

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			MI-10-050
Упутство за методу испитивања аланин аминотрансферазе(ALT)				
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

Аланин аминотрансфераза(ALT) је ензим који се у великој количини налази у цитосолу хепатоцита, а његова активност у јетри је око 3000 пута већа од активности у серуму. Иако се генерално сматра да је специфичан за јетру, налази се и у бубрезима, а у много мањим количинама у ћелијама срца и скелетних мишића. ALT има полуживот у плазми 47 ± 10 сати, што је дуже од полуживота аспартат аминотрансферазе(AST) (17 ± 5 сати). Вриједности ALT расту код обољења која узоркују хепатоцелуларно оштећење. Опсег пораста вриједности ALT варира у зависности од узрока хепатоцелуларног оштећења.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

ALT из узорка катализује пренос аминок групе са L-аланина на α -кетоглутарат, при чему настају пируват и L-глутамат. Пируват у присуству NADH и лактат дехидрогеназе редукује се у L-лактат. У овој реакцији NADH се оксидује у NAD⁺. Реакција се прати мјерењем брзине опадања апсорбације на 340 nm услед оксидације NADH у NAD⁺.

Методологија: NADH (без P-5'-P).

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

L-аланин + α -кетоглутарат $\rightarrow$ пируват + L-глутамат

Пируват + NADH + H⁺ $\rightarrow$ лактат + NAD⁺

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

3.1 Линеарност

ALT тест за узорке серума линеаран је у опсегу од 7 до 3258 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 ALT у серуму је 2 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 ALT у серуму је 7 U/L.

3.5 Прецизност

Прецизност ALT теста је испитана помоћу смјерница CLSI EP05-A3 и приказана је у табели 1.

Болница Бијељина	Страна 2 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-050
		1	2024-12-24	

Табела 1. Резултати прецизности теста

Узорак	n	Средња вриједност (IU/mL)	Поновљивост		Унутар- лабораторијска прецизност (Укупна)	
			SD	%KV	SD	%KV
Контрола 1	126	33	0,5	1,6	0,9	2,7
Контрола 2	126	101	0,5	0,5	1,8	1,8
Узорак 1	126	8	0,5	6,7	0,6	7,1
Узорак 2	126	18	0,6	3,1	0,5	3,1
Узорак 3	126	362	4,1	1,1	4,2	1,2
Узорак 4	126	2902	7,5	0,3	14,9	0,5

SD-стандардна девијација; %KV-коэффициент варијације

3.6. Поређење метода

Резултати добијени одређивањем ALT у серуму на *ALINTY ci* анализатору упоређени су са резултатима добијеним на *ARCHITECT ci System* анализатору, према смјерницама CLSI EP09-A3 помоћу Pasing-Bablokove методе регресије.

Табела 2.Поређење метода Alinity ci ALT vs ARCHITECT ci ALT

врста узорка	јединица	n	коэффициент корелације	одсјечак на у оси	нагиб	интервал концентрације
серум	U/L	113	1	1	1,05	7-3264

4. ВРСТА УЗОРКА

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

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.

Болница Бијељина	Страна 3 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-050
		1	2024-12-24	

Табела 3. Стабилност узорка

Температура	Максимално вријеме чувања
серум/плазма	
2 до 8 °C	7 дана
-20 °C и нижа	60 дана

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 на таште, 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 избјежавати 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, избјежавати њихово узимање најмање два дана прије узорковања крви, у консултацији са љекаром. Такође, потребно је избјежавати 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 АДТИВИ

За узорковање крви се користе пластичне епрувете, односно вакутајнери. За добијање серума користе се епрувете са активатором когулације (црвени чеп). Када се ALT одређује из плазме узорковање крви се врши у епрувету са литијум/натријум хепарином као анти коагулансом (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 ALT у течном облику, спреман за употребу, чије су компоненте приказане у табели 4.

Табела 4. Компоненте реагенса

Реактивне компоненте	Концентрација
R1 L-аланин	66,820 g/L
β-NADH	0,305g/L
Лактат дехидрогеназа	5.000 KU/L
Конзерванс: натријум азид	
R2 L-аланин	6.570 g/L
α-кетоглтаринска киселина	
Конзерванс: ProClin 300	

Болница Бијељина	Страна 4 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-050
		1	2024-12-24	

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

ALT тест користи факторску методу редукције података како би генерисао калибрацију и резултате. Фактор калибрације заALTје следљив је према IFCC референтној методи (од eng. International Federation of Clinical Chemistry). Додјелене 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:

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

- 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 Chemitstry Calibrator-а 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.

Болница Бијељина	Страна 5 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-050
		1	2024-12-24	

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

1. Провјерава се доступност свих потребних реагенаса за извођење теста.
2. Реагенс сет се поставља у апарат Alinity ci, Architect.
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. Фотометријска технологија је мерење количине светлости коју узорак апсорбује. Светлосни зрак пролази кроз узорак и мери се интензитет светлости која досеже до детектора. Ламбер-Беров закон је установио математичку везу између апсорбације раствора и концентрације анализата. Апсорбација раствора се мења током реакције. До мерења долази када реактант достигне стабилну брзину (тестови брзине).

