

Intención de uso

Para la determinación cuantitativa de la alanina aminotransferasa en suero.

Importancia clínica

ALT se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos en las concentraciones más altas se encuentran en el hígado y los riñones. Aún así, la ALT se considera más específica del hígado que la AST. Los niveles elevados de ALT a menudo sólo se observan en las enfermedades hepáticas como la cirrosis, hepatitis, o carcinoma metastásico. Sin embargo, no puede haber niveles elevados de ALT con la mononucleosis infecciosa, la distrofia muscular, y dermatomiositis.¹

Historia del método

Métodos UV para la determinación de ALT fueron descritos por Henley² en 1955 y Wroblewski y La Due³ en 1956. El procedimiento fue mejorado y optimizado por Henry et al⁴ en 1960. En 1974, la Sociedad Escandinava de Clínica Química⁵ recomienda condiciones óptimas de reacción. La Federación Internacional de Química Clínica (IFCC)⁶ publicó un método propuesto recomendado en el año 1980 utilizando el ensayo de LDH-NADH acoplado. El procedimiento descrito en este documento se basa en el método.

Principio



ALT cataliza la transferencia del grupo amino de la L-alanina de α -cetoglutarat resultando en la formación de piruvato y L-glutamato. Lactato deshidrogenasa cataliza la reducción del piruvato y la oxidación simultánea de NADH a NAD. La tasa resultante de la disminución de la absorbancia es directamente proporcional a la actividad de la ALT.

Reactivos

Después de la combinación de R1 y R2 del reactivo contiene: L-alanina 500mM, α -cetoglutárico 15mM, LDH (microbiana) > 2000IU/L, NADH 0.18mM, 100mM buffer de pH de $7.5 \pm 0,1$, azida de sodio 0.01%, estabilizadores.

Preparación de los reactivos

Prepare el reactivo de trabajo mezclando 5 partes de reactivo R1 con un reactivo R2 parte. (Por ejemplo, 250ul R1 con 50ul reactivo R2.)

Almacenamiento de reactivos

1. Almacenar los reactivos a 2-8 °C.
2. El reactivo de trabajo es estable durante 48 horas a temperatura ambiente. (15-30 °C) y durante 14 días en el refrigerador (2-8°C).

El deterioro del reactivo

No utilizar el reactivo si:

1. La absorbancia inicial a 340nm es inferior a 0.800.
2. El reactivo no cumple con los parámetros establecidos de desempeño.

Precauciones

1. Este conjunto de reactivo es para uso diagnóstico in vitro solamente
2. El reactivo R1 contiene azida de sodio (0.01%) como conservador. No se ingiera. Puede reaccionar con cañerías de plomo y cobre para formar soluciones azidas metálicas muy explosivas. Después de desecharlo, enjuague con abundante agua para evitar la acumulación de soluciones azidas.

Recolección y almacenamiento

1. Las muestras hemolizadas no se puede utilizar como glóbulos rojos conteniendo ALT.⁷
2. ALT en suero es estable por tres días a temperatura ambiente (15-30 °C), siete días en refrigeración (2-8 °C), y treinta días congelado a (-20 °C).⁷

Interferencias

1. Un número de drogas y sustancias afectan la actividad de ALT. Ver Young, y cols.⁸
2. Bilirrubina por lo menos a 30 mg/dl y hemoglobina de al menos 400 mg/dl, se ha encontrado que tienen un efecto insignificante en este procedimiento.

Materiales suministrados

ALT (SGPT) Los reactivos R1 y R2.

Materiales necesarios pero no suministrados

1. Pipetas Precisas.
2. Tubos de ensayo / rack.
3. Temporizador.
4. Espectrofotómetro capaz de leer a 340nm. (UV)
5. Calefacción baño / bloque (37 °C).

Procedimiento de prueba (automatizada)

Longitud de onda:	340nm
Tipo de ensayo:	Cinético
Muestra / reactivo Ratio:	1:10
Dirección de reacción:	Decremento
Temperatura:	37 °C
Lapso de tiempo:	60 segundos
Tiempo de lectura:	60 segundos
Bajo Normal:	5 U/L
Alta Normal:	34 U/L

Parámetros de la aplicación de diversos instrumentos automatizados están disponibles. Por favor, póngase en contacto con el departamento técnico de Servicio para obtener información específica.

Procedimiento (Manual)

1. Reconstituir el reactivo según las instrucciones.
2. Pipeta de 1.0ml de reactivo en los tubos apropiados y pre-caliente a 37°C durante cinco minutos.
3. Cero el espectrofotómetro con agua a 340nm.
4. Transferencia de 0.10ml (100ul) de muestra al reactivo, mezcle e incube a 37°C durante un minuto.
5. Después de un minuto, leer y anotar la absorbancia. Regrese el tubo a 37°C. Repetir las lecturas cada minuto durante los próximos dos minutos.
6. Calcular la diferencia de medias de absorbancia/minuto (Δ Abs./Min.).
7. El Δ Abs./Min. Multiplicado por el factor 1768 (véase el cálculo) se obtendrán resultados en U/L.

