



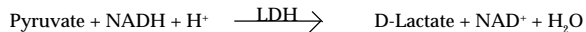
## Stanbio ALT/GPT (Liqui-UV®) Procedure No. 2930

For the Kinetic Quantitative Determination of ALT/  
GPT in Serum for Manual and/or Automated  
Procedures

### Summary and Principle

The enzyme alanine aminotransferase is widely reported in a variety of tissue sources. The major source of ALT is of hepatic origin and has led to the application of ALT determinations to the study of hepatic diseases. Elevated serum levels are found in hepatitis, cirrhosis, and obstructive jaundice. Levels of ALT are only slightly elevated in patients following a myocardial infarction.<sup>1</sup>

UV methods for ALT determination were first developed by Wroblewski and LaDue in 1956.<sup>2</sup> The method was based on the oxidation of NADH by lactate dehydrogenase (LDH). In 1980, the International Federation of Clinical Chemistry recommended a reference procedure for the measurements of ALT based on the Wroblewski and LaDue procedure. The Stanbio ALT reagent is based on a modified formulation of the IFCC<sup>3</sup> and Bergmeyer<sup>4</sup> methods.



Alanine aminotransferase (ALT) catalyzes the transfer of the amino group from alanine to 2-oxoglutarate, to form glutamate and pyruvate. The pyruvate formed is then reduced to lactate in the presence of LDH, with simultaneous oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). The rate of decrease in absorbance at 340 nm is directly proportional to ALT activity.

### Reagent

#### ALT Buffer (R1), Ref. No. 2931

Composition:

|                     |            |
|---------------------|------------|
| L-Alanine           | 500 mmol/L |
| LDH (rabbit muscle) | 1200 U/L   |
| Tris Buffer, pH 7.5 | 100 mmol/L |

#### ALT Enzyme (R2), Ref. No. 2932

Composition:

|                      |             |
|----------------------|-------------|
| 2 - Oxoglutarate     | 15 mmol/L   |
| NADH (Disodium salt) | 0.18 mmol/L |

**Precautions:** The reagents are for "In Vitro Diagnostic Use". Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. The reagents contain sodium azide which may be toxic if ingested. Sodium azide may also react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Refer to Material Safety Data Sheet for any updated risk, hazard or safety information.

**Reagent Preparation:** Buffer and Enzyme liquid reagents are supplied ready-to-use. Prepare Working Reagent in the ratio of 5 parts Buffer (R1) to 1 part Enzyme (R2), (i.e., 25 mL Buffer and 5 mL Enzyme).

**Reagent Storage and Stability:** Reagents are stable until the expiration date on their respective labels, when properly stored at 2-8°C and protected from light. Reagents should appear clear and colorless. Discard if either appears cloudy or contains particulate matter. The Working Reagent is stable for 4 weeks at 2-8°C or 5 days at room temperature (15-30°C). The Working Reagent should be discarded if the initial absorbance, read against distilled water at 340 nm, is below 0.800.

### Material Required But Not Provided

Spectrophotometer capable of absorbance reading at 340 nm and 1 cm lightpath

Constant temperature block or bath, 37°C, or temperature controlled cuvette well

Accurate pipetting devices      Test tubes      Interval timer

### Specimen Collection and Storage

Non-hemolyzed serum is the specimen of choice. Whenever possible specimens should be separated and analyzed on the day of collection. Store serum in stoppered tubes. About 10% ALT is lost 3 days at 4°C and in 1 day at 25°C.<sup>5</sup>

**Interfering Substances:** Hemolysis must be avoided as the concentration of ALT in red cells is roughly 5 times that of serum.<sup>2</sup> Bilirubin levels up to 40 mg/dL and triglyceride levels up to 2000 mg/dL show no interference in this test.<sup>8</sup> Certain drugs and other substances are also known to affect ALT values.<sup>6</sup>

### Manual Procedure

1. Prepare ALT Working Reagent according to instructions.
2. Zero spectrophotometer at 340 nm with distilled water.
3. For each sample and control, add 1.0 mL Working Reagent to cuvette or test tube and warm to 37°C for 3 minutes.
4. Add 100 µL (0.10 mL) serum to its respective tube and mix gently.
5. Read and record absorbance at 1 minute. Continue incubating at 37°C and record absorbance again at 2 and 3 minutes. Rate should be constant.
6. Determine the average absorbance per minute (ΔA/min), multiply by factor -1746 for results in U/L.

NOTE: If cuvette is not temperature controlled, incubate samples at 37°C between readings.