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 (ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА,БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

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

Хемолиза: постоје значајне интерференције за одређивање ALT при концентрацији хемоглобина од 250 mg/dL

Лијекови: постоји значајна интерференција за одређивање ALT при концентрацији хидроксикобаламина (1430 mg/L), сулфослазин (75mg/L).

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

Принцип одређивања и израчунавања концентрације ALT 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. Интезитет апсорбоване свјетлости према Ламбер-Беровом закону је пропорционална концентрације анализата. На основу калибрационе криве које се генерише тако што анализатор мјери апсорбацијекалибратора и апсорбације анализата, одређује се концентрација, односно активност ензима.

Мјерна несигурност за ALT је $\pm 0,26\%$.

Болница Бијељина	Страна 6 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-050
		1	2024-12-24	

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Референтни интервал за ALT у серуму/плазми наташте, приказан је у табели 5:

Табела 5. Референтни интервал

Старосна доб	Распон (U/L)
<5 дана	6-50
5-19 год.	5-45
>19 год	5-50

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Резултати мјерења ALT су у широком распону вриједности и сходно да је линеарност теста у опсегу од 7 до 3258 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 ALT виша од 3258U/L, могу се разблажити аутоматски или ручно. Анализатор разблажује узорак у односу 1:5 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 ALTизноси >1000 U/L (инфективна жутица, моноклеоза, болести јетре, вирусни хепатитис, акутни токсични хепатитис, болести панкреаса, масивни инфаркт миокара).

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.

Болница Бијељина	Страна 7 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-050
		1	2024-12-24	

Клинички значај ALT

Болести јетре

1. цироза јетре (активност аминотрансферазе варирају са статусом циротичног процеса крећу се од горње референтне границе па до 4-5х веће De Ritis >1; ово се приписује смањењу производње; повећање De Ritis коефициента одражава степен фиброзе)
2. карцином јетре (повећање аминотрансфераза 2-5х; у раним фазама често нормалне вриједности; ALT обично већи од AST)
3. токсични хепатитис (ацетаминофен-трансаминазе 85х)
4. вирусни хепатитис, лијекови (НСАИЛ, антибиотици, статини, антиконвулзиви), биљни препаратуми-умјерено повећање трансаминаза
5. ALT повишен дужи од 6 мјесеци након акутног хепатитиса, указује на хронични хепатитис (код већине пацијената са хроничним хепатитисом: макс. ALT је <7х од ГРВ)
6. остале болести јетре (хемокроматоза; Вилсонова болест, аутоимуни хепатитис, примарна билијарна цироза, склерозирајући холангитис, целијакија...)
7. Иако се активности трансаминаза повећавају сваки пут кад се наруши интегритет хепатоцита, ALT је специфичнији за јетру од AST.

Снижене вриједности:

Снижене вриједности немају клинички значај.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

При одређивању ALT треба избјегавати хемолизоване узорке у којима је концентрација хемоглобина већа од 250 mg/dL, и коју могу узроковати лажно повишене резултате. Узорци у којима је концентрација сулфосалазина већа од 75mg/dL могу узроковати лажно снижене резултате у аланине аминотрансферазе. Такође, од лијекова интерферира и хидроксикобаламина (1430 mg/L). До промјене активности ензима може доћи при промјени положаја тијела из лежећег у усправни положај за 7 %. Венска стаза (6 мин) може довести до пораста ензима за 8-10 %. Интензивно вјежбање доводи до пораста ALT. ALT подлијеже циркадијалним варијацијама због чега је важно вријеме узимања узорка. Врста хране утиче на активност ензима (унос шећера). Вриједности ALT се повећавају за 10-20% после оброка. Код хроничног алкохолизма вриједности ALT су повишене, чак и до 60%. На вриједност аминотрансфераза утиче и узимање лијекова попут фенитоина. Године утичу на вриједност ензима, па тако код дјеце до пубертета расте вриједност ALT. До пубертета мала је разлика у ALT међу половима, а после вриједност је већа код мушкараца. У менопаузи се мјења активност трансаминазе (↑ за 12%). Сезонске варијације имају утицај на активност ензима: највиша је у зиму, а најнижа у лјето и прољеће. ALT подлијеже интраиндивидуалним и интериндивидуалним варијацијама.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Alanine Aminotransferase. Упутство произвођача за одређивање аланин аминотрансферазе на Alinityc Systems 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

Болница Бијељина	Страна 8 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-050
		1	2024-12-24	

5. Хоновић, Л. (2013). Зашто нам је важна и како проводити квалитетну пријемничку фазу лабораторијске дијагностике? Гласник пулске болнице, 10 (10), 21-25.
6. Architect System Operations Manual. Abbott Laboratories, 2013.
7. Ђорић, 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.

