Determinazione di aspartato amminotransferasi e alanina amminotransferasi con metodi a tre reagenti e metodi a due reagenti su analizzatore automatico: la presenza di piridossal-5'-fosfato esogeno è più importante della modalità di aggiunta

Giampaolo Cattozzo, Chiara Albeni per il Gruppo di Studio SIBioC Enzimi
Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

Questo lavoro è stato in parte presentato al 41° Congresso Nazionale SIBioC, 27-30 ottobre 2009, Napoli, sotto forma di poster (Biochim Clin 2009;33:478).

ABSTRACT

Measurement of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) catalytic activity concentrations in serum by automated 3-reagent and 2-reagent methods: the presence of exogenous pyridoxal-5'-phosphate is more important than the supplementation procedure. The 3-reagent methods for AST and ALT, dispensing the pyridoxal-5'-phosphate (P5P) solution as a separate reagent directly in the reaction cuvette, were evaluated on an AU680 analyser with reagents from Beckman Coulter. For both AST and ALT, the imprecision of the 3-reagent method fulfilled the optimum quality specifications based on biological variation. The 3-reagent methods for AST and ALT were compared to the 2-reagent methods based on the IFCC procedure (AST2r and ALT2r rispectively) on a set of serum samples. For AST, a slope of 1.0 and an intercept of 0 were found; for ALT, a proportional bias of ~1% and a constant bias of 0.5 U/L (not significant) were detected. When the same set of serum samples were analysed for AST and ALT assays by methods not employing P5P (ASTnP and ALTnP, respectively), lower enzyme values were obtained. Differences were not related to enzyme concentration in serum samples: the greatest difference was 63 U/L (ASTnP-AST2r) and 61 U/L (ALTnP-ALT2r), respectively, corresponding to 38% and 18% of values measured with AST2r and ALT2r methods.

INTRODUZIONE

L'aspartato amminotransferasi (L-aspartato:2-ossoglutarato amminotransferasi, EC 2.6.1.1, AST) e l'alanina amminotransferasi (L-alanina:2-ossoglutarato amminotransferasi, EC 2.6.1.2, ALT) catalizzano, rispettivamente, le reazioni reversibili di conversione dell'acido L-aspartico e della L-alanina nei corrispondenti α-chetoacidi. La determinazione di questi enzimi nel siero trova largo impiego a scopo di diagnosi e sorveglianza dell'evoluzione delle malattie epatiche; per effetto della più ampia distribuzione in organi e tessuti dell'organismo umano, aumenti della concentrazione di AST si osservano anche nel corso di distrofia muscolare, dermatomiosite, lesioni muscolari di natura traumatica, infarto del miocardio, embolia polmonare, malattia celiaca, pancreatite acuta e anemia emolitica (1). Recentemente sono state riportate evidenze dell'utilità della determinazione dell'AST nella diagnosi di "crush syndrome" (2) e dell'associazione tra aumentata concentrazione di ALT e rischio di aterosclerosi coronarica nei pazienti affetti da steatosi epatica (3).

Il largo impiego della determinazione di questi enzimi in ambito medico indica la necessità di adottare metodi analitici standardizzati, in grado di fornire valori di concentrazione di attività catalitica confrontabili. Nella determinazione di AST e ALT, l'espletamento dell'attività catalitica di tutte le molecole enzimatiche contenute nel campione analizzato è garantito soltanto dai metodi che, analogamente agli specifici procedimenti analitici di riferimento raccomandati dall'IFCC (4, 5), prevedono l'aggiunta di piridossal-5'-fosfato (P5P) esogeno alla miscela di reazione. Le condizioni di reazione previste per questi metodi rendono possibile la saturazione delle molecole enzimatiche anche in caso di dismissione acuta di grandi quantità di apoenzima da parte dei tessuti sede di lesione e di carenza relativa di P5P endogeno (6-9). In realtà, la maggioranza dei laboratori clinici italiani adotta per la determinazione di AST e ALT metodi che non contemplano l'aggiunta di P5P esogeno (10),

Corrispondenza a: Giampaolo Cattozzo, Laboratorio di Analisi, Ospedale Filippo Del Ponte, Via Filippo Del Ponte 19, 21100 Varese. Tel. 0332299263, Fax 0332299408, E-mail giampaolo.cattozzo@gmail.com

