

Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la alanina aminotransferasa en suero sanguíneo humano

Sociedad Española de Química Clínica. Comité Científico, Comisión de Enzimas

F.J. Gella¹, J. Arenas, J. Carreras, R. Durbán, A. Galán, R. Moreno, M.C. Pastor

Documento C²

Fase 3 Versión 2

1. Introducción

La alanina aminotransferasa (ALT, EC 2.6.1.2) es una enzima que cataliza la transferencia reversible del grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato:

L-alanina + 2-oxoglutarato \rightleftharpoons piruvato + L-glutamato

En el mecanismo de reacción participa el fosfato de piridoxal como coenzima (1).

La alanina aminotransferasa se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos humanos (hígado, riñón, corazón, músculo estriado, páncreas, bazo, pulmón) siendo con notable diferencia el hígado donde se encuentra mayor actividad en los mamíferos.

La actividad catalítica elevada de alanina aminotransferasa en suero se debe primordialmente a alteraciones del parénquima hepático causadas por diversas enfermedades o por la medicación. De entre los diversos métodos que se han empleado para la determinación de la concentración catalítica de alanina aminotransferasa en suero humano (2), sólo los métodos continuos han sido recomendados por algunas sociedades de Química Clínica. La Fe-

deración Internacional de Química Clínica (IFCC), publicó un "método de referencia" (3) en el que se estudian las condiciones óptimas de la reacción saturando la enzima con fosfato de piridoxal con objeto de lograr la máxima actividad catalítica de la muestra problema. Sin embargo, el método de referencia recomendado por la IFCC presenta ciertos inconvenientes para su implantación en la rutina de los laboratorios clínicos, ya que se requiere un tiempo de preincubación prolongado que a menudo no es posible adaptar a un analizador automático y utiliza además una serie de blancos que complican la determinación con fines de rutina.

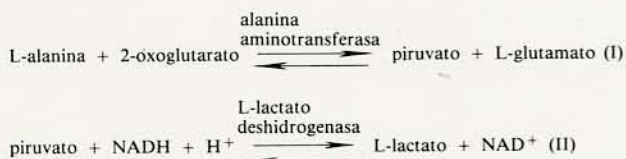
Es por ello que esta Comisión ha estudiado la adaptación de las condiciones de reacción del método de la IFCC a la temperatura de 37,0 °C, así como la simplificación del procedimiento de forma que resulte sencilla su adopción por todos los laboratorios (ver Anexo 2). El "método de rutina" resultante, recomendado por la Sociedad Española de Química Clínica, ha sido comparado con el método de referencia de la IFCC (4).

2. Fundamento

El método recomendado para la determinación de alanina aminotransferasa en suero se basa en dos reacciones: (I) la reacción catalizada por la alanina aminotransferasa y (II) la reacción indicadora.

¹ Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina (Hospital de la Sta. Cruz y San Pablo). Universidad Autónoma de Barcelona. S. Antonio M^o Claret, 167. 08025 Barcelona.

² Esta versión del documento B sólo difiere de la versión 1 en que se han corregido numerosos errores de edición.



El equilibrio de la reacción (II) está desplazado hacia la derecha así como el equilibrio de la reacción (I), ya que el piruvato reacciona inmediatamente en la reacción indicadora. El método descrito está basado en los principios desarrollados por Wroblewski (5), con la introducción de las siguientes modificaciones: optimización de la concentración de sustrato, sustitución de tampón fosfato por tris(hidroximetil) aminometano (Tris) y adición de fosfato de piridoxal.

3. Condiciones recomendadas para la medición

Las condiciones recomendadas para la determinación en suero son las siguientes:

Temperatura	37,0 °C
pH (37°)	7,3
Tris(hidroximetil)aminometano	100 mmol/L
L-Alanina	500 mmol/L
2-Oxoglutarato	15 mmol/L
Fosfato de piridoxal	0,1 mmol/L
NADH	0,18 mmol/L
Lactato deshidrogenasa	20 $\mu\text{kat/L}$ (1200 U/L)
Fracción de volumen de muestra	0,05 (1:20)

Las concentraciones indicadas corresponden a la mezcla de reacción final. La concentración catalítica recomendada para la lactato deshidrogenasa es la obtenida empleando el procedimiento descrito por la IFCC (3).

