

Artikelen

Geslachtsafhankelijke referentiewaarden voor de bepaling van alanine-aminotransferase

M.H. de KEIJZER¹, B.A.J. GIESENDORF¹, H. BAADENHUIJSEN¹ en J.F. van de CALSEIJDE²

Meer en meer laboratoria gaan over op metingen bij 37°C, met name vanwege de aanschaf van nieuwe klinisch-chemische analyzers. Voor de meeste bepalingen is het niet nodig de referentiewaarden aan te passen. Echter, aangezien enzymactiviteiten temperatuurafhankelijk zijn, moet bij deze metingen wel met een ander referentiewaardegebied rekening gehouden worden. Omdat enzymen bij hogere temperaturen een hogere activiteit hebben en de meting dus gevoeliger wordt, komen in het geval van de ALAT bepaling verschillen in berekende referentiewaarden tussen mannen en vrouwen aan het licht. Deze verschillen waren bij de oude meettemperatuur van 30°C minder uitgesproken en daarom onopgemerkt. Bij overgang op nieuwe analyzers en/of veranderde meetomstandigheden verdient het aanbeveling de referentiewaarden opnieuw te evalueren.

Trefwoorden: ALAT; alanine aminotransferase; temperatuur; referentiewaarden; geslacht

In 1998 werd door de laboratoria van de ziekenhuizen in kring Gelre besloten om voor een aantal (regelmatig aangevraagde) klinisch-chemische en hematologische parameters identieke referentiewaarden te gaan gebruiken. Tevens werd afgesproken om (voor zover nog niet gerealiseerd) bij 37°C te gaan meten en tevens bij 37°C te rapporteren. Dit betekende dat voor de enzymen de referentiewaarden moesten worden aangepast. Kring Gelre heeft uit harmonisatieoverwegingen besloten om zoveel mogelijk aan te sluiten bij de door de regio Den Haag/Leiden voorgestelde bovengrenzen (1,2). We gebruiken momenteel de waarden zoals vermeld in tabel 1, die tevens goed overeenkomen met eerder gepubliceerde referentiewaarden (3).

Na de implementatie bleek dat in de loop der tijd twijfels rezen t.a.v. de bovengrens van de ALAT-bepaling (alanine aminotransferase; EC 2.6.1.2) en werd de vraag gesteld of ook voor deze bepaling geslachtsafhankelijke referentiewaarden nodig waren. Dit heeft tot een aantal onderzoeken geleid met bloed van mannelijke en vrouwelijke bloeddonoren en poliklinische patiënten.

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Universitair Medisch Centrum St Radboud en Klinisch Chemisch Laboratorium², Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen

Correspondentie: Dr. M.H. de Keijzer, Universitair Medisch Centrum St Radboud, 564 CKCL, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.
e-mail: R.dekeijzer@ckcl.azn.nl

MATERIAAL en METHODEN

Bloeddonoren

Van 190 gezonde bloeddonoren (93 vrouwen en 97 mannen) in de leeftijd van 20 tot 65 jaar werd bloed afgenomen in een stolbuis met gelscheider. Binnen twee uur na afname werd het bloed gecentrifugeerd, het serum van de bloedcellen gescheiden en vond de analyse plaats.

Poliklinische patiënten

Met behulp van het ziekenhuisinformatiesysteem van het UMC St Radboud zijn alle ALAT-uitslagen van oktober 1997 (activiteitsmetingen bij 30°C) en oktober 1998 (activiteitsmetingen bij 37°C) verzameld. Alleen uitslagen van poliklinische patiënten in de leeftijd tussen 20 en 60 jaar zijn in de gegevensanalyse verwerkt; van elke patiënt is slechts één uitslag meegenomen. Uit 1997 zijn de uitslagen van 1212 mannelijke en 1426 vrouwelijke patiënten gebruikt, in oktober 1998 waren dit 1189 respectievelijk 1414 uitslagen.