**Quality Control:** Stanbio Ser-T-Fy I, Normal Control Serum, Cat. No. G427-86 and Stanbio Ser-T-Fy II, Abnormal Control Serum, Cat. No. G428-86 are recommended for each run. Other commercially available controls with ALT values assayed by this method are also suitable. ALT activity determined in these materials, by this procedure should fall within the ranges stated for the controls. Two levels of controls should be analyzed with each run.

**Calibration:** ALT activity is based on the "micromolar extinction coefficient" of NADH at 340 nm (see "Results" section). The instrument manufacturer's calibration guidelines should be followed to calibrate your analyzer. Assaying the ALT contents of a control serum with known ALT values can be used to assure instrument calibration has been performed correctly.

### Results

Values are derived based on the "absorptivity micromolar extinction coefficient" of NADH at 340 nm (0.0063). Units per liter (U/L) of ALT/GPT activity is that amount of enzyme which oxidizes one µmol/L of NADH per minute.

$$\text{U/L} = \frac{\Delta A / \text{Min}}{\text{Absorptivity}} \times \frac{\text{Total Volume}}{\text{Sample Volume}}$$

$$\text{U/L} = \frac{\Delta A / \text{Min}}{0.0063} \times \frac{1.10}{0.10}$$

$$\text{U/L} = \Delta A / \text{Min} \times 1746$$

### Limitations

If the ΔA/min. is greater than 0.342, dilute 1 part sample with 9 parts isotonic saline and re-assay. Multiply the result by 10. ALT values for neonatal patients have not been established with this procedure. Grossly icteric or turbid specimen may require the use of a sample blank.

### Expected Values<sup>8</sup>

Normal Range: 3 - 35 U/L (37°C)

This range should serve only as a guideline. It is recommended that each laboratory establish its own range of expected values, since differences exist between instruments, laboratories, and local populations.

### Performance Characteristics

**Comparison:** A group of 82 sera ranging in ALT activity from 3 - 682 U/L was assayed by the described ALT method and by a similar commercially available ALT reagent. Comparison of the results yielded a correlation coefficient of 0.999 and the regression equation was  $y = 0.988x + 0.43$ . (Comparison studies were performed according to NCCLS Tentative Guideline, EP9-T.)

**Precision:** Within-run precision was established by 20 assays on three different levels of commercial serum controls. Total Precision values were obtained by assaying the 3 commercial controls for 5 consecutive days.

|                      | Within-Run |         |         |
|----------------------|------------|---------|---------|
|                      | Serum 1    | Serum 2 | Serum 3 |
| Mean ALT (U/L)       | 22         | 45      | 102     |
| Std. Deviation (U/L) | 1.4        | 1.2     | 1.0     |
| C.V. (%)             | 6.2        | 2.6     | 1.0     |

|                      | Total Precision |         |         |
|----------------------|-----------------|---------|---------|
|                      | Serum 1         | Serum 2 | Serum 3 |
| Mean ALT (U/L)       | 23              | 43      | 99      |
| Std. Deviation (U/L) | 0.7             | 0.7     | 0.9     |
| C.V. (%)             | 3.1             | 1.6     | 0.9     |

Precision studies were performed according to NCCLS Tentative Guideline, EP5-T.

**Linearity:** Linear to 600 U/L at 37°C.<sup>8</sup> Performed according to NCCLS Guideline EP6-P.

**Sensitivity:** Based on an instrument resolution of A = 0.001, the method presented shows a sensitivity of 2.0 U/L.

### References

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. Provisional Concentrations of Enzymes. Clin Chem 23: 887, 1977.
4. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW: Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin Chem 24: 58, 1978.
5. Bergmeyer, H.U. Principles of Enzymatic Analysis. Verlag Chemic, 1978.
6. Young D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests. AACC Press, Washington D.C., 1990
7. Henry JB. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 17th ed. WB Saunders Co., 1984, p 1437.
8. Stanbio Laboratory Data

Manufactured By:

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006 USA  
Ph: (830) 249-0772 • Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com  
http://www.stanbio.com

DN: RBR.2930CE.01 • Last Revision: 01/04 • Procedure No. 2930CE



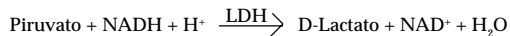
## Stanbio ALT/SGPT (Liqui-UV®) Procedimiento No. 2930

Para la determinación cinética cuantitativa de la ALT/SGPT en suero, para procedimientos Manuales o Automatizados.

