



QUIMIALT – ALT/TGP

Alanina Aminotransferase

Finalidade:

Reação enzimática para determinação quantitativa de alanina aminotransferase (ALT) em amostras de soro humano. Somente para uso diagnóstico "in vitro".

Princípio:

A ALT catalisa a transferência do grupo amino da L-Alanina para 2-oxoglutarato resultando na formação do piruvato e L-glutamato. O lactato desidrogenase catalisa a redução do piruvato e a oxidação simultânea do NADH para o NAD. A razão resultante da diminuição em absorvância é diretamente proporcional à atividade do ALT, quando medido em 340 nm.

A amostra piruvato endógeno é rapidamente e completamente reduzida pelo lactato desidrogenase (LDH), durante o período inicial da incubação, assim não interfere com o teste. O presente método está baseado nas recomendações da Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) Temos então a seguinte reação:

ALT

L-Alanina + 2-Oxoglutarato → Piruvato + L-Glutamato

LDH

Piruvato + NADH → L-Lactato + NAD

Metodologia:

UV

Significado Clínico:

ALT está presente em altas concentrações no fígado e em menor concentração no rim, coração, musculatura esquelética, pâncreas, baço e pulmão.

Níveis aumentados de ALT resultam geralmente de doenças associadas ao fígado com algum grau de necrose hepática como cirrose, carcinoma, hepatite viral ou tóxica e icterícia obstrutiva. A ALT está geralmente mais alta que o AST em hepatite tóxica ou viral aguda, enquanto que para a maioria dos pacientes com doença hepática crônica, os níveis de ALT são geralmente mais baixos do que os níveis de AST. A relação AST/ALT nas hepatites alcoólicas (com necrose) é geralmente > 1, ao passo que nas hepatites virais é < 1.

Níveis elevados de ALT são também encontrados no trauma extensivo, doenças musculares, falha circulatória com choque, hipóxia, infarto do miocárdio e doença hemolítica.

Reagentes:

Reagente único pronto para uso. Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: 2 - Oxoglutarato 13 mmol/L, L-Alanina 440 mmol/L, NADH 0.12 mmol/L, LDH > 2000 U/L, Tampão Tris 97 mmol/L em pH 7,8 ± 0,1 a 20°C.

O reagente não aberto é estável até a data de vencimento impressa no rótulo do produto, e on board (no compartimento refrigerado do analisador) possuem estabilidade de aproximadamente 30 dias, durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e Cuidados Requeridos:

Este reagente deve ser usado somente para diagnóstico "in vitro". Não pipetar com a boca. Evitar contato com a pele e roupa. No caso de contato com os olhos, lavar com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

Deve-se monitorar a temperatura do ambiente de trabalho bem como o tempo de reação para obtenção de resultados corretos. Não usar se a absorvância inicial estiver menor que 1.000 (convertido para 1,0 cm de espaço ótico) quando medido em 340 nm ou se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco.

Material Necessário não Fornecido:

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorvância em 340 nm.
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Água destilada/deionizada.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. Calibrador e Soros Controle
6. Medidor de tempo.

Amostra:

É recomendável soro livre de hemólise, pois as hemácias contêm ALT. A ALT no soro é estável por 3 dias à temperatura ambiente (< 25°C) e 7 dias se mantido entre 2 - 8°C. A amostra poderá ser congelada (-20°C) por um mês quando vedada. Todas as amostras e controles são considerados potencialmente infectantes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

Preparo do Paciente:

É recomendado um jejum mínimo de 4 horas. Todavia, poderá ser

modificado segundo orientação médica.

Interferências:

Hemoglobina até 60 g/L, Bilirrubina até 22.7 mg/dL e lipemia até 307 mg/dL, medida como triglicérides não interferem significativamente no resultado.

Uma leitura muito baixa, junto com uma pequena mudança de absorvância entre as leituras pode indicar um nível muito alto de ALT. Dilua com solução salina a amostra e repita o teste multiplicando o resultado pelo fator de diluição.

Turbidez ou amostras altamente ictericas podem dar leituras cujas absorvâncias iniciais excedem a capacidade do espectrofotômetro. Resultados mais apurados podem ser obtidos pelo uso de 0.05 mL (50 µL) da amostra e multiplicar a resposta final por 2.

Algumas drogas e substâncias afetam a concentração do ALT, sugerimos consultar Young et al.

Parâmetros do Sistema:

Temperatura: 37°C

Comprimento de Onda: 340 nm.

Tipo de Reação: Cinética de ordem zero

Direção: Decrescente

Relação Amostra/Reativo: 1:10

Vol. Amostra: 100 µL

Vol. Reagente: 1.0 mL

Tempo de Incubação: 30 segundos (retardo)

Intervalo de leitura: 1 minuto.

Número de Intervalo: 2 a 3

Calibração:

Utilizar Quimicalib Ebram cód.7023/12023 que possui a concentração rastreável ao método de referência proposto pelo CLSI, ou realizar a calibração através de fatoração, obtida através da absorção média milimolar do NADH a 340 nm sob condições específicas.

Procedimento Automatizado:

Aplicação no sistema automatizado: vide manual para utilização do equipamento e instruções de uso do reagente.

Aplicação no sistema semi-automático: proceder como demonstrado a seguir no procedimento manual somente até o item 1 (preparação dos tubos), em seguida utilizar o equipamento para leitura, seguindo protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema.

