

CONTINUT

Doar pentru diagnosticul profesional *in vitro*.

GOT/GPT color

REITMAN-FRANKEL
Metoda colorimetrica
ENDPOINT

PRINCIPIU

Aspartat aminotransferaza (GOT) catalizeaza transferul grupului amino de la aspartat la oxoglutarat cu formare de glutamat si oxalacetat.

L-Aspartate + 2-Oxoglutarate ----->L-Glutamate + Oxalacetate
pH=7.4

Alanin aminotransferaza (GPT) catalizeaza transferul grupului amino de la alanina la oxoglutarat cu formare de glutamat si piruvat.

L-Alanine + 2-Oxoglutarate -----> Glutamate + Pyruvate
pH=7.4

Activitatea transaminazelor este proportionala cu cantitatea de oxalacetat sau piruvat format intr-o perioada definita de timp si este masurata prin reactia cu 2.4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) si masurata ca intensitate a culorii intr-un mediu alcalin.

COMPOZITIA REACTIVULUI

R1a Substrat GOT. Phosphate buffer 100 mmol/L pH 7.4, L-aspartate 200 mmol/L, ketoglutarate 2 mmol/L.

R1 Substrat GPT. Phosphate buffer 150 mmol/L pH 7.4, L-alanine 200 mmol/L, ketoglutarate 2 mmol/L.

R2 DNPH. 2-4-Dinitrophenylhydrazine 1 mmol/L. Colorant . **X:R:36/37/38 S: 26-37.**

R3 NaOH 4N (10x). Hidroxid de sodiu 4 mol/L. CAUSTIC. **R:35 S: 26-37/39-45.**

CAL Standard piruvat. 1.8 mmol/L. Standard secundar.

CONSERVARE SI STABILITATE

1. Reactivii raman stabili pana la data de expirare imprimata pe flacon, daca sunt stocati la frigider (2-8°C) cu capacul bine strans. Evitati contaminarea reactivilor in timpul folosirii. Nu folositi reactivii dupa data expirarii.

PREPARAREA REACTIVILOR

Reactivii: substrat, standard si colorant sunt gata preparati, pentru folosirea imediata.

Solutia de lucru 0.4 N NaOH: Cu ajutorul unei palnii puneti continutul sticlei de NaOH concentrat 10X intr-un balon cotat de 2 l, clatiti flaconul cu cateva volume de apa distilata, completati pana la semn si amestecati. Solutia se incalzeste. Lasati sa se raceasca la temperatura camerei si completati pana la volumul final. Amestecati din nou si stocati intr-un recipient din polietilena bine inchis, la temperatura camerei.

PROBELE

Ser nehemolizat.

Transaminazele sunt stabile in ser timp de 24 ore la temperatura camerei si 1 saptamana la 2-8 °C.

INTERFERENTE

Serul provenit de la pacienti sub hemodializa, cu deficienta severa de vitamina B, sau cu afectiuni conexe, vor avea rezultatele activitatilor GOT GPT subestimate.

Serurile puternic hemolizate un sunt adecvate metodei de testare.

Alte medicamente si substante pot influenta nivelul GOT si GPT ².

MATERIALE NECESARE, NEFURNIZATE

Fotometru sau colorimetru pentru masuratori la 505 nm ± 15 nm.

Baie de apa termostata 37°C (± 1°C).

Ceas de laborator.

Pipete de 5.0 mL, 1.0 mL si 0.1 mL.

Cuvete, eprubete.

PROCEDURA

1. Aduceti reactivi si probele la temperatura camerei.
2. Pipetati in eprubete sau cuvete etichetate corespunzator .

TUBUL	Blank	GOT	GPT
Substrat GOT	0.5 ml	0.5 ml	-
Substrat GPT	-	-	0.5 ml

Incalziti la 37 °C timp de 5 minute.

Adaugati:

Ser	-	100 uL	100 uL

Amestecati si repuneti in baia termostata

		60 min	30 min

Adaugati

DNPH	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml

Amesetcati. Lasati sa stea la temperatura camerei 20 minute.

