

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			MI-10-044
<i>Упутство за методу испитивања аспартат аминотрансферазе (AST)</i>				
Страна 1 од 8	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	1	2024-12-24	mr ph Анђела Митровић руководилац Службе за хематолошку и биохемијску дијагностику	Е

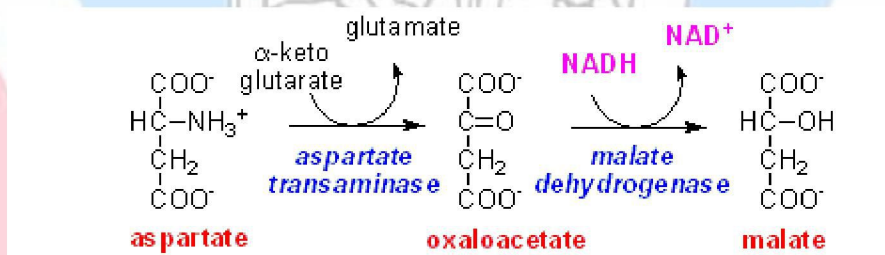
1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Аспартат аминотрансферазе (AST) је ензим јетре који се такође налази у срцу, скелетним мишићима и бубрезима. AST има два изоензима који се налазе или у митохондријама или у цитоплазми ћелија. Катализује реакцију у ћелијама у којој из аспартата и 2-оксоглутарата настају оксалацетат и глутамат и обратно. За ову ензимску реакцију неопходан витамин B6 као кофактор. AST се најчешће користи заједно са другим лабораторијским налазима (аланин аминотрансфераза-ALT или лактат дехидрогеназа-LDH). Најважнији узрок повећања трансаминаза су болести јетре: цироза јетре, карцином, вирусни, токсични и алкохолни хепатитис, остале болести јетре (хемохроматоза, Вилсонова болест, аутоимуни хепатитис, примарна билијарна цироза, склерозирајући холангитис, целијакија, дефицит α 1-антитрипсина), употреба лијекова. Друге нејетрене болестикод којих долази до повећања AST су: акутни инфаркт миокарда; прогресивна мишићна дистрофија; дерматомиозитис; плућна емболија; акутни панкреатитис; "crush" синдром; хемолитичка болест.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

AST из узорка катализује пренос амино групе са L-аспартата на α -кетоглутарат, при чему настају оксалацетат и L-глутамат. Оксалацетат се у присуству никотинамид аденин динуклеотида (NADH) и малат дехидрогеназе (MDH) редукује у L-малат. У овој реакцији NADH се оксидује у NAD⁺. Реакција се прати мерењем брзине опадања апсорбације на 340 nm услед оксидације NADH у NAD⁺.

Методологија: Спектрофотометријска метода; кинетички UV тест; NADH (без P-5'-P)



3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

3.1 Линеарност

AST тест за узорке серума линеаран је у опсегу од 5 до 400 IU/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 AST у серуму је 4 IU/L.

Болница Бијељина	Страна 2 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-044
		1	2024-12-24	

3.4 Граница квантификације (LOQ)

Граница квантификације (LOQ) је концентрација анализита која се може одредити уз KV=20 %. (%KV-коэффициент варијације) LOQ за AST у серуму је 5 U/L.

3.5 Прецизност

Прецизност AST теста је ≤ 5 % укупног %KV за узорке серума. Репрезентативни резултати испитивања прецизности теста помоћу смјерница CLSI EP05-A3 приказани су у табели 1.

Табела 1. Резултати прецизности теста

Узорак	n	Средња вриједност (IU/mL)	Поновљивост		Унутар- лабораторијска прецизност (Укупна)	
			SD	%KV	SD	%KV
Контрола 1	119	44	0,7	1,6	0,8	1,9
Контрола 2	120	228	0,9	0,4	3,0	1,3
Узорак 1	114	8	0,7	8,4	0,7	8,5
Узорак 2	120	35	0,6	1,7	0,6	1,8
Узорак 3	120	123	0,7	0,5	0,8	0,7
Узорак 4	120	3740	10,9	0,3	18,8	0,5

SD-стандардна девијација; %KV-коэффициент варијације

3.6. Поређење метода

Резултати добијени одређивањем AST у серуму на ALINTYciанализатору упоређени су са резултатима добијеним на ARCHITECT ciSystem анализатору, према смерницама CLSI EP09-A3 помоћу Pasing-Bablokove методе регресије.

Табела 2.Поређење метода Alinity ci AST vs ARCHITECT ciAST

врста узорка	јединица	n	коэффициент корелације	одсјечак на у оси	нагиб	интервал концентрације
серум	U/L	123	1	1,59	0,99	6-3929

4. ВРСТА УЗОРКА

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

Болница Бијељина	Страна 3 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-044
		1	2024-12-24	

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 3.