Con el fin de saturar la alanina aminotransferasa con fosfato de piridoxal y para permitir que se completen las posibles reacciones del NADH con sustancias presentes en el suero, especialmente con el piruvato, se preincuba la mezcla de reacción durante dos minutos antes de iniciarse el período de medición de la actividad catalítica (7).

4. Instrumentación y equipo

Es necesario un espectrómetro óptico o analizador automático capaz de efectuar lecturas a la longitud de onda de 339 nm, con un portacubetas termostatzado. Las características del equipo (anchura de banda, camino óptico, exactitud de los termostatos) deben cumplir las recomendaciones indicadas por la IFCC (6).

5. Obtención transporte y almacenamiento de la muestra

La sangre debe de extraerse con la mínima éstasis venosa posible. Siempre es preferible el uso de suero fresco procedente de una muestra sin hemólisis visible. No es recomendable el uso de plasma.

En ausencia de contaminación bacteriana grosera, la alanina aminotransferasa en suero permanece estable a 0-4 °C durante un mínimo de tres días al abrigo de la luz.

6. Reactivos

Los reactivos empleados deben cumplir las especificaciones establecidas por la IFCC (6). Las enzimas auxiliares empleadas en la reacción deben estar desprovistas de actividades catalíticas interferentes de tal forma que la velocidad medida en el blanco de reactivos (sustituyendo la muestra por NaCl 154 mmol/L) sea inferior a 0,001 unidades de absorbancia por minuto.

Composición del reactivo de trabajo:

Tris(hidroximetil)aminometano 105 mmol/L, L-alanina 525 mmol/L, 2-oxoglutarato 15,7 mmol/L, fosfato de piridoxal 0,10 mmol/L, NADH 0,19 mmol/L, lactato deshidrogenasa 20 $\mu\text{kat/L}$ (1200 U/L), pH 7,3.

7. Procedimiento analítico

Condiciones operatorias

Longitud de onda: 339 nm (± 1 nm).

Paso de luz: $1,00 \pm 0,001$ cm.

Volumen final de la mezcla de reacción: 2,10 mL.

Temperatura: 37,0 °C $\pm 0,05$ °C.

Esquema analítico

Preincubar la muestra y el reactivo de trabajo a 37,0 °C
Pipetear:

Reactivo de trabajo	2,00 mL
Muestra	0,100 mL

Mezclar e incubar inmediatamente a 37,0 °C. A los dos minutos de iniciarse la reacción, registrar los cambios de absorbancia durante 3 minutos.

8. Cálculos

Calcular el $\Delta A/\text{min}$ obtenido para el intervalo de mediciones. Los valores de $\Delta A/\Delta t$ deben ser constantes durante todo el intervalo.

Teniendo en cuenta el coeficiente de absorción molar del NADH a 339 nm es de $630 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$ se deducen las siguientes ecuaciones:

$$\Delta A/\text{min} \times 5550 = \text{nkat/L}$$

$$\Delta A/\text{min} \times 3333 = \text{U/L}$$

9. Linealidad

La concentración catalítica de alanina aminotransferasa es proporcional a la velocidad de reacción hasta 8333 nkat/L (500 U/L) en muestras con concentración de piruvato endógeno fisiológica (hasta 150 $\mu\text{mol/L}$).

Cuando las muestras tienen altas concentraciones de alanina aminotransferasa o de piruvato, la mayor parte del NADH puede ser consumido antes de iniciarse el período de lecturas de absorbancia. En éstos casos la velocidad de medida es demasiado baja o incluso inapreciable, debiéndose repetir la medida una vez diluida la muestra de 5 a 10 veces con cloruro sódico 154 mmol/L (solución salina fisiológica) y repetir la valoración.

10. Valores usuales

Los valores usuales que se hallan en el suero de personas adultas sanas, son inferiores a 1050 nkat/L (65 U/L).

11. Interferencias

Se ha demostrado que la administración de diversos medicamentos a los pacientes va acompañada de cambios en la actividad de alanina aminotransferasa del suero. No en todos los casos se sabe si el efecto es debido a factores fisiológicos, patológicos o farmacológicos o si es debido a una interferencia con el método analítico.