### Resumen y Principios

La enzima alanina aminotransferasa (ALT), es reportada en una amplia variedad de tejidos. La principal fuente de ALP, es de origen hepático y su determinación se ha aplicado para el estudio de enfermedades hepáticas. Niveles séricos elevados se hallan en hepatitis, cirrosis e ictericia obstructiva. En los pacientes que han sufrido infarto del miocardio, los niveles de ALT están solo, ligeramente elevados.<sup>1</sup>

Los métodos UV para la determinación de ALT, fueron primeramente desarrollados por Wroblewski y LaDue en 1956.<sup>2</sup> El método se basó en la oxidación del NADH por medio de la Lactatodeshidrogenasa (LDH). En 1980, la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC), recomendó un procedimiento de referencia para la determinación de ALT, basado en el método de Wroblewski y LaDue. El reactivo ALT se ajusta a la formulación recomendada por los métodos de la IFCC<sup>3</sup> y de Bergmeyer.<sup>4</sup>



La Alanina aminotransferasa (ALT), cataliza la transferencia del grupo amino, desde una Alanina hasta un 2-oxoglutarato, para formar Glutamato y Piruvato. El Piruvato formado en la primera reacción, se reduce a lactato, en presencia de LDH y NADH. La actividad del ALT, se determinó midiendo el valor total de oxidación del NADH a 340 nm.

### Reactivos

#### ALT Buffer (R1), Cat. No. 2931

|                         |            |
|-------------------------|------------|
| Composición:            |            |
| Tris, pH 7.5            | 100 mmol/L |
| L-Alanina               | 500 mmol/L |
| LDH (músculo de conejo) | 1200 U/L   |

#### Enzima ALT (R2), Cat. No. 2932

|                    |             |
|--------------------|-------------|
| Composición:       |             |
| 2-Oxoglutarato     | 15 mmol/L   |
| NADH (Sal Disodio) | 0.18 mmol/L |

**Precauciones:** Los reactivos son para uso de diagnóstico in vitro. Precauciones normales en el manejo de los reactivos en el laboratorio deben ser seguidas. Los reactivos contienen azide de sodio que puede ser tóxico si se ingiere. El azide de sodio también puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías formando metales azide altamente explosivos. Referirse a las hojas de Materiales de Seguridad para estar al tanto de la información de seguridad y riesgos.

**Preparación del Reactivo:** Los reactivos líquidos de buffer y enzima, son suministrados ya listos para su uso. Prepare el reactivo con el que trabajará a razón de 5 partes de buffer (R1) y 1 de enzima (R2) (ej: 25 mL de buffer y 5 mL de enzima)

**Almacenamiento y Estabilidad del Reactivo:** El reactivo se mantiene estable hasta la fecha de expiración que está en la etiqueta y cuando se almacena adecuadamente de 2 a 8°C y protegido contra la luz. Los reactivos deben verse claros y sin color. Desechélo si alguno aparece turbio o si contiene partículas de materia.

El reactivo a utilizar, está estable por 4 semanas si se mantiene de 2 a 8°C o 5 días a temperatura ambiente (de 15 a 30°C). El reactivo para trabajar, deberá ser desechado si la absorbancia inicial, leída contra el agua destilada a 340 nm, está bajo de 0.800.

### Materiales Requeridos Pereo No Incluidos

Espectrofotómetro capaz de leer absorbancias a 340 nm y 1 cm para paso de luz • Baño María (37°C) o celdillas de temperatura controlada • Pipetas capaces de medir exactamente • Tubos de prueba • Cronómetro

### Recolección y Preparación de la Muestra<sup>2,5,6,8</sup>

El suero no hemolizado, es la muestra de elección. Siempre que sea posible, los especímenes deben ser separados y analizados el día que se recolectan. Guarde el suero en tubos bien tapados. Cerca de 10% del ALT se pierde en 3 días a 4°C ó en un día a 25°C.

**Interferencia de Sustancias:** La hemólisis debe ser evitada porque la concentración de ALT en las células rojas excede 10 veces la del suero. Ciertas drogas y otras sustancias también se conocen que afectan los valores del ALT. Los niveles de Bilirrubina arriba de 40 mg/dL y los de triglicéridos hasta 2000 mg/dL, no muestran interferencia en esta prueba.

### Procedimiento Automatizado

Adaptaciones especiales para analizadores automatizados están disponibles solo contactando con el Departamento de Servicio al Cliente de Stanbio.