Temperatuur-effect

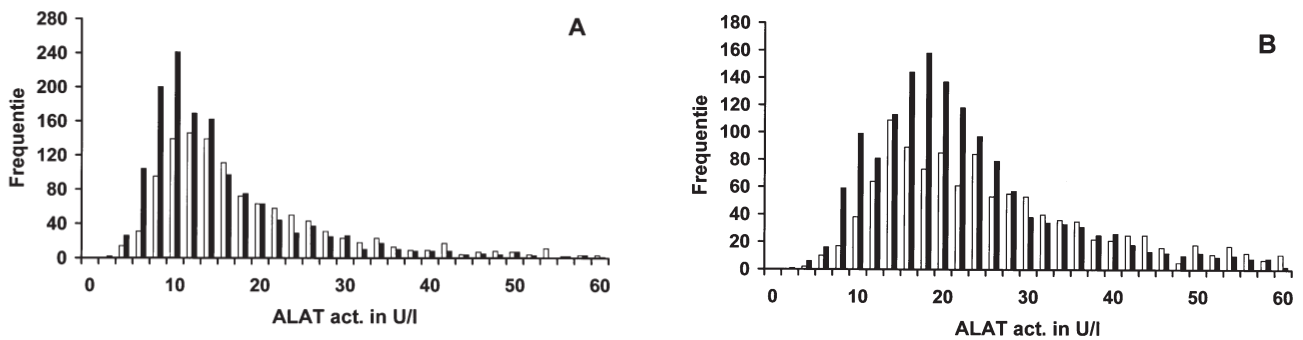
Om een eventueel geslachts-afhankelijk temperatuur-effect te onderzoeken is in het serum van 50 mannelijke en 50 vrouwelijke patiënten de ALAT-activiteit bij zowel 30°C als 37°C gemeten. De metingen vonden binnen twee uur na bloedafname plaats.

Apparatuur

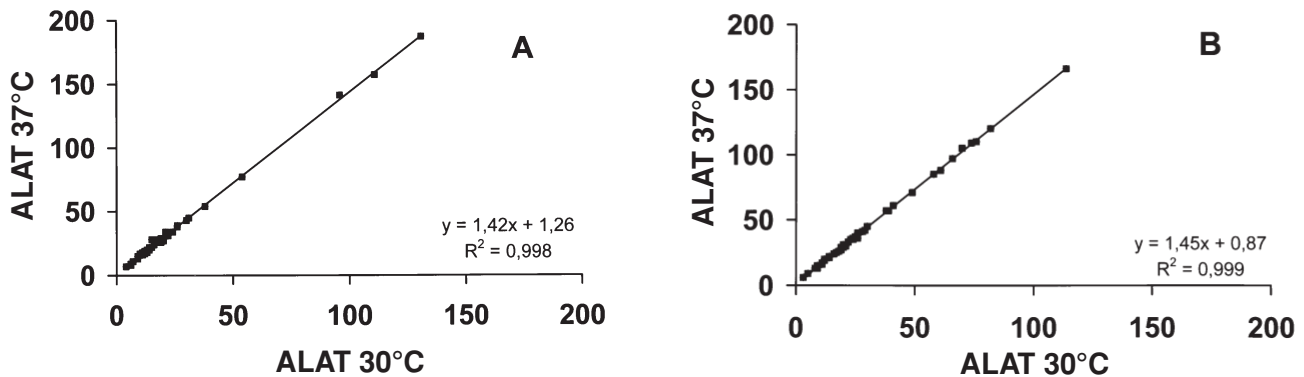
De ALAT-activiteit is in het UMC St Radboud met behulp van een Hitachi 747 analyzer (Roche, Almere, Nederland) volgens de IFCC methode bepaald (4).

Tabel 1. Regionale referentiewaarden (Kring Gelre) voor enzymactiviteiten (in U/l) bij 37°C

Naam	afkorting	EC nummer	boven grens
Alanine aminotransferase	ALAT	2.6.1.2	45
Amylase	AMY	3.2.1.1	220
Alkalische fosfatase	AF	3.1.3.1	120
Aspartaat aminotransferase	ASAT	2.6.1.1	40
Creatinekinase	CK	2.7.3.2	200 (m) 170 (v)
γ-Glutamyltransferase	γGT	2.3.2.2	50 (m) 35 (v)
Lactaat dehydrogenase	LD	1.1.1.27	450



Figuur 1. Frequentieverdeling van de ALAT-activiteit van poliklinische patiënten in 1997 bij 30°C (A) en in 1998 bij 37°C (B); vrouwen: zwarte staven; mannen: open staven.