Табела 3. Стабилност узорака

Температура	Максимално вријеме чувања
	серум/плазма
2 до 8 °C	7 дана
-20 °C и нижа	12 недеља

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 физичку 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.

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДИТИВИ

За узорковање крви се користе пластичне епрувете, односно вакутајнери. За добијање серума користе се епрувете са активатором когулације (црвени чеп). Када се AST 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 AST у течном облику, спреман за употребу, чије су компоненте приказане у табели 4.

Табела 4. Компоненте реагенса

Реактивне компоненте	Концентрација
R1 L-аспарагинска киселина	103,860 g/L
B-NADH	0,610 g/L

Болница Бијељина	Страна 4 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-044
		1	2024-12-24	

Лактат дехидрогеназа	3.000 KU/L
Малат дехидрогеназа	2.000 KU/L
Конзерванс: натријум азид	
R2 α-кетоглутаринска киселина	6.570 g/L
Конзерванс: ProClin 300	

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 AST се налази у Безбједоносном листу везаним за Alinity с AST 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)

AST тест користи факторску методу редукције података како би генерисао калибрацију и резултатегенерисао калибрацију и резултате. Фактор калибрације заASTтест је 8654, и следљив је према IFCC референтној методи (од eng. International Federation of Clinical Chemistry). Додјељене вриједности за калибратор и фактор калибрације су следљиве према стандардизацији.

Факторска метода редукције података користи слијепе пробе с реагенсом и фиксну вриједност фактора калибрације за израчун резултата. Ова метода може се примијенити при тестовима код којих је реакција линеарна и стабилна код свих серија реагенса. Ова метода користи се за мјерење ензимске активности у узорку при предвидљивој и стабилној брзини реакције, коју је могуће одредити за хромофор, таласне дужинеи анализатор у употреби. Ензимска активност или концентрација узорка израчунавају се кориштењем следеће једначине:

Болница Бијељина	Страна 5 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-044
		1	2024-12-24	

$X = (A - A_{blk}) \times \text{Factor}$

- X-активност или концентрација у непознатом узорку
- A-апсорбанција или промјена апсорбанције у непознатом узорку
- A_{blk}-апсорбанција или промјена апсорбанције у слијепој проби среагенсом
- Factor- фактор калибрације

Други метод калибрације, уз помоћ Consolidated Chemistry Calibrator-a је линеарни метод. Метод редукције линеарних података користи слијепу 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.
6. Принцип рада се заснива на фотометријској методи, гдје е интензитет апсорбоване свјетлости пропорционалан 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. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ (НА ПРИМЈЕР, ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА,БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

Критеријум: Прихватљиви критеријум за интерференцију износи $\pm 10\%$ одступања од циљане вриједности.

Хемолиза: постоје значајне интерференције за одређивање AST при концентрацији хемоглобина од 15 mg/dL

Иктерус: нема значајне интерференције за одређивање AST при концентрацији коњугованог билирубина од 474 $\mu\text{mol/L}$ и некоњугованог билирубина од 1026 $\mu\text{mol/L}$

Липемија: нема значајне интерференције за одређивање AST при концентрацији триглицерида од 15g/dL

Болница Бијељина	Страна 6 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-044
		1	2024-12-24	

Лијекови (прихватљив критеријум $\pm 10\%$): постоји значајна интерференција за одређивање AST при концентрацији хидроксикобаламина ($743 \mu\text{mol/L}$), темозоломида ($52 \mu\text{mol/L}$).

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

Принцип одређивања и израчунавања концентрације AST заснива се на фотометријској методи. Фотометријска технологија је мјерење 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. Апсорбанција раствора се мења током реакције. До мјерења долази када реактант достигне стабилну брзину (тестови брзине).

Мјерна несигурност за AST је $\pm 0,44\%$.

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Референтни интервал за AST у серуму/плазми наташће, приказан је у табели 5:

Табела 5. Референтни интервал

Старосна доб	Распон (U/L)
до 5 дана	35-140
5 дана до 9 год	15-55
9-19 год.	5-45
>19 год	5-34

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Резултати мјерења AST су у широком распону вриједности и сходно да је линеарност теста у опсегу од 5 до 4001 U/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 AST виша од 4001 U/L , треба разблажити ручним поступком. Ручно разблаживање узорака се проводи коришћењем физиолошког раствора ($0,85\%$ до $0,90\%$ NaCl). Код задавања теста оператер мора уписати фактор разблажења узорака, 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 узорака + волумен реагенса за разблажење) / волумен узорака.

17. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ, КАДА ЈЕ ОДГОВАРАЈУЋЕ

Алармантна вриједности за AST износи $>1000 \text{ U/L}$ (болести јетре, инфаркт миокарда, мишићна дистрофија, вирусни хепатитис, акутни токсични хепатитис, опструктивни иктерус, цироза јетре, активног хроничног хепатитис).

Болница Бијељина	Страна 7 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-044
		1	2024-12-24	

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:

- Најважнији узрок повећања трансаминаза су болести јетре. Код већине болести јетре $ALT > AST$, а изузеци су алкохолни хепатитис, цироза и неоплазме јетре. Код вирусног хепатитиса и других облика болести јетре са акутном некрозом активност AST и ALT у серуму се повећавају чак и прије клиничких знакова и симптома (жутица). Активност оба ензима се обично повећавају 10- 40 x (могу и до 100 x); максимална вриједност трансаминаза између 7-12 дана; активности се затим постепено смањују и враћају се на нормалу након 3-5 недеља.
- Утврђено је да је ДеРитисов однос (AST/ALT коефицијент) повишен код болести јетре узроковане алкохолом, вирусног хепатитиса, цирозе и акутног фулминантног отказивања јетре. Однос већи од 2 указује на то да је алкохол узрок оштећења јетре.

Клинички значај аминотрансфераза

Болести јетре

1. Цироза јетре (активност аминотрансферзе варирају са статусом циротичног процеса крећу се од горње референтне границе па до 4-5x веће $De Ritis >1$; ово се приписује смањењу производње; повећање $De Ritis$ коефицијента одражава степен фиброзе)
2. Карцином јетре (повећање аминотрансфераза 2-5x; у раним фазама често нормалне вриједности; AST обично већи од ALT)
3. Токсични хепатитис (ацетаминофен-трансаминазе 85x)
4. Вирусни хепатитис, лијекови (НСАИЛ, антибиотици, статини, антиконвулзиви), биљни препаратум-умјерено повећање трансаминаза
5. Остале болести јетре (хемокроматоза; Вилсонова болест, аутоимуни хепатитис, примарна билијарна цироза, склерозирајући холангитис, целијакија...)
6. Иако се активности трансаминаза повећавају сваки пут кад се наруши интегритет хепатоцита, AST је мање специфичан за јетру од ALT .
7. Друге нејетрене болести:
 - акутни инфаркт миокарда (повећа се 6-8h након АИМ и враћа се на нормалу у току 5 дана; није специфичан индикатор јер се налази у значајним количинама и у другим органима, јетра, скелетни мишићи; $CK/AST-Szasz$ -ов коефицијент, при оштећења срчаног мишића износи 4, код оштећења скелетних мишића износи 20; $AST/ALT-DeRitis$ -ов коефицијент, код некомплицованог инфаркта овај однос 2).
 - прогресивна мишићна дистрофија
 - плућна емболија
 - акутни панкреатитис
 - “crush” синдром
 - хемолитичка болест

Болница Бијељина	Страна 8 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-044
		1	2024-12-24	

Снижене вриједности:

Снижене вриједности немају клинички значај.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

При одређивању AST треба избјегавати хемолизоване узорке у којима је концентрација хемоглобина већа од 10 mg/dL, као и липемичне узорке у којима је концентрација триглицерида већа од 750 mg/dL. До промјене активности ензима може доћи при промјени положаја тијела из лежећег у усправни положај за 5 %. Венска стаза (6 мин) може довести до пораста ензима за 8-10 %. Продужено лежање у кревету резултира нижим вриједностима ензима, услед физичке неактивности. Умјерено вјежбање доводи до пораста AST, као и интензивно вјежбање. AST подлијеже циркадијалним варијацијама због чега је важно вријеме узимања узорка. Врста хране утиче на активност ензима (унос шећера). Вриједности AST се повећане за 10-20% после оброка. Дуготрајно изгладњивање и гладовање доводе до промјена активности ензима због катаболизма аминокиселина (20-40%). Код хроничног алкохолизма вриједности AST су повишене, чак и до 250%. На вриједност аминотрансфераза утиче и узимање лијекова попут фенитоина. Године утичу на вриједност ензима, па тако новорођенчад имају више вриједности AST. До пубертета мала је разлика у AST међу половима, а после вриједност је већа код мушкараца. У менопаузи се мјења активност трансаминаза (↑ за 11%). Сезонске варијације имају утицај на активност ензима: највиша је у прољеће, а најнижа у јесен. Након хируршке интервенције вриједност ензима може да се повећа и до 51%.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Aspartate Aminotransferase2. Упутство произвођача за одређивање аспартат аминотрансферазе 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 пријемничку фазу лабораторијске дијагностике?. Гласник пулске болнице, 10 (10), 21-25. Преузето
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.