Ricevuto: 06.06.2011 Revisionato: 27.06.2011 Accettato: 28.06.2011

nonostante i valori forniti da tali metodi non siano riferibili alla standardizzazione IFCC, a causa della differente specificità analitica. L'adozione dei metodi basati sul principio analitico raccomandato dall'IFCC trova un ostacolo nella ridotta stabilità dei reagenti, che può rendere difficoltoso il loro utilizzo ottimale; alcuni moderni analizzatori automatici, capaci di eseguire analisi con metodi a 3 reagenti, sono in grado di aggiungere P5P, sotto forma di soluzione concentrata, alla miscela di reazione in cuvetta, evitando la necessità di aggiungerlo ai reagenti: in questo modo è possibile adottare condizioni di reazione analoghe a quelle previste dalla standardizzazione IFCC, preservando la stabilità dei reagenti.

Scopo di questo lavoro è stata la valutazione di imprecisione, esattezza analitica e stabilità dei reagenti dei metodi per la determinazione di AST e ALT che prevedono l'impiego di P5P sotto forma di soluzione da aggiungere in cuvetta (metodi AST3r e ALT3r, rispettivamente); per evidenziare l'effetto dell'assenza di P5P esogeno, la valutazione veniva estesa a metodi che non ne contemplavano la presenza (metodi ASTnP e ALTnP).

MATERIALI E METODI

Tutte le analisi sono state eseguite a 37 °C utilizzando il sistema analitico Beckman Coulter AU680 e reagenti Beckman Coulter.

Per valutare l'imprecisione dei metodi AST3r e ALT3r, si sono utilizzati materiali di controllo liofilizzati a due livelli di concentrazione (Beckman Coulter Control Serum 1 e 2), che venivano ricostituiti, aliquotati e congelati a -80 °C. In ciascuna di 5 serie analitiche giornaliere erano analizzate 5 aliquote di ciascun materiale; applicando l'analisi della varianza è stata ottenuta la stima dell'imprecisione nella serie, tra le serie (tra i giorni) e totale.

L'inesattezza è stata valutata mediante confronto con metodi a due reagenti, basati sulla standardizzazione IFCC, che prevedevano l'impiego di reagenti preventivamente addizionati con P5P (metodi AST2r e ALT2r per AST e ALT, rispettivamente). Sono stati analizzati 106 sieri da pazienti (SP) con valori di AST nell'intervallo 9÷606 U/L e 103 SP con valori di ALT nell'intervallo 3÷403 U/L; tutti i SP, selezionati sulla base della concentrazione di AST e ALT, erano residui dell'attività routinaria del laboratorio, resi opportunamente anonimi. Per l'analisi della regressione è stato utilizzato il modello di Passing e Bablok (11); la significatività della differenza sistematica proporzionale e della differenza sistematica costante veniva valutata sulla base della differenza della pendenza da 1 e della differenza dell'intercetta da 0, rispettivamente, utilizzando i relativi limiti di confidenza al 95% calcolati. Inoltre, era valutata statisticamente la distribuzione delle differenze (AST3r – AST2r) e (ALT3r – ALT2r). Per evidenziare l'effetto dell'assenza di P5P esogeno nei reagenti, si è valutata la distribuzione delle differenze tra i metodi ASTnP e AST2r e tra i metodi ALTnP e ALT2r.

La stabilità dei reagenti impiegati nei metodi AST3r e ALT3r era valutata analizzando, con ciascun metodo, aliquote di 2 pool di SP a differente concentrazione, conservate a -80 °C, utilizzando sempre i medesimi flaconi di reagenti per 4 settimane lavorative, a partire dal primo giorno di utilizzo. Per ciascuna delle 20 serie analitiche giornaliere veniva eseguito il bianco dei reagenti. La tendenza a variare era valutata mediante regressione lineare della concentrazione di attività catalitica misurata sul tempo di conservazione dei reagenti.

RISULTATI

Nella Tabella 1 sono riportati i risultati di imprecisione osservati per i metodi AST3r ed ALT3r ai due livelli di concentrazione valutati; per entrambi i metodi l'imprecisione osservata risultava inferiore ai rispettivi obiettivi analitici ottimali derivati dalla variabilità biologica (12).