Nota: Adicionar as amostras no tubo somente no momento que antecede a aspiração do equipamento.

Procedimento Manual:

1. Separar 3 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

	Branco	Calib.	Amostra/S.C.
Água destilada	100µL	-	-
Calibrador	-	100µL	-
Amostra/S.C.	-	-	100µL
Reagente	1,0mL	1,0 mL	1,0 mL

2. Adicionar 1.0 mL do reagente em dois tubo e deixe em banho - maria (BM) a 37°C O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio.

4. Adicionar 100µL do calibrador e 100µL de água destilada em cada tubo.

5. Aguardar de 30 segundos

6. Zerar o espectrofotômetro a 340nm com o tubo do branco.

7. Inserir no equipamento o tubo com o calibrador e registrar as absorvâncias A1, A2, A3, considerando A1 a primeira leitura (logo após os 30 segundos de retardo) e as seguintes com 1 minutos de intervalo.

8. Determinar as duas diferenças de absorvância/min (Δ Abs/min), subtraindo cada leitura de sua anterior.

9. Determinar a média das diferenças de absorvância (Δ Abs/min). Proceder em seguida do mesmo modo com os controles e todas as amostras.

Obs.: Procedimento sugerido para espectrofotômetros que requerem volume mínimo de 1,0 mL e podem ser ajustados proporcionalmente sem influência no desempenho do teste. Salientamos que volumes de amostra menores do que 10 µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

Cálculos:

(Abs.=Absorvância)

(Conc. = Concentração)

$$\Delta \text{ Abs. /min} = (A2 - A1) + (A3 - A2) / 2$$

$$\text{TGP da Amostra (U/L)} = \frac{\Delta \text{ Abs /min (amostra)}}{\Delta \text{ Abs /min (Calib)}} \times \text{Conc. Do Calib (U/L)}$$

Exemplo:

Absorvância com o Calibrador

$$A1 = 0,045 / A2 = 0,075 / A3 = 0,147$$

$$\text{Média} = (0,095 - 0,085) + (0,125 - 0,095) / 2$$

$$\text{Média } \Delta \text{ Abs/min (calib)} = 0,02$$

$$\text{Média } \Delta \text{ Abs/min (amostra)} = 0,0125 \text{ (calc. l dem acima)}$$

$$\text{Concentração do Calibrador} = 106 \text{ U/L}$$

$$\text{TGP Amostra} = (0,0125 / 0,02) * 106$$

$$\text{TGP Amostra} = 66 \text{ U/L}$$

$$\text{Obs: nkat/L} = \text{U/L} \times 16,67$$

Linearidade:

Quando executado de acordo com o recomendado, o teste é linear até 400 U/L.

Amostras com valores superiores a 400 U/L devem ser diluídas com solução salina a ponto de ficarem entre 0 - 400 U/L e os resultados devem ser multiplicados pelo fator de diluição.

Controle de Qualidade:

Cada laboratório deve manter um programa interno de qualidade que defina objetivos, procedimentos, normas, limites de tolerância e ações corretivas. Deve-se manter também um sistema definido para se monitorar a variação analítica do sistema de medição. Aconselhamos o uso dos soros controle Quimicontrol Normal e Quimicontrol Anormal Ebram Cód. 7024/12024 e 7031/12031.

Valores Esperados:

Até 36 U/L, baseados nas medições desempenhadas a 37°C.

Estes valores são dados unicamente como título orientativo. É recomendado que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

Estudos Comparativos:

Estudos executados entre este procedimento e uma metodologia similar produziram os seguintes resultados estatísticos:

Número de Amostras:	30
Intervalo dos resultados	5 - 100 U/L
Coefficiente de Correlação:	0.998
Inclinação:	1,00
Intercepta:	1,73 (U/L)

Precisão:

Estudos de precisão foram executados com dois níveis (normal e patológico) sendo que cada amostra fora processada por 10 vezes e os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=10	Nível 1	Nível 2
Média (U/L)	24,9	91,6
D.P. (U/L)	1,2	1,7
C.V. (%)	4,8	1,9

Exatidão:

As amostras foram processadas por 10 dias consecutivos, uma vez por dia e em duplicata. Os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=10	Nível 1	Nível 2
Média (U/L)	25,1	91,4
D.P. (U/L)	2,2	2,6
C.V. (%)	8,8	2,8

Sensibilidade Metodológica:

5 U/L

Especificidade:

Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Observações:

1. A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥ 1 mega ohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos < 0,1 mg/L (água tipo II). Para o enxágue da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade ≥ 0,1 megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágue final utilizar água tipo II.

Apresentação:

Linha Bioquímica Geral: 8 x 15mL

Linha Hitachi 917 / Advia: 3 x 65mL

Linha SAT 450: 2 x 45mL

Linha Bulk: 1 x 500mL

Para mais informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM - tel. (011) 2291-2811, sac@ebram.com ou www.ebram.com

Referência Bibliográfica:

1. Tietz, N.W. Fundamentals of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia pp 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. 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 and Row, New York, p 522 (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, p 1437 (1984).
10. Miller, O., Gonçalves, R.R., Laboratório para o Clínico, 8 ed. Atheneu, (1998).
11. Arquivos da EBRAM.