Figuur 2. Correlatie tussen de ALAT-activiteiten gemeten bij 30°C en 37°C van vrouwen (A) en van mannen (B).

Het principe van de bepaling berust op de omzetting door ALAT van oxoglutaaraat en alanine in glutamaat en pyruvaat. Met behulp van het enzym lactaatdehydrogenase wordt pyruvaat daarna in aanwezigheid van NADH/H⁺ omgezet in lactaat waarbij NAD⁺ gevormd wordt. De tijdsafhankelijke vorming van dit laatste product kan spectrofotometrisch gemeten worden en is evenredig met de activiteit van ALAT.

Statistiek

Voor de verwerking van de resultaten is gebruik gemaakt van de volgende statistische testen: methode van Bhattacharya met logaritmisch getransformeerde resultaten (5,6), lineaire regressie en ongepaarde t-toetsen waarbij $p < 0,05$ als statistisch significant wordt beschouwd.

RESULTATEN

Bij 37°C bedroeg de spreiding van de ALAT enzym-activiteit van mannelijke bloeddonoren 8 tot 68 U/l; bij vrouwelijke bloeddonoren werden waarden tussen 5 tot 45 U/l gemeten. Bhattacharya-analyse van de resultaten leverde de volgende bovengrenzen op: mannen 51 U/l en vrouwen 38 U/l, een verschil van meer dan 20%.

De waarden van de ALAT-activiteit van de poliklinische patiënten varieerden in 1997 van 1 tot 365 U/l voor mannen en 1 tot 238 U/l voor vrouwen. In 1998 bedroeg de hoogste activiteit bij mannen 356 U/l en werd bij vrouwen 258 U/l gemeten (zie figuur 1, waarbij om redenen van duidelijkheid alleen de activiteiten tot 60 U/l zijn weergegeven). Na analyse m.b.v. Bhattacharya plots van de gegevens in 1997

(bij 30°C) werd voor vrouwen een bereik van 1 tot 33 U/l gevonden en voor mannen 1 tot 32 U/l. Na de temperatuursconversie in 1998 werd een bereik van 8 tot 38 U/l voor vrouwen en 8 tot 56 U/l voor mannen gevonden.

Uit figuur 2 blijkt dat er geen geslachtsafhankelijkheid bestaat t.a.v. de toename van de activiteit van ALAT. Ten opzichte van 30°C neemt de activiteit bij 37°C bij vrouwen met 42% en bij mannen met 44% toe. Dit verklaart niet het gevonden verschil in activiteit bij 37°C van ongeveer 20% tussen vrouwen en mannen. Per patient is tevens een ratio berekend van de ALAT activiteit bij 37°C en bij 30°C. Voor vrouwen bedroeg de gemiddelde ratio 1,511 en voor mannen 1,508 (ongepaarde t-toets: $p = 0,73$; NS).

DISCUSSIE

In het streven naar de hoogste kwaliteit worden in de klinische chemie met regelmaat nieuwe analysemethoden, nieuwe meetapparatuur en nieuwe bepalingen geëvalueerd en geïmplementeerd. Dit kan tot gevolg hebben dat door het gebruik van andere methoden en/of apparatuur de referentiewaarden voor bepaalde bepalingen kunnen veranderen. Onlangs is dit aangetoond voor de referentiewaarden van de aniongap (7,8); afhankelijk van de analyzer(s) en/of meetmethode(n) kunnen hiervoor verschillende waarden berekend worden.

Ook bij veranderingen in meettemperatuur moet rekening gehouden worden met wijzigingen in referentiewaarden. De tot dusver gevoerde discussie over meten bij 30°C of 37°C is eigenlijk overbodig geworden: alle nieuwe analyzers meten uitsluitend bij 37°C

en gediscussieerd wordt alleen nog over het al dan niet terugrekenen naar 30°C.