12. Bibliografía

1. Bramstein AE. Amino Group Transfer. En: PD Boyer, ed. The Enzymes, Vol. IX. Academic Press: New York, 1973: 379-481.
2. Gella FJ. Aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa: Estudio crítico de los métodos utilizados para su determinación. Quim. Clin. 1986; 5:127-138.
3. Bergmeyer HU, Horder M. IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase. Clin. Chim. Acta 1980; 105: 147F-154F.
4. Gella FJ, Carreras J, Chabas J, de la Fuente G, Guinovart JJ, Iglesias J, Pena JM, Pastor MC, Gómez JA. Consideraciones generales sobre la determinación de la concentración catalítica de una enzima en suero o plasma sanguíneo humano. Quim. Clin. 1983; 2:107-110.
5. Wroblewski F, La Due JS. Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1956; 91:569-571.
6. Bowers GN, Bergmeyer HU, Horder M, Moss DW. Approved recommendation (1978) on IFCC Methods for measurement of catalytic concentrations of enzymes Part 1. General considerations concerning the determination of the catalytic concentration of an enzyme in the blood serum or plasma of man. Clin. Chim. Acta 1979; 98:163F-174F.
7. Gella FJ, Olivella T, Pastor MC, Arenas J, Moreno R, Durban R and Gomez JA. A simple procedure for the routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. Clin. Chim. Acta 1985; 153:241-247.

Anexo I: Método de referencia de la Federación Internacional de Química Clínica para la determinación de alanina aminotransferasa en suero humano

El método que se describe a continuación es un resumen del publicado por la Comisión de Expertos en Enzimas (EPE) de la Federación en 1980 (3), basado en los mismos principios enunciados en la descripción del método de rutina recomendado por la Sociedad Española de Química Clínica en este documento.

Reactivos

Los reactivos utilizados deben cumplir las condiciones de calidad y pureza establecidas (3,6).

SOLUCION I: Tris/HCl 120 mmol/L (pH 7,3 a 30 °C).

SOLUCION II: Tris 120 mmol/L, L-alanina 600 mmol/L, fosfato de piridoxal 0,12 mmol/L, NADH 0,21 mmol/L, lactato deshidrogenasa 24 μ kat/L (pH 7,3 a 30 °C).

SOLUCION III: Composición idéntica a la solución II, sustituyendo la L-alanina por D-alanina.

SOLUCION IV: 2-Oxoglutarato 180 mmol/L (pH 7,3 a

30 °C).

SOLUCION V: Cloruro sódico 154 mmol/L (solución salina fisiológica).

Procedimiento de medida

Condiciones operatorias:

Longitud de onda: 339 nm (± 1 nm).

Paso de luz: 1,00 \pm 0,001 cm.

Volumen final de la mezcla de reacción: 2,40 mL.

Temperatura: 30,0 °C \pm 0,05 °C.

Cada medida es el resultado de la determinación de cuatro velocidades de reacción: la de la reacción total (A), la del blanco de reactivos para la reacción total (B), la del blanco de muestra (C) y la del blanco de reactivos para el blanco de muestra (D).

Todas estas medidas se efectúan frente a una cubeta con agua destilada.

Tipo de determinación	Muestra	Reactivo
Reacción total (A)	Suero	II
Blanco de reactivos reacción total (B)	Solución V	II
Blanco de muestra (C)	Suero	III
Blanco de reactivos del blanco muestra (D)	Solución V	III

En cada caso la reacción debe iniciarse por adición de la solución IV a la mezcla de reacción previamente atemperada a 30,0 °C.

Esquema analítico

Pipetear en la cubeta:

Reactivo (II o III)	2,00 mL
Muestra (Suero o Solución V)	0,200 mL

Mezclar e incubar 10 minutos. Añadir:

2-Oxoglutarato (Solución IV)	0,200 mL
------------------------------	----------

Mezclar y registrar el cambio de absorbancia durante 5 minutos.

