

Estudo para a determinação dos valores de referência das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama- glutamil transferase (GGT), no soro

Study for the determination of the reference values of the enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gama- glutamyl transferase (GGT), in serum

Marta Alvim, Ana Catarina Alves, Margarida Vaz, Suza Almeida, José Vicente Constantino, Mafalda Bourbon

marta.alvim@insa.min-saude.pt

Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

É recomendável que cada laboratório se baseie em protocolos e procedimentos operacionais comuns com a finalidade de obter valores de referência “comuns” e “harmonizados” a nível nacional. O objetivo deste trabalho foi determinar os valores de referência das enzimas AST, ALT e GGT. A metodologia teve como base o documento CSLI / IFCC, C28-A3. A amostra inicial foi de 1688 indivíduos de Portugal continental, dos quais 1122 foram excluídos após a análise dos questionários (com patologias e/ou fumadores) de modo a obtermos uma população considerada “saudável”. Após a quantificação das enzimas por um método enzimático, verificou-se que não houve relevância nos resultados para diferentes grupos etários, embora tenha sido observada diferença estatística significativa quanto ao género ($p < 0,001$). Desta forma, foram calculados os valores de referência para o género feminino e masculino respetivamente da ALT = 7-38U/L e 10-70U/L, da AST = 11-30U/L e 13-53U/L e da GGT = 5-36U/L e 7-80U/L, através do programa IBM SPSS Statistics versão 25. Os valores de referência, no caso do género feminino, foram muito semelhantes aos descritos nos folhetos informativos, enquanto no género masculino verificaram-se valores superiores.

_Abstract

It is recommended that each laboratory base itself on common protocols and operating procedures in order to achieve “standard” reference values at national level. The aim of this work is to determine the reference values of the enzymes AST, ALT and GGT. The methodology used was based on the document CSLI / IFCC, C28-A3. From the initial sample of 1688 individuals from mainland Portugal, 1122 were excluded due to the analysis of the questionnaires, (with pathologies and/or smokers) to obtain a population considered healthy We studied 566 serum samples and quantification of enzymes by an enzymatic method in Cobas INTEGRA 400 Plus, showed no significance differences in the results for several age groups, although a statistically significant difference was observed regarding gender ($p < 0,001$). Therefore, the reference values for females and males respectively were calculated for ALT = 7-38U/L and 10-70U/L, for AST = 11-30U/L and 13-53U/L and for GGT = 5- 36U/L and 7-80U/L, through the IBM SPSS Statistics version 25 program. The reference values, for females, were very similar to those described by other publications, while for males, higher values were found.

_Introdução

Os valores de referência fornecidos nos relatórios dos laboratórios têm um papel muito importante para auxiliar o clínico a interpretar os resultados dos testes em relação às populações saudáveis. A Federação Internacional de Química Clínica (IFCC, na sigla em inglês) recomendou que cada laboratório definisse os seus próprios valores de referência ⁽¹⁾. A diretriz C28-A3 publicada pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, na sigla em inglês) é fonte de referência nesta área, para que hajam valores de referência “comuns” e “harmonizados” a nível nacional ^(2,3).

Neste sentido, importa determinar os valores de referência das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama- glutamil transferase (GGT). As transaminases são enzimas próprias do fígado, embora não sejam exclusivas deste órgão e têm como função transferir o grupo amina de um aminoácido para um cetoácido (origem do nome). Tanto a AST sérica como a ALT apresentam valores elevados quando os processos patológicos afetam a integridade celular hepática, sendo a ALT uma enzima mais específica do fígado. Além disso, o aumento da atividade da ALT persiste durante mais tempo do que o aumento da atividade da AST. A GGT é utilizada no diagnóstico e monitorização das doenças hepatobiliares, sendo também um teste de despistagem para o alcoolismo oculto. Os valores de referência são calculados através de análise estatística da distribuição dos valores obtidos de uma população considerada saudável, em que os limites são calculados e definem os valores de referência.



_Objetivo

O objetivo deste trabalho é determinar os valores de referência das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama- glutamil transferase (GGT), numa amostra da população portuguesa, bem como descrever o procedimento para o cálculo dos mesmos.