Overgang naar de hogere meettemperatuur heeft consequenties voor de enzymen, door de grotere gevoeligheid van deze metingen kunnen niet eerder gevonden verschillen tussen populaties aan het licht komen. Dit is waarschijnlijk het geval bij de meting van het enzym ALAT waar verschillen tussen mannen en vrouwen optreden bij overgang naar een meettemperatuur van 37°C.

Voor een aantal hematologische en klinisch-chemische bepalingen worden verschillende referentiewaarden voor mannen en vrouwen aangehouden. Voor enzymen was het alleen voor γ -glutamyltransferase en creatinekinase gebruikelijk een dergelijk onderscheid te maken. In Nederland is tot nu toe niet gekozen om ook voor de ALAT bepaling dit te gaan toepassen; in zowel het Handboek Klinisch-chemische Tests (9) als in het Diagnostisch Kompas (10) worden activiteiten tot 30 U/l (bij 30°C) als normaal aangehouden en wordt geen verschil gemaakt tussen mannen en vrouwen (11).

In het buitenland wordt echter wel met verschillen tussen mannen en vrouwen rekening gehouden. Hoewel de tweede editie van Tietz (12) voor ALAT vermeldt: "values in men are slightly higher than in women", worden in de appendix geen verschillende referentiewaarden met betrekking tot de activiteit bij 30°C vermeld (volwassenen < 40 U/l). In de derde druk echter (13) worden in de appendix voor de ALAT referentiewaarden bij 37°C wel verschillen tussen mannen (tot 40 U/l) en vrouwen (tot 28 U/l) opgegeven. Ook in een Fins onderzoek wordt een verschil van 25% tussen mannen en vrouwen gevonden (14). De ALAT activiteit werd hier gemeten volgens de aanbevelingen van de European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS) in gezonde personen tussen de 27 en 67 jaar met als exclusiecriteria medicatie die leverafwijkingen kan veroorzaken en overmatig drankgebruik. Het 95% referentie interval was 9 - 50 U/l voor mannen (n=189) en 8 - 38 U/l voor vrouwen (n=270). In een Duits onderzoek (15) onder 5706 bloeddonoren, waarbij de ALAT activiteiten bij 37°C met een droge chemie techniek werden gemeten, wordt een verschil van 20% tussen mannen en vrouwen gevonden (geometrisch gemiddelde voor vrouwen 17,6 U/l versus 22,5 U/l voor mannen). Tenslotte wordt in een Franse studie melding gemaakt van activiteitsverschillen van ongeveer 25% tussen mannen en vrouwen (16). Niet alleen in bloed en/of serum worden verschillen van 20% à 25% in ALAT-activiteit tussen mannen en vrouwen gevonden, ook enzymactiviteiten in rode bloedcellen blijken significant te verschillen (17). Hoewel de methode van Bhattacharya voor het vaststellen van referentiewaarden uitgaat van een qua gezondheidskenmerken homogene referentiepopulatie, worden er toch verschillen tussen mannen en vrouwen gevonden, terwijl dit in het verleden niet (duidelijk) aanwezig was. Waarschijnlijk spelen hierbij twee factoren een rol: 1) de hogere meettemperatuur, waardoor de activiteit van enzymen toeneemt en verschillen duidelijker worden en 2) de veranderingen die in

de loop der tijd opgetreden zijn in de populatie. De laatste factor is een vast gegeven: door de jaren heen zijn er veranderingen opgetreden in etnische samenstelling, constitutie en voedingsgewoonten. Parameters als lengte en gewicht zijn in deze bekend, maar het is ook een algemeen feit dat met name in de westerse landen de consumptie van alcoholhoudende dranken toeneemt. Het gegeven dat mannen meer drinken dan vrouwen maakt het waarschijnlijk dat naast de γ GT-activiteit ook geslachtsafhankelijke verschillen in ALAT-activiteit optreden. Dit suggereert dat het aanbeveling verdient om bijvoorbeeld elke tien jaar de verschillende referentiewaarden te controleren en eventueel bij te stellen

Recent is opgeroepen om in Nederland te komen tot een landelijke afstemming op het gebied van de harmonisatie van resultaten voor de routinematige bepaling van de zeven meest aangevraagde enzymen (2). In dat artikel wordt voor de ALAT-bepaling 45 U/l als bovengrens van normaal gehanteerd. Een verdere verfijning van deze bovengrens zou voor mannen de waarde van 50 U/l en voor vrouwen de waarde van 40 U/l opleveren.

