

TGP / ALT

Uso:

Para la determinación cuantitativa de alanina aminotransferasa en suero utilizado en el examen de rutina y el control de la terapia y recaídas.

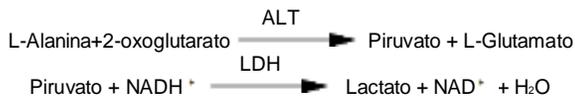
Introducción:

La enzima alanina aminotransferasa está ampliamente reportada en una variedad de fuentes de tejidos. La principal fuente de ALT es de origen hepático y ha conducido a la aplicación de las determinaciones de ALT para el estudio de enfermedades hepáticas. Los niveles séricos elevados se encuentran en la hepatitis, cirrosis, y la ictericia obstructiva. Los niveles de ALT están sólo ligeramente elevados en los pacientes después de un infarto de miocardio.1

El método UV para la determinación de ALT fue desarrollado primero por Wroblewski y LaDue en 1956.2 El método se basa en la oxidación de NADH por el lactato deshidrogenasa (LDH). En 1980, la Federación Internacional de Química Clínica recomienda un procedimiento de referencia para las mediciones de ALT basado en el procedimiento de Wroblewski y LaDue.3 El reactivo de ALT se ajusta a la formulación recomendado por la IFCC.

Principio:

La secuencia de reacción enzimática empleada en la prueba de ALT es la siguiente:



El piruvato formado en la primera reacción se reduce a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa y NADH. La actividad de ALT se determina midiendo la velocidad de oxidación del NADH a 340 nm. El piruvato endógeno de la muestra se convierte en lactato por LDH durante la fase de retraso antes de la medición.

Composición del Reactivo:

α -Cetoglutarato: 16 mmol/L.
Lactato deshidrogenasa (LD): >2300 IU/L.
L-Alanina: 500 mmol/L.
Tris Buffer: 97 mmol/L.
NADH: 0.18 mmol/L.

También químicos no reactivos para obtener un rendimiento óptimo del sistema.

Advertencias y Precauciones:

Seguir las precauciones normales establecidas para el manejo de reactivos de laboratorio. Los reactivos contienen azida sódica, que puede ser tóxico si se ingiere. La azida sódica puede reaccionar con cañerías de plomo y cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Consulte la Hoja de Datos de Seguridad del Material para cualquier información actualizada sobre riesgos, peligros, o de seguridad.

Preparación del Reactivo:

El reactivo está listo para usarse.

Almacenaje del Reactivo:

El reactivo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta correspondiente, cuando es correctamente almacenado a 2-8°C y protegido de la luz. El reactivo debe ser transparente e incoloro.

Deterioro del Reactivo:

1. Desechar el reactivo si está turbio o contiene partículas.

2. El reactivo debe desecharse si la absorbancia inicial leída contra agua destilada a 340 nm, es inferior a 1.000.

Materiales Necesarios pero no Provistos:

1. Espectrofotómetro capaz de leer la absorbancia a 340 nm y 1 cm. de paso de luz.
2. Bloque de temperatura constante o baño, 37°C, o bien cubeta de temperatura controlada.
3. Dispositivos de pipeteo precisos.
4. Tubos de ensayo.
5. Cronómetro para medir intervalos de tiempo.

Recolección y Almacenaje de la Muestra:

Suero no hemolizado es la muestra de elección. Siempre que sea posible, las muestras deben ser separadas y analizadas en el día de la recogida. Conservar el suero en tubos herméticos. Cerca del 10% del ALT se pierde en 3 días a 4°C y en 1 día a 25°C.5

Sustancias Interferentes:

La hemólisis debe ser evitada ya que la concentración de ALT en los glóbulos rojos es aproximadamente 5 veces mayor que la del suero.2 Los niveles de bilirrubina hasta 40mg/dL y triglicéridos hasta 2000mg/dL no muestran ninguna interferencia en esta prueba. Ciertos fármacos y otras sustancias afectan a los valores de ALT.5

Procedimiento Manual:

1. Pipetear 1.0 ml de reactivo de ALT en tubos con la etiqueta "controles", paciente (s) ", etc.
2. Preincubar todos los tubos a 37°C durante al menos cinco minutos.
3. Cero el espectrofotómetro a 340 nm con agua destilada.
4. Añadir 100µl (0.10ml) de suero a cada tubo respectivo, mezcle suavemente y gire a una cubeta térmica.
5. Leer y anotar la absorbancia a 30 segundos. Continuar la incubación a 37°C y registrar absorbancia a los 2 y 3 minutos. Tasa debe ser constante.
6. Determinar la absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min.}$), se multiplica por el factor 1768 para obtener resultados en U/L.
7. Repita el procedimiento para cada muestra.