L'analisi della regressione dei valori misurati con i metodi a 3 reagenti per la determinazione di AST e ALT confrontati con i rispettivi metodi a 2 reagenti basati sulla standardizzazione IFCC dimostrava assenza di differenza sistematica (proporzionale e costante) tra i metodi AST3r e AST2r e la presenza di una differenza sistematica proporzionale di ~1% e di una differenza sistematica costante di 0,5 U/L (non significativa) tra i metodi ALT3r e ALT2r (Tabella 2).

La distribuzione delle differenze tra i valori misurati con i metodi AST3r, AST2r e ASTnP nell'analisi di 106 SP è illustrata nella Figura 1. La mediana delle differenze tra i metodi AST3r e AST2r era 0, i centili 25 e 75 erano pari a -1 U/L e 0, rispettivamente, e la differenza

Tabella 1
Imprecisione dei metodi a 3 reagenti per la determinazione di aspartato amminotransferasi (AST) (metodo AST3r) e alanina amminotrasferasi (ALT) (metodo ALT3r) con aggiunta di una soluzione di piridossal-5'-fosfato in cuvetta

	Concentrazione	Imprecisione osservata (CV%)			Imprecisione ottimale (CV%)
		Nella serie	Tra le serie	Totale	
AST3r	43 U/L	1,3	0,8	1,5	<3,0
	126 U/L	0,8	0,3	0,8	
ALT3r	41 U/L	2,1	1,5	2,6	<6,1
	121 U/L	1,0	0,9	1,3	

Tabella 2
Confronto tra metodi a 3 reagenti, che prevedono l'aggiunta di una soluzione di piridossal-5'-fosfato in cuvetta, (y) e metodi a 2 reagenti basati sulla standardizzazione IFCC (x) per la determinazione di aspartato amminotransferasi (AST) e alanina amminotrasferasi (ALT)

	Pendenza (CI 95%)	Intercetta (CI 95%)	*r*	n
AST	1,000	0,0	0,9999	106
	(1,000 ÷ 1,000)	(0,0 ÷ 0,0)		
ALT	0,988[a]	-0,5	0,9999	103
	(0,983 ÷ 0,996)	(-0,8 ÷ 0,1)		

[a]*Differenza da 1 significativa.*
CI 95%, intervallo di confidenza al 95%.

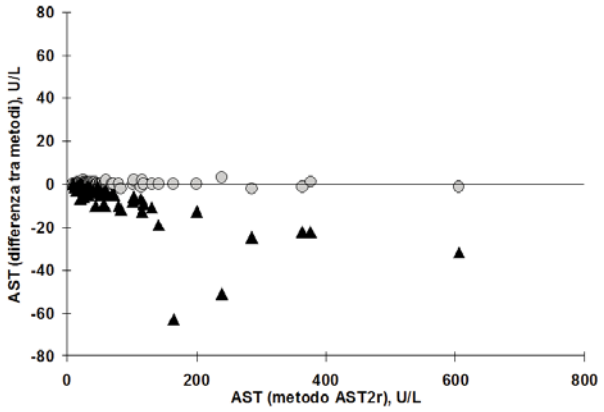


Figura 1
Differenze tra valori di concentrazione di attività catalitica dell'aspartato amminotrasferasi (AST) misurati con i metodi a 3 e 2 reagenti (tondi grigi) e con i metodi senza aggiunta di piridossal-5'-fosfato e a 2 reagenti (triangoli neri) nell'analisi dei sieri da pazienti.

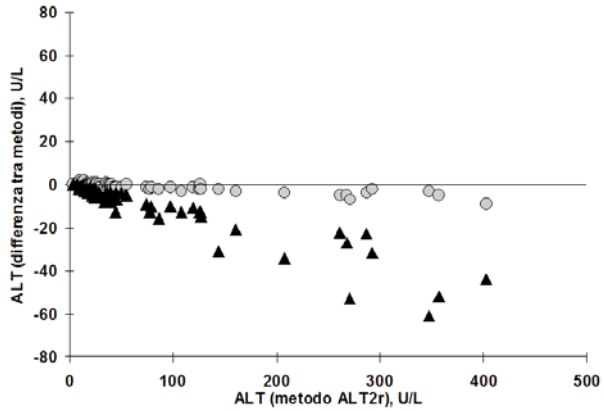


Figura 2
Differenze tra valori di concentrazione di attività catalitica dell'alanina amminotrasferasi (ALT) misurati con i metodi a 3 e 2 reagenti (tondi grigi) e con i metodi senza aggiunta di piridossal-5'-fosfato e a 2 reagenti (triangoli neri) nell'analisi dei sieri da pazienti.

massima osservata era pari a 3 U/L, riferendosi a un SP con concentrazione di attività catalitica di 239 U/L (misurata con il metodo AST2r). Le differenze tra i metodi ASTnP e AST2r risultavano generalmente più grandi e indicavano sottostima sistematica del metodo ASTnP. Non si osservava correlazione tra entità della sottostima e concentrazione di attività catalitica dell'AST nei SP; la differenza più grande veniva rilevata per un SP con concentrazione di attività di 165 U/L ed era pari a 63 U/L (38% del valore misurato con il metodo AST2r).