Adaugati

NaOH 0.4N	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml

Amestecati prin intoarcerea eprubetei. Lasati 20 minite la temperatura camerei.

3. Cititi absorbantele probelor (A) fata de blank (Nota 1).

Culoarea obtinuta este stabila timp de 1 ora.



CS/00/034

CALCULE

Din valorile citite ale absorbantei, cititi unitatile activitatii GOT sau GPT din curbele corespunzatoare. Pentru activitati mai ridicate de 200 WU (GOT) sau 100 WU (GPT) repetati testarea diluand proba 1:10 cu solutie salina. Inmultiti rezultatele obtinute cu 10 (Nota 2)

UNITATI

Conversia unitatilor colorimetrice in unitati UV obtinute prin metoda cinetica optimizata (IFCC, 1985) un se poate face prin utilizarea unui factor ca si in cazul procedurii UV Karmen (1995),^{3,4}.

VALORI DE REFERINTA

GOT/AST 8-40 WU/L
GPT/ALT 5-30 WU/L

Valorile in intervalul 40-50 WU (GOT) si 30-40 WU (GPT) sunt considerate valori limita.

CONTROLUL DE CALITATE

Pentru asigurarea unui control al calitatii se recomanda analizarea unui set de controale (cu nivele normale si anormale) pentru fiecare lot de paciente. Probele de control trebuie analizate ca anonime, cu rezultate necunoscute.

SEMNIFICATIA CLINICA

Grupul de enzime numite transaminaze exista in tesuturile mai multor organe. Activitatea necrotica in aceste organe cauzeaza o eliberare in fluxul sangvin a unor cantitati anormale din aceste enzime.

Deoarece tesutul cardiac este bogat in GOT, infarctul miocardic conduce la observarea de valori crescute ale GOT.

Tesutul hepatic este bogat in special in GPT. Determinarea acestei enzime este folosita in principal ca un teste pentru hepatite. In hepatitele infectioase activitatea GPT este in cele mai multe cazuri mai crescuta decat activitatea GOT dar amandoua sunt crescute. Se considera la modul general ca activitatea GOT este folosita pentru diagnosticarea infarctului

miocardic acut, in timp ce valorile GPT sunt folosite in diagnosticul hepatitelor infectioase. Nici unul dintre teste nu este specific.

NOTE

1. Rezultatele pot fi citite fata de un zero facut cu apa distilata. Cu toate acestea tehnica citirii fata de reactivul blank si stabilirea acestuia la 0.250 A ajuta in compensarea micilor schimbari care pot aparea in reactiv sau in aparat.
2. Dilutiile serurilor un valori in proportie exacta cu rata folosita pentru dilutie.
3. Acest standard, folosit cum este descris, da o curba care se apropie mai mult de metoda de referinta care foloseste standardul de 2 mmol/L recomandata de Reitman si Frankel.

REFERENCES

1. Reitman, S. and Frankel, S. J. Clin. Pathol, 28:56 (1957).
2. Young, D.S. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 4th Edition. AACC Press (1995).

CALIBRAREA

1. Pipetati (ml) in tuburi etichetate corespunzator

tubul	Standard piruvat	Substrat GOT	H ₂ O	WU/ml GOT	WU/ml GPT
1	-	1.0	0.2	0	0
2	0.1	0.9	0.2	22	25
3	0.2	0.8	0.2	55	50
4	0.3	0.7	0.2	95	83
5	0.4	0.6	0.2	150	126
6	0.5	0.5	0.2	215	

2. Aduagati in fiecare tub 0.5 mL de DNPH. amestecati
3. Aduagati in fiecare tub 5.0 mL de NaOH 0.4 N. amestecati
4. Faceti blankul cu apa distilata.
5. Folosind hartie milimetrice lineara trasati un grafic al *unitatilor de activitate* din tabelul de mai sus in functie de *absorbantele corespunzatoare* (A) cu citire la 505 nm. Verificati curba periodic (Nota 3).