтјевају испитивања која се спроводеи прописане су у упутству *УП-10-138: Обезбјеђење и праћење услова средине у процесу испитивања*. У просторији у којој је смјештен апарат, температура је прилагођена условима који су прописани од стране произвођача опреме и захтјевима испитивања. Температура се одржава на вриједностима до 25 °C, што се евидентира у обрасцу *ОБ-10-221: Евиденција температуре*.

Упутством *УП-10-137: Мјере заштите на раду у Служби за хематолошку и биохемијску дијагностику*, прописују се мјере заштите на раду.

Овај тест захтијева руковање хуманим узорцима. Сваки узорак крви или другог биолошког материјала који се достави у лабораторију је потенцијално инфективан, па је неопходно да се са овим материјалом крајње пажљиво рукује. То значи да приликом манипулације узорцима и при раду са апаратом треба користити рукавице за једнократну употребу, као и друга заштитна средства.

Подаци о идентификацији хемикалија, опасности, мјерама прве помоћи и осталим подацима везаним за безбједност примјенереагенса амилазе се налази у Безбједоносном листу везаним за Alinity c Amylase Reagent Kit као и у упутству *УП-10-166: Упутство за безбједно руковање хемикалијама у Служби за хематолошку и биохемијску дијагностику*.

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Амилазатест користи линеарни методкалибрације, уз помоћ Consolidated Chemitstry Calibrator-а је.Метод редукције линеарних података користи слепу пробу реагенаса и један до шест калибратора за генерисање калибрационе криве од тачке до тачке. Нагиб се израчунава за сваки сегмент криве између нивоа калибратора.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

1. Провјерава се доступност свих потребних реагенаса за извођење теста.
2. Реагенс сет се поставља у апарат AlinityciSystem.
3. Прије анализе узорака, спроводи се интерна контрола квалитета и по потреби калибрација.
4. Узорци се стављају у епрувете или чашице са бар кодовима пацијената на носаче, сталке (*carrier*).
5. Након постављања узорака на транспортни модул врши се њихова идентификација скенирањем бар кода, након чега се врше аналитички процеси испитивања узорка.

Болница Бијељина	Страна 5 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-043
		1	2024-12-24	

6. Принцип рада се заснива на фотометријској методи, гдје је апсорбација рствора пропорционална концентрацији анализата.

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Контрола квалитета спроводи се примјеном контролних материјала које препоручује произвођач, а то су *TechnopathMultichemSPlus* ниво 1, *TechnopathMultichemSPlus* ниво 2 и *TechnopathMultichemSPlus* ниво 3. Интерна контрола квалитета се спроводи континуирано, сваког дана, прије почетка спровођења рутинских анализа. Такође, контрола квалитета се спроводи при промјени серије реагенса или калибратора (лот). Резултати статистичке обраде при интерној провјери аутоматски се приказују на контролној карти која се креира за сваки параметар посебно, чиме се оцјењује значајност разлике између вриједности која се добија анализирањем контролног материјала и очекиване вриједности за тај материјал. Ако је вриједност контролног узорка унутар двије стандардне девијације метода је под контролом и резултати пацијената се могу издати.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦИЈЕ (НА ПРИМЈЕР, ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА, БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

Студије интерференције су изведене кориштењем CLSI NCCLS EP7-P. Ефекти интерференције су евалуирани методама доза одговор и парови разлика за концентрације анализата на нивоу медицинске одлуке.

Табела 6. Интерференције при одређивању амилазе

Потенцијални интерферирајућа суспатанца	Задате јединице	Циљани ниво амилазе (U/L)	Recovery (% од циљне вриједности)
Билирубин	128 $\mu\text{mol/L}$	95,9	107,3
	257 $\mu\text{mol/L}$	95,9	114,1
Хемоглобин	125 mg/dL	69,7	92,8
	250 mg/dL	69,7	82,6
Интралипид	10 g/L	83,2	98,4
	20 g/L	83,2	96,6

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА, А КАДА ЈЕ ТО РЕЛЕВАНТНО И МЈЕРНА НЕСИГУРНОСТ ИЗМЈЕРЕНИХ КВАНТИТАТИВНИХ ВРИЈЕДНОСТИ

Принцип одређивања и израчунавања концентрације амилазе заснива се на фотометријској методи. Фотометријска технологија је мерење количине свјетлости коју узорак апсорбује. Свјетлосни зрак пролази кроз узорак и мјери се интензитет свјетлости која доспјева до детектора. Интензитет апсорбоване свјетлости према Ламбер-Беровом закону је пропорционална концентрације анализата. На основу калибрационе криве које се генерише тако што анализатор мјери апсорбанције калибратора и апсорбанције анализата, одређује се концентрација, односно активност ензима.

Мјерна несигурност за амилазу је $\pm 1,4\%$.