La Figura 2 mostra la distribuzione delle differenze osservate utilizzando i metodi ALT3r, ALT2r e ALTnP nell'analisi di 103 SP. Per quanto riguarda le differenze tra i metodi ALT3r e ALT2r, la mediana era -1 U/L, i centili 25 e 75 risultavano essere -1 U/L e 0, rispettivamente, e la più grande differenza in valore assoluto, pari a 9 U/L, si osservava per un SP con concentrazione di attività catalitica di 403 U/L (metodo ALT2r). Nel confronto tra i metodi ALTnP e ALT2r si osservavano differenze generalmente più grandi: la differenza maggiore si osservava per un SP con concentrazione di 347 U/L ed era pari a 61 U/L (18% del valore misurato con il metodo ALT2r). La sottostima sistematica del metodo ALTnP appariva grossolanamente correlata con la concentrazione di ALT nei SP; tuttavia, nell'intervallo di concentrazione tra 144 e 293 U/L le differenze variavano tra 21 e 53 U/L (8%–22% del valore misurato con il metodo ALT2r) senza alcuna relazione con la concentrazione di ALT nei SP.

Al termine delle prove di stabilità dei reagenti impiegati per i metodi AST3r e ALT3r, l'analisi della regressione della concentrazione di attività catalitica misurata sul tempo di conservazione dei reagenti non mostrava tendenza uniforme all'aumento né alla diminuzione; in nessuno dei 4 esperimenti la pendenza della retta di regressione era significativamente diversa da 0: in ciascun esperimento la pendenza risultava prossima a 0 e l'intervallo di confidenza al 95% comprendeva il valore 0.

DISCUSSIONE

L'appropriato utilizzo del dato analitico in ambito medico, in relazione ad intervalli di riferimento e valori decisionali clinici comuni, è favorito dall'accuratezza dei

metodi analitici e dall'adeguato accordo tra i valori forniti dai differenti sistemi analitici utilizzati nei laboratori clinici (13); la realizzazione di queste condizioni rappresenta un importante contributo alla pratica della medicina basata sulle prove di efficacia (14). Ai fini dell'armonizzazione dei risultati della determinazione di AST e ALT, la disponibilità di procedimenti analitici di riferimento IFCC è un importante componente, utile per la costruzione di un sistema di riferimento metrologico completo (4, 5); affinché questo possa essere efficacemente implementato, è necessario, tra l'altro, che i metodi utilizzati nella routine dei laboratori clinici presentino caratteristiche di specificità analitica assai simili a quelle del procedimento analitico assunto come riferimento (15). Nel caso specifico di AST e ALT, soltanto i metodi che prevedono l'aggiunta di P5P esogeno ai reagenti soddisfano questo requisito (16). La scarsa diffusione di questi metodi presso i laboratori italiani è dovuta, almeno in parte, all'impossibilità di utilizzare in modo ottimale i reagenti contenenti P5P, a causa della ridotta stabilità (10). Una possibile soluzione a questo problema è rappresentata dai metodi a 3 reagenti, come i metodi AST3r e ALT3r qui valutati, che prevedono l'aggiunta di una soluzione di P5P nella cuvetta di reazione, anziché ai reagenti in via preventiva, al fine di preservare la stabilità dei reagenti medesimi, oltre che di adottare condizioni di reazione conformi a quelle previste dalla standardizzazione IFCC. L'adozione di questi metodi nell'attività ordinaria dei laboratori richiede la disponibilità di analizzatori automatici adatti all'impiego di metodi a 3 reagenti come, per esempio, l'analizzatore qui utilizzato.