_Métodos

Com base no documento CSLI / IFCC, C28-A3 (2) e após a avaliação dos questionários foram aplicados os critérios de exclusão e particionamento de forma a que os valores de referência sejam determinados com base em uma população "saudável". A amostra foi selecionada do Estudo de prevalência de fatores de risco cardiovascular na população portuguesa (e_COR), onde participaram 1688 indivíduos, distribuídos pelas cinco regiões de Portugal continental (318 do Algarve, 349 de Lisboa, 340 do Norte, 338 do Centro e 343 do Alentejo). Foram excluídos 826 participantes por apresentarem patologias, bem como 296 participantes por serem fumadores.

A fase pré-analítica é conhecida por ter os maiores erros no processo e envolve fatores biológicos e metodológicos (4,5), foram considerados e respeitadas com rigor todos esses fatores, tendo sido feitas as colheitas aos indivíduos após um jejum de 12h, sendo as condições de transporte e armazenamento feitas segundo as indicações do fabricante (6). A fase analítica inclui o método, o equipamento, os reagentes entre outros fatores. Foi utilizado para a quantificação das três enzimas o mesmo equipamento, Cobas INTEGRA 400 Plus-da Roche. O método para a determinação da atividade catalítica das enzimas ALT e AST está de acordo com a IFCC, mas sem piridoxal-5-fosfato e para o doseamento da GGT foi utilizado um método padronizado contra Szasz. O cálculo dos valores de referência inclui métodos de cálculo não paramétricos de acordo com a distribuição dos dados, deteção de *outliers* pelo método de Dixon (7,8), particionamento e intervalos de confiança. Os limites de referência inferiores foram calculados com o 2,5 percentil e os limites superiores com o 97,5 percentil da distribuição dos valores obtidos da população "saudável" (3).

_Resultados

Foram excluídos 826 participantes devido à presença de doenças e com resultados laboratoriais indicativos de diabetes (glucose > 126 mg/dl e /ou valor de hemoglobina glicada (HbA1c) > 6,5%) e hipercolesteremia (colesterol total > 240 mg/dl e/ou valor de colesterol-LDL > 160 mg/dl).

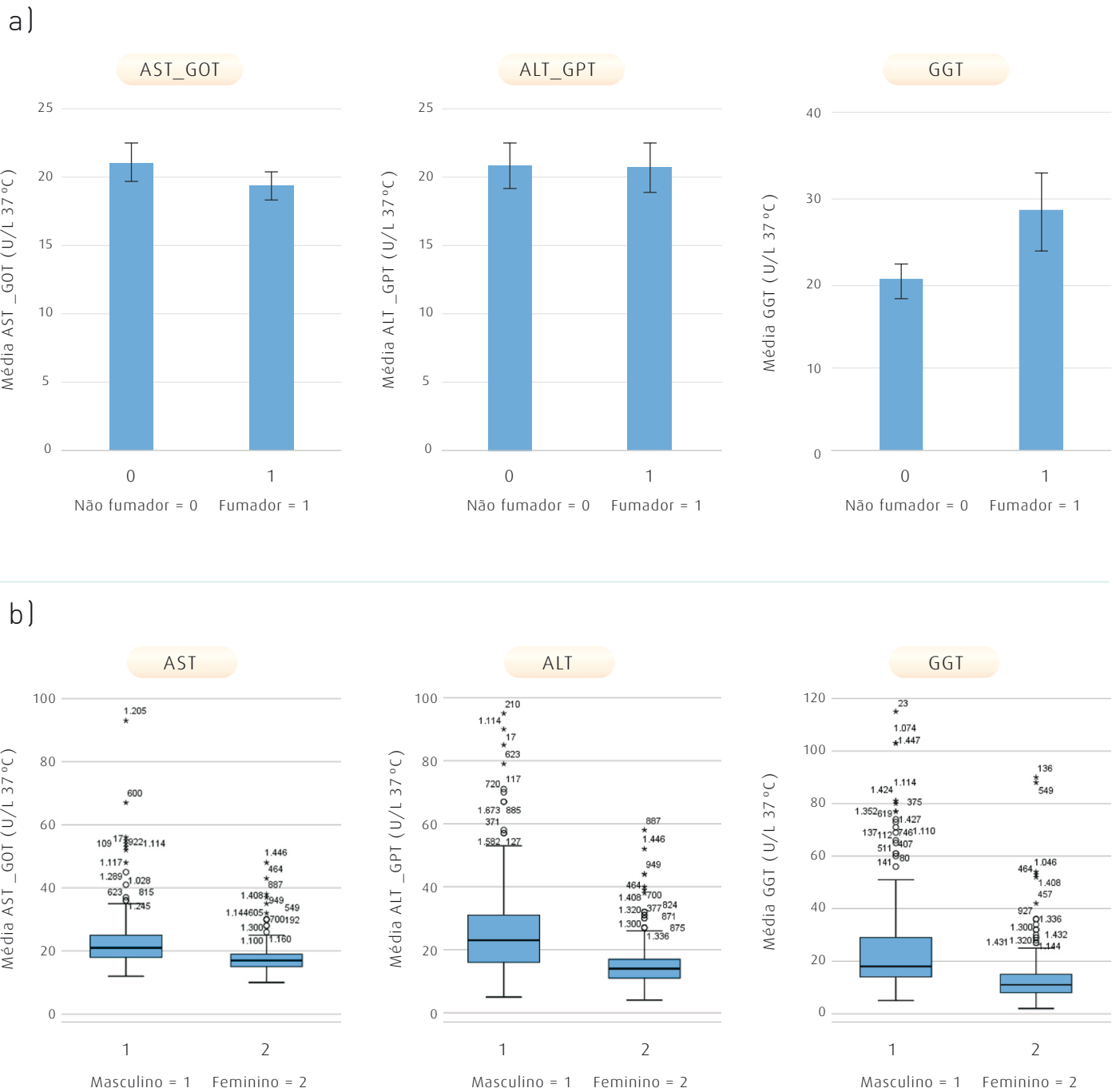
Dos restantes 862 participantes, 566 não eram fumadores e 296 eram fumadores, foi aplicado o teste de normalidade *Kolmogorov- Smimov* para cada um dos parâmetros, obtendo-se uma distribuição "não normal", e como tal aplicou-se o teste de *Mann-Whitney*, para verificar se os fumadores da população de referência deviam ser excluídos. Para a enzima GGT o grupo de não fumadores e fumadores foram estatisticamente diferentes ($p=0,04$), levando à exclusão do grupo dos fumadores (gráfico 1).