Nota: Si la cubeta no está a temperatura controlada, incuba las muestras a 37°C entre las lecturas.

Procedimiento Automatizado:

Consulte el manual correspondiente aplicación sugerida disponible.

Control de Calidad:

Se recomienda que los controles se incluyan en cada serie de pruebas. Material de control disponible comercialmente con los valores de ALT establecidos pueden ser utilizados de forma rutinaria para el control de calidad. El valor asignado del material de control debe ser confirmado por la aplicación elegida. Si no se obtiene el rango de valores en el ensayo de material de control puede indicar deterioro del reactivo, mal funcionamiento del instrumento, o errores de procedimiento.

Resultados:

Los valores se derivan en base al "coeficiente de extinción de absorción micromolar" de NADH a 340 nm (0.00622). Unitario por litro (U/L) de ALT/GPT actividad es la cantidad de enzima que oxida un mmol/L de NADH por minuto.

$$U/L = \frac{\Delta A/\text{Min}}{\text{Absorción}} \times \frac{\text{Volumen Total}}{\text{Volumen Muestra}}$$

$$U/L = \frac{\Delta A/\text{Min}}{0.00622} \times \frac{1.100}{0.100}$$

$$U/L = \Delta A/\text{Min} \times 1768$$

Limitaciones:

1. El anticoagulante oxalato de potasio, fluoruro de sodio, citrato de sodio, heparina de sodio y heparina de litio se encontró que eran incompatibles con este método.
2. El anticoagulante de heparina de amonio y EDTA se encontró que eran compatibles con este método.

Valores Esperados:

Rango normal: 3-35 U/L (37°C)

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores esperados, ya que existen diferencias entre instrumentos, laboratorios y poblaciones locales.

Características de Rendimiento:

1. **Comparación:** Un grupo de 128 sueros que van en la actividad de la ALT de 7 a 625 U/L se analizó por el método descrito de ALT y por un reactivo de ALT similar disponible en el mercado. La comparación de los resultados dió un coeficiente de correlación de 0.999 y la ecuación de regresión fue $y = 0.960x + 3.2$. (Los estudios de comparación se llevaron a cabo de acuerdo a NCCLS Directriz Provisional EP9-T)

Entre Corridas:

	Suero 1	Suero 2
Promedio TGP (U/L)	25.1	116.0
Desviación Estándar (U/L)	0.82	0.90
CV %	3.25	0.77

Corrida a Corrida:

	Suero 1	Suero 2
Promedio TGP (U/L)	25.8	114.8
Desviación Estándar (U/L)	1.13	0.8
CV %	4.40	0.69

Los estudios de precisión se realizaron de acuerdo a NCCLS Directriz Provisional, EP5-T.

3. **Linealidad:** lineal hasta 500 U/L a 37°C. Se realiza de acuerdo a NCCLS directriz EP6-P.
4. **Sensibilidad:** Basado en una resolución de instrumento de A = 0.001, el método presentado muestra una sensibilidad de 1.8 U/L.

Referencias:

1. Henry, J.B.: *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, W.B. Saunders and Co., Philadelphia, PA, p-332-335 (1974).
2. Wroblewski, F. and LaDue, J.S. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 91:569 (1956).
3. International Federation of Clinical Chemistry, *J. Clin. Chem. Clin. Bio.* 18: 523 1(1980).
4. Bergmeyer, H.U. *Principles of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemic, 1978.
5. Young D.S. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*. AACCPress, Washington D.C., 1990.
6. Henry JB. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 17th ed. WB Saunders Co., 1984, p 1437.