Cálculos

El valor promedio del incremento de absorbancia con respecto al tiempo ($\Delta A/\Delta t$) para la reacción total, debe ser corregido por los valores de velocidades en las mezclas de reacción utilizadas como blancos.

$$(\Delta A/\Delta t)_{\text{corregido}} = [(\Delta A/\Delta t)_A - (\Delta A/\Delta t)_B] - [(\Delta A/\Delta t)_C - (\Delta A/\Delta t)_D]$$

A, B, C y D indican las reacciones referidas anteriormente. En los cálculos debe utilizarse el valor corregido de $\Delta A/\text{min}$.

Si el $\Delta A/\text{min}$ es superior a 0,150 o disminuye durante el

Tabla I
Comparación entre el procedimiento recomendado por la SEQC (y) y el método de referencia de la IFCC (x).

Coefficiente de correlación	: 0,9975
Pendiente	: 0,979
Intervalo de confianza del 95%	: 0,97 a 0,99
Intersección	: 0,84 U/L
Intervalo de confianza del 95%	: -1,28 a 2,97 U/L
Número de muestras	: 90

Tabla II
Efecto del piruvato sobre la determinación de ALT por el método de la SEQC.

Suero A	Sin adiciones	144 U/L
	Piruvato 1 mmol/L	139 U/L
Suero B	Sin adiciones	28 U/L
	Piruvato 1 mmol/L	27 U/L

período de medida, es necesario diluir la muestra de 5 a 10 veces con solución V y repetir la medida. La concentración catalítica se calcula utilizando los factores siguientes:

$$\Delta A/\text{min} \times 31750 = \text{nkatal/L}$$

$$\Delta A/\text{min} \times 1905 = \text{U/L}$$

Anexo 2: Comparación entre el método de rutina recomendado por la SEQC y el método de referencia de la IFCC

El método de referencia propuesto por la IFCC para la determinación de la concentración catalítica de ALT en suero humano presenta los mismos inconvenientes para su implantación como método de rutina que se señalaron para el caso de la AST, especialmente debido a la preincubación

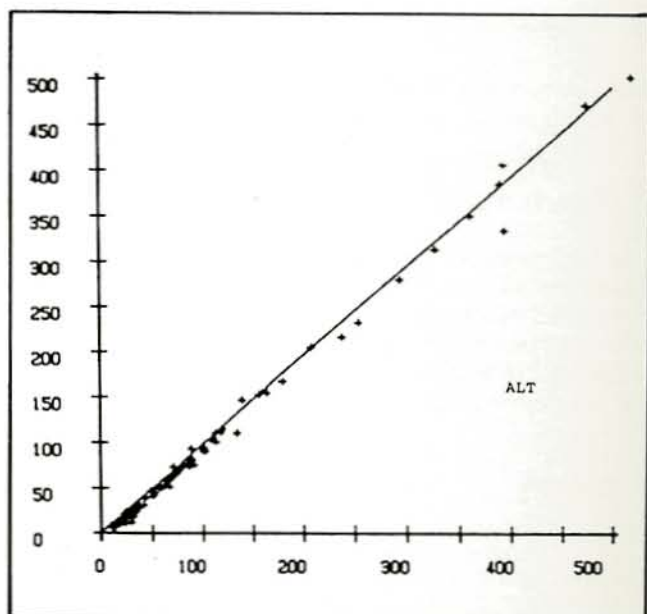


Figura 1. Comparación del procedimiento recomendado por la SEQC con el método de referencia de la IFCC. Las concentraciones catalíticas se representan en U/L.

de la muestra durante 10 minutos en presencia de fosfato de piridoxal para saturar la enzima. Esta Comisión ha comprobado que cuando se incubaban las muestras séricas a 37 °C con un "monorreactivo" que contenía todos los componentes de la reacción ALT y fosfato de piridoxal, se completaba la reactivación de la apo-ALT en tan sólo 1-2 minutos de incubación.

Los valores de concentración catalítica de ALT obtenidos tras 2 minutos de incubación a 37 °C eran prácticamente coincidentes con los valores determinados empleando el procedimiento de la IFCC a la misma temperatura (Figura 1, Tabla I).

El piruvato sérico, posible interferencia en la valoración, era totalmente consumido durante el período de preincubación de 2 minutos (Tabla II).

Estos resultados son similares a los descritos para la AST presente en suero humano (Documento B, Anexo 2).