As análises subsequentes foram realizadas com amostras de 566 participantes, a fim de avaliar a necessidade de particionamento da amostra quanto às faixas etárias foram definidos inicialmente 3 grupos etários (18 a 34 anos, 35 a 64 anos e 65 a 79 anos). Após uma avaliação estatística verificou-se não apresentar relevância, desta forma a amostra foi avaliada dos 18 aos 79 anos.

Posteriormente procedeu-se a avaliação quanto ao género e neste caso a análise estatística (*Mann-Whitney*), demonstrou uma diferença significativa nos resultados das atividades enzimáticas avaliadas no soro, consoante o género ($p<0,001$) (gráfico 1).



Gráfico 1: ↓ Resultados médios da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama- glutamil transferase (GGT), comparativos entre os grupos dos fumadores e não fumadores (a) e em relação ao género (b).





Os valores de referência foram calculados através do programa SPSS *Statistics* versão 25. por um método não-paramétrico com base na frequência dos resultados para cada

parâmetro, em que o limite inferior corresponde ao percentil 2,5 e o limite superior corresponde ao percentil 97,5 com um intervalo de confiança 95 % (5,9) (tabela 1).

Tabela 1: Valores de referência para as enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama- glutamil transferase (GGT), consoante o género.

Parâmetros (U/L 37°C)	Feminino			Masculino		
	ALT	AST	GGT	ALT	AST	GGT
N.º resultados	318	317	319	241	241	238
Médias	15,19	17,68	13,18	26,65	23,27	25,05
Percentis	2,5	7,00	11,00	5,00	10,00	7,00
	5	8,00	12,00	6,00	11,00	9,00
	25	11,00	15,00	8,00	16,50	13,75
	50	14,00	17,00	11,00	23,00	18,50
	75	17,00	19,00	15,00	31,50	29,00
	95	27,00	25,00	29,00	55,90	69,10
	97,5	38,02	30,10	36,00	69,85	80,03

_Discussão e conclusão

Idealmente cada laboratório deveria definir os seus próprios valores de referência, porém se isso não for possível, devido à dificuldade de selecionar uma população de referência considerada “saúdavel” e o custo inerente, deveria validar os valores de referência a utilizar, analisando no mínimo 20 amostras (5,10). Com especial atenção aos critérios de exclusão e particionamento, fatores pré-analíticos e métodos analíticos, deve-se ser capaz de agrupar dados de vários locais, reduzindo assim enormemente o número de amostras que cada laboratório precisa selecionar e proceder ao doseamento e análise. Essa é a ideia por trás dos testes multicêntricos para estabelecer intervalos de referência (5).