In questo studio, i metodi AST3r e ALT3r hanno mostrato bassa imprecisione e concordanza di valori con i corrispondenti metodi a 2 reagenti, basati sulla standardizzazione IFCC, che contemplano l'impiego di reagenti contenenti P5P aggiunto preventivamente. Inoltre, i reagenti utilizzati dai metodi AST3r e ALT3r si sono dimostrati stabili per almeno 4 settimane lavorative.

Il confronto tra i metodi per la determinazione di AST e ALT che non prevedono l'aggiunta di P5P e i corrispondenti metodi basati sulla standardizzazione IFCC ha confermato la sistematicità dell'errore (sottostima) della concentrazione di attività catalitica misurata in assenza di P5P esogeno e ne ha evidenziato l'imprevedibilità della grandezza. L'elevata variabilità della relazione matematica tra i valori di AST e ALT forniti dai metodi basati sulla standardizzazione IFCC e i valori misurati con i metodi che non prevedono l'aggiunta di P5P esogeno rende impossibile la compensazione delle differenze tra metodi mediante calibrazione (17).

In conclusione, i metodi per la determinazione di AST e ALT qui valutati che prevedono l'aggiunta della soluzione di P5P in cuvetta hanno mostrato livelli di imprecisione ottimali e buon accordo con gli analoghi metodi, basati sulla standardizzazione IFCC, che prevedono l'aggiunta di P5P ai reagenti; la stabilità dei reagenti è tale da consentire il loro utilizzo ottimale. La disponibilità di metodi a 3 reagenti per la determinazione di AST e ALT, oltre che di analizzatori automatici su cui sia possibile implementare tali metodi, può favorire la diffusione di metodi analitici in grado di fornire valori di AST e ALT riferibili a quelli misurabili con i rispettivi procedimenti analitici di riferimento IFCC, sebbene l'adozione di tali metodi implichi la diminuzione della cadenza analitica, conseguente al tempo necessario per la dispensazione della soluzione di P5P nella cuvetta di reazione come reagente separato. Viene inoltre riproposta la necessità di abbandonare i metodi di determinazione di AST e ALT che non prevedono l'aggiunta di P5P esogeno, a causa dell'inaccuratezza dei valori da essi forniti.

BIBLIOGRAFIA

1. Panteghini M, Bais R, van Solinge WW. Enzymes. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 4th ed. St. Louis: Elsevier, 2006:604-7.
2. Feng J, Zen P, Liu Y, et al. Serum enzyme profile characteristics of victims following the Wenchuan earthquake in China. Clin Chem Lab Med 2009;47:590-5.
3. Jung D-H, Lee Y-J, Ahn H-Y, et al. Relationship of hepatic steatosis and alanine aminotransferase with coronary calcification. Clin Chem Lab Med 2010;48:1829-34.
4. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. Clin Chem Lab Med 2002;40:725-33.
5. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. Clin Chem Lab Med 2002;40:718-24.
6. Rosalki SB, Bayoumi RA. Activation by pyridoxal 5-phosphate of aspartate transaminase in serum of patients with heart and liver disease. Clin Chim Acta 1975;59:357-60.
7. Lustig V. Activation of alanine aminotransferase in serum by pyridoxal phosphate. Clin Chem 1977;23:175-7.
8. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase. J Clin Chem Clin Biochem 1986;24:481-95.
9. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. J Clin Chem Clin Biochem 1986;24:497-510.
10. Cattozzo G, Borsotti M, Carobene A, et al. Inchiesta nazionale sull'impiego di metodi commerciali basati sul principio analitico raccomandato dall'IFCC per la determinazione dell'attività catalitica degli enzimi nel siero. Biochim Clin 2010;34:115-9.
11. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:709-20.
12. Biological variation database specifications. desirable

specifications for total error, imprecision, and bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. Madison, USA: Westgard QC, 2011. http://www.westgard.com /biodatabase1.htm
13. Panteghini M. Traceability, reference systems and result comparability. Biochim Clin 2007;31:247-53.
14. Muller MM. Implementation of reference systems in laboratory medicine. Clin Chem 2000;46:1907-9.
15. Panteghini M, Ceriotti F, Schumann G, et al. Establishing a reference system in clinical enzymology. Clin Chem Lab Med 2001;39:795-800.
16. Panteghini M, Ceriotti F. Establishing a reference system in clinical enzymology. Biochim Clin 2000;24:499-508.
17. Bergmeyer HU, Schelbe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin Chem 1978;24:58-73.