Literatuur

1. Franck PFH, Steen G, Lombarts AJPF, Souverijn JHM, van Wermeskerken RKA. Multicenter harmonization of common enzyme results by fresh-pool sera. *Clin Chem* 1998; 44: 614-21.
2. Baadenhuijsen H, de Keijzer MH, Ballieux B, Jansen R, Treskes M, Bekers O, Franck P. "position paper" harmonisatie enzymresultaten. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1999; 24: 258-61.
3. Baadenhuijsen H, van Benthem E. Inventarisatie meetomstandigheden enzymactiviteiten in Nederland. *Tijdschr NVK* 1993; 18:260-5.
4. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24: 481-95.
5. Bhattacharya CG. A simple method of resolution of a distribution into gaussian components. *Biometrics* 1967; 23: 115-35.
6. Baadenhuijsen H, Smit JC. Indirect estimation of clinical reference intervals from total hospital patient data: Application of a modified Bhattacharya procedure. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23: 829-39.
7. Roberts WL, Paulson WD. Method-specific reference intervals for serum anion gap and osmolality (letter). *Clin Chem* 1998; 44: 1582.
8. Keijzer MH de, Koene RAP, Baadenhuijsen H, Willems JL. De grootte van de "anion gap". *Ned Tijdschr Geneesk* 1999; 143: 666-7.
9. Handboek Klinisch-chemische Tests; red. Pekelharing JM. 1e druk 1995, Utrecht: Bunge, pg35-36.
10. Diagnostisch Kompas; eindredactie Ottelander den GJ. 1e druk 1997, Utrecht: Boekhoven-Bosch, pg183.
11. Willems JL, van Munster PJJ. Invloed van leeftijd en geslacht op de enzymactiviteiten van aspartaat- en alanineaminotransferase in serum. *T Kindergeneesk* 1984; 52: 170-3.
12. Moss DW, Henderson AR: Enzymes. In: Tietz textbook of clinical chemistry 2nd ed. CA Burtis and ER Ashwood, Ed. Philadelphia, WB Saunders, 1994: 797.

13. Moss DW, Henderson AR: Clinical enzymology. *In: Tietz textbook of clinical chemistry* 3rd ed. CA Burtis and ER Ashwood, Ed. Philadelphia, WB Saunders, 1999.
14. Leino A, Impivaara O, Irjala K, Mäki J, Peltola O, Järvisalo J. Health-based reference intervals for ALAT, ASAT and GT in serum, measured according to the recommendations of the European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS). *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 243-50.
15. Grunenberg R, Banik N, Krüger J. Alaninaminotransferase (ALAT, GPT): eine Neubewertung der Ausschlussgrenzen für blutspender. *Infusionsther Transfusionsmed* 1995; 22: 145-51.
16. Maire I. Détermination d'activité de l'alanine aminotransférase (ALT). *Rev Fr Transfus Hémodiol* 1990; 33: 101-9.
17. Korede O. Incidence of biochemical vitamin B₆ deficiency in Nigerian adolescents. *Ann Nutr Metab* 1990; 34: 273-9.

Summary

Alanine-aminotransferase activity and gender-dependent reference values. Keijzer MH de, Giesendorf BAJ, Baadenhuijsen H and Calseijde JF van de. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 114-117.

Due to the introduction of a new generation of analyzers, most clinical chemical laboratories are now performing their analyses at 37°C. For most parameters there is no need to change the reference ranges. As the activity of enzymes is temperature-dependent, adaptation of the reference ranges is required. A higher assay temperature leads to a higher enzyme activity and consequently to a more sensitive determination. In case of ALAT the higher temperature revealed a significant difference between men and women, not found with an assay temperature of 30 °C. We recommend verification of the reference ranges with the introduction of new analyzers or after a change of assay conditions.

Key-words: ALAT; alanine aminotransferase; temperature; reference values; gender