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Референтни интервал за амилазу у серуму/плазми наташте, приказан је у табели 7:

Болница Бијељина	Страна 6 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-043
		1	2024-12-24	

Табела 7. Референтни интервал

Врста узорка	Распон (U/L)
Серум/плазма	25-125
Урин	0-420

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Резултати мјерења амилазе су у широком распону вриједности и сходно да је линеарност теста у опсегу од 4 до 6554U/L, овај распон вриједности представља интервал извјештавања.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА КАДА РЕЗУЛТАТ НИЈЕ У ОКВИРУ ИНТЕРВАЛА МЈЕРЕЊА

Узорци у којима је вриједност амилазе виша од 6554U/L, могу се разблажити аутоматски или ручно. Анализатор разблажује узорак у односу 1:2 и аутоматски израчунава концентрацију множењем резултата фактором разблаживања. Ручно разблаживање узорка се проводи коришћењем физиолошког раствора (0,85 % до 0,90 % NaCl). Код задавања теста оператер мора уписати фактор разблажења узорка, како би се множењем добијеног резултата са унесеним фактором добила аутоматски исправљена концентрација. Када оператер не унесе фактор разблажења, резултат се множи са одговарајућим фактором прије издавања налаза. Фактор ручног разблажења=(волумен узорка+волумен реагенса за разблажење)/волуменузорка.

17. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ, КАДА ЈЕ ОДГОВАРАЈУЋЕ

Алармантнавриједности за амилазуизноси >1000 U/L.

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

За постављање дијагнозе и праћење тока болести, потребно је узети у обзир карактеристике пацијента, тренутну клиничку слику, ранија и тренутна обољења или патолошка стања, терапију коју пацијент прима и др., како би се лабораторијски налаз исправно интерпретирао.

Повишене вриједности:

Код акутног панкреатитиса амилаза у серуму расте у року од 5-8 h од појаве симптома. Максималне вриједности достиже за 12-17h (4-6x од ГРВ).Активности се обично врате у нормалу до 3. или 4. дана. Величина повишења активности ензима у серуму није повезана са тежином оштећења панкреаса, међутим, што је већи пораст, то је већа и вјероватноћа акутног панкреатитиса. Повећана активност у серуму одражава се на повећањеуринарне активности у поређењу са серумском амилазом, амилаза у урину достиже веће концентрације и остаје повишена дуже вријеме. Амилаза има малу клиничку специфичност у дијагнози акутног панкреатитиса (20-60%), јер се повишене вриједност могу наћи код других стања и поремећаја, као што су: интраабдоминалне болести различите од панкреаса (билијарне болести, опструкције, мезентерични инфаркт, перфорација пептичког улкуса, гастритис, руптура аорте, анеуризме, акутни апендицитис, перитонитис, траума); генитоуринарне болести (ектопично код руптуре трудноће у тубама, salpingitis, малигнитет оваријума, реналне инсуфицијенције Р и S типа); разне болести (оштећење саливарних жлијезда, акутни алкохолизам, дијабетична кетоацидоза, макроамилаземија Р и S типа, септички шок, хирургија срца, тумори, лијекови). Клиничка специфичност ензима се повећава примјеном

Болница Бијељина	Страна 7 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-043
		1	2024-12-24	

cut-off-a (P-амилаза > 3x URL), док се боља осјетљивост теста у касној фази панкреатитиса постиже мјерењем укупне амилазе у урину.

Снижене вриједности:

Снижене вриједности немају клинички значај.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Хемолизовани, иктерични или пемични узорци представљају извор варијације у концентрацији амилазе, што је приказано у табели 6. Вриједност амилазе се може промјенити при промјени положаја тијела из лежећег у усправан за 6%. Одређени лијекови представљају извор варијација за одређивање амилазе.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Amylase 2. Упутство произвођача за одређивање амилазе на AlinityciSystems анализаторима-преведено на српски језик. 2021.
2. Мајкић-Синг Н. (2006). Медицинска биохемија, друго допуњено издање. Друштво медицинских биохемичара Србије, Београд.
3. Мајкић-Синг Н. (2012). Клиничка ензимологија, Друго издање, ДМБС, Београд
4. Спасић С., Јелић Ивановић З., Спасојевић-Калимановска В. (2005). Практикум за вјежбе из медицинске биохемије, за студенте Фармацеутског факултета. Фармацеутски факултет, Београд
5. Хоновић, Л. (2013). Зашто нам је важна и како проводити квалитетну пријеманалитичку фазу лабораторијске дијагностике? Гласник пулске болнице, 10 (10), 21-25.
6. Architect System Operations Manual. Abbott Laboratories, 2013.
7. Ћорић, Ј. (2014). Контрола квалитета рада у лабораторијској медицини. Факултет здравствених студија, Сарајево.
8. Don-Wauchope, A. C., & Chetty, V. T. (2009). Laboratory defined critical value limits: how do hospital physicians perceive laboratory based critical values?. *Clinical biochemistry*, 42(9), 766–770.