Neste trabalho houve particionamento da amostra quanto ao género, mas não houve necessidade de dividir a amostra em relação as diferentes faixas etárias, uma vez que não

foram relevantes as diferenças de atividade enzimática em adultos, embora seja nos indivíduos com idades inferiores aos 18 anos.

Os valores de referência, no caso do género feminino, foram muito semelhantes aos descritos nos folhetos informativos da casa comercial sugeridos para estas metodologias, enquanto no género masculino verificaram-se valores superiores aos descritos nos folhetos informativos.

Como tal os valores de referência calculados para o género masculino devem ser alvo de novos estudos de forma a se verificar se houve influência de outros fatores, como o consumo de bebidas alcoólicas que podem não ter sido devidamente identificados na seleção da população de referência considerada “saúdavel”. Foram descritos outros estudos (9,11,12) que apresentavam, também, valores superiores para algumas destas enzimas, facto que corrobora com a ideia da necessidade de iniciar mais estudos de forma a harmonizar os valores de referência.



Muitos, se não a maioria, dos métodos que usamos nos laboratórios clínicos são mais do que adequados do ponto de vista analítico. Em contraste, os intervalos de referência que acompanham os resultados dos testes em relatórios laboratoriais merecem um maior escrutínio.

Este trabalho realça a importância dos valores de referência serem confiáveis e precisos para ajudar o clínico a interpretar os resultados dos testes para populações saudáveis.

Para estudos futuros do cálculo de valores de referência, o efeito genético parece ser a área mais desafiadora bem como os estudos de valores de referência para faixas etárias pediátricas e geriátricas, limites de decisão clínica e particionamento por efeitos genéticos (3).

- (11) Ceriotti F, Henny J, Queraltó J, et al.; IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL), Committee on Reference Systems for Enzymes (C-RSE). Common reference intervals for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and γ -glutamyl transferase (GGT) in serum: results from an IFCC multicenter study. *Clin Chem Lab Med*. 2010 Nov;48(11):1593-601. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.315>
- (12) Estey MP, Cohen AH, Colantonio DA, et al. CLSI-based transference of the CALIPER database of pediatric reference intervals from Abbott to Beckman, Ortho, Roche and Siemens Clinical Chemistry Assays: direct validation using reference samples from the CALIPER cohort. *Clin Biochem*. 2013 Sep;46(13-14):1197-219. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.04.001>

Referências bibliográficas:

- (1) Ozarda Y, Ichihara K, Barth JH, et al.; Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL), International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Protocol and standard operating procedures for common use in a worldwide multicenter study on reference values. *Clin Chem Lab Med*. 2013 May;51(5):1027-40. <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0249>
- (2) Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory, 3rd Edition. Malvern, PA: CLSI, 2010. https://clsi.org/media/1421/ep28a3c_sample.pdf
- (3) Ozarda Y. Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochem Med (Zagreb)*. 2016;26(1):5-16. <https://doi.org/10.11613/BM.2016.001>
- (4) Plebani M, Sciacovelli L, Aita A, et al. Harmonization of pre-analytical quality indicators. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014 Feb 15;24(1):105-13. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.012>
- (5) Horowitz GL. Reference Intervals: Practical Aspects. *EJIFCC*. 2008 Oct 16;19(2):95-105. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4975204/>
- (6) Roche Diagnostics. Informações técnicas – Teste para determinação de Aspartato Aminotransferase (ASTL- versão 9.0), Alanine Aminotransferase (ALT- versão 8.0) e Gama – glutamyltransferase (GGT- versão 13.0).
- (7) Fuentes Arderiu X. Intervalos de referência biológicos 1 [online] [consult. 24-01-2022] <https://www.ifcc.org/media/215857/Intervalos%20de%20referencia%20biol%20B3gicos%20DIV.pdf>
- (8) Solberg HE. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(7):710-14. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.121>
- (9) Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: an update. *Clin Chim Acta*. 2003 Aug;334(1-2):5-23. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(03\)00133-5](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(03)00133-5)
- (10) Crowley E, Bird P, Fisher K, et al. Evaluation of VIDAS Salmonella (SLM) easy Salmonella method for the detection of Salmonella in a variety of foods: collaborative study. *J AOAC Int*. 2011 Nov-Dec;94(6):1821-34. https://doi.org/10.5740/jaoacint.cs2011_03