Notas del procedimiento

1. Si el espectrofotómetro está equipado con una cubeta de temperatura controlada, la mezcla de reacción se puede dejar en la cubeta, mientras que las lecturas de absorbancia se toman.
2. Una lectura final muy bajos, junto con un pequeño cambio de absorbancia entre las lecturas podrían indicar un nivel de ALT muy alto. Diluido y re-ensayo que sea necesario.

Limitaciones

1. Muestras turbias o ictericas pueden dar lecturas cuya absorbancia inicial excede la capacidad del espectrofotómetro. Resultados más precisos se pueden obtener mediante el uso de 0.05 ml (50ul) de muestra y multiplicando la respuesta final por dos.
2. Las muestras con valores por encima de 500 UI/L deben diluirse 1:1 con solución salina, re-analizar y multiplica el resultado por dos.

Calibración

El procedimiento está estandarizado por medio de la absorción milimolar del NADH tomada como 6.22 a 340nm en las condiciones de ensayo descritos.

Cálculo

Una Unidad Internacional (UI/L) se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones específicas.

$$\text{ALT (IU/L)} = \frac{\Delta\text{Abs./Min.} \times 1.10 \times 1000}{6.22 \times 0.10 \times 1.0} = \Delta\text{Abs./min.} \times 1768$$

Donde $\Delta\text{Abs./Min.}$ = Cambio de absorbancia por minuto
 1000 = conversión de UI/ml a IU/L
 1.10 = volumen de reacción total (ml)
 6.22 = absortividad milimolar de NADH
 0.10 = Volumen de la muestra (ml)
 1.0 = paso de luz en cm

Ejemplo: Si el cambio promedio de absorbancia por minuto = 0.12 luego $0.12 \times 1768 = 212$ UI/L

NOTA: Si los parámetros de ensayo se modifican el factor tiene que volver a calcular mediante la fórmula anterior.

Unidades SI: Para convertir a las unidades del SI (nkat/L) se multiplican UI/L de 16.67.

Control de calidad

La validez de la reacción debe ser monitoreada con sueros de control con valores conocidos normales y anormales de ALT (SGPT). Estos controles se deben ejecutar por lo menos en cada turno en el que el ensayo ALT (SGPT) se lleva a cabo. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propia frecuencia de la determinación del control.

Valores esperados⁹

4 a 24 UI/L (30°C)
 4 a 36 UI/L (37°C)

Puesto que los valores esperados son afectados por la edad, sexo, dieta, y la ubicación geográfica, cada laboratorio debe establecer su propio rango de referencia para este procedimiento.

Rendimiento

1. Linealidad: 0-500 UI/L.
2. Comparación: Estudios entre el presente método y un método similar arrojó un coeficiente de correlación de 0.999 y una ecuación de regresión de $y = 0.96x + 3.2$. (n = 128, rango = 7-625 UI/L)
3. precisión:

Dentro de corrida (n=20)

Media	S.D.	C.V.%
30	0.7	2.3
116	0.8	0.7
381	3.1	0.8

Corrida y corrida (n=20)

Media	S.D.	C.V.%
31	0.7	2.3
118	1.7	1.4
382	2.5	0.9

4. Sensibilidad: La sensibilidad de este reactivo fue investigado por la lectura del cambio en la absorbancia a 340nm para una muestra salina y sueros con concentraciones conocidas. Diez réplicas fueron realizadas. Los resultados de esta investigación indicaron que, según el analizador utilizado, la ALT (SGPT) reactivo mostró pequeña o nula desviación del reactivo en una muestra cero. En las condiciones de reacción descritas, 1 UI/L ALT actividad da un $\Delta\text{Abs./Min.}$ de 0.0004.

Referencias

1. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, W.B. Saunders co., p 674 & 675 (1982).
2. Henley, K.S., Pollard, H.M., J. Lab. Clin. Med. 46:785 (1955).
3. Wroblewski, F., La Due, J.S., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91:569 (1956).
4. Henry, R.J., et al, Am. J. Clin. Path. 34:381 (1960).
5. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology, Scand. J. Clin. Lab. Invest 32:291 (1974).
6. Clinica Chimica Acta 105:145F-172F (1980).
7. Henry, R.J., Clinical Chemistry: Principles and Technics, Harper & Row, NY, P522 (1968).
8. Young, D.S., et al, Clin. Chem. 21:1D (1975).
9. Henry, J.B., Clinical Diagnosis & Management by Laboratory Methods, W.B. Saunders Co., Philadelphia, P1437 (1984).

DISTRIBUIDO POR:



MANZANILLO No. 89 DESP. 110
 COL. ROMA SUR C.P.06760 MEXICO, CDMX.
 TEL. 5264-4553 FAX: 5264- 4459
 WWW.GRUPOMOSCARO.COM