### Procedimiento Manual

1. Prepare el reactivo de ALT con la que va a trabajar de acuerdo a las instrucciones.
2. Calibre el cero del espectrofotómetro a 340 nm con agua destilada.
3. Para cada muestra y control, anada 1.0 mL del reactivo dentro de la cubeta o en un tubo de prueba e incube por 3 minutos a 37°C.
4. Agregue 100 µL (0.100 mL) de suero a sus respectivos tubos y mezcle suavemente.
5. Lea y anote el cambio en la absorbancia cada minuto. Continúe incubando a 37°C y anote los cambios en la absorbancia nuevamente a 2 y 3 minutos. Los valores deberán ser constantes.
6. Determine el promedio de la absorbancia por minuto (A/Min), multiplíquelos por el factor 1746 para obtener resultados en U/L.

**NOTA:** Si la cubeta no tiene temperatura controlada, incube las muestras a 37°C entre cada lectura.

**Control de calidad:** El control de suero normal Ser-T-Fy® I, Cat. No. G427-86 y el control de suero abnormal Ser-T-Fy® II, Cat. No. G428-86 son recomendables para verificar precisión y exactitud. Otros controles comerciales disponibles con valores de ALT ensayados por este método son también convenientes. La actividad de la ALT determinada en esos materiales, por este procedimiento, deberá caer dentro de los rangos fijados para los controles. Dos niveles de controles deben ser analizados cada día que se prueben.

**Calibración:** La actividad de la ALT, se basa en "un coeficiente de extinción micromolar" de NADH a 340 nm (vea la sección de "Resultados"). La guía de calibración del instrumento por el fabricante, debe ser seguido para calibrar su analizador.

### Resultados

Los valores se derivan en base al "coeficiente de extinción de absorptividad micromolar" de NADH 340 nm (0.0063). La actividad en unidades por litro (U/L) de ALT/SGPT, es la cantidad de enzima que produce 1 nmol/L de NADH por minuto.

$$U/L = \Delta / \text{Min} / \text{Absorptividad} \times \text{Volumen total} / \text{Volumen de la muestra}$$

$$U/L = \Delta A / \text{Min} / 0.0063 \times 1.100 / 0.100$$

$$U/L = \Delta A / \text{Min} \times 1746$$

### Limitaciones

Si el  $\Delta A / \text{Min}$ , es mayor de .342, diluya una parte de la muestra con 9 partes de salina isotónica y vuelva a probar. Multiplique los resultados por 10.

### Valores Esperados<sup>8</sup>

El Rango normal (en adultos): 3 - 35 U/L (37°C)

Este rango únicamente debe servir como guía. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de valores esperados, ya que existen diferencias entre instrumentos, laboratorios y la población local.

### Características

**Comparación:** Un grupo de 82 sueros dentro de un rango de actividad ALT de 3 a 682 U/L, fueron probados por el método ALT descrito y por un reactivo comercial similar disponible. Al comparar resultados se produjo un coeficiente de correlación de 0.999 y la ecuación de regresión fue  $y = 0.988x + 0.43$ . (Otros estudios comparativos fueron realizados de acuerdo con las guías tentativas de la NCCLS, EP9-T.)

**Precisión:** Dentro de una corrida, la precisión fue establecida por 20 pruebas en 3 diferentes niveles de sueros de control comerciales. Valores totales de precisión se obtuvieron probando 3 controles comerciales por 5 días seguidos.

|                 | Durante de una corrida |         |         |
|-----------------|------------------------|---------|---------|
|                 | Suero 1                | Suero 2 | Suero 3 |
| Media ALT (U/L) | 22                     | 45      | 102     |
| Desv. Std (U/L) | 1.4                    | 1.2     | 1.0     |
| C.V. (%)        | 6.2                    | 2.6     | 1.0     |
|                 | Precisión Total        |         |         |
|                 | Suero 1                | Suero 2 | Suero 3 |
| Media ALT (U/L) | 23                     | 43      | 99      |
| Desv. Std (U/L) | 0.7                    | 0.7     | 0.9     |
| C.V. (%)        | 3.1                    | 1.6     | 0.9     |

Estudios de precisión fueron realizados de acuerdo con las guías tentativas de la NCCLS, EP5-T.

**Linealidad:** Es lineal a 600 U/L y a 37°C. Llevado a cabo de acuerdo a las guías EP6-P de la NCCLS.

**Sensitividad:** Esta basada en la resolución de un instrumento de  $A = 0.001$ , el método presentado muestra una sensibilidad de 2.0 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. Provisional Concentrations of Enzymes. Clin Chem 23: 887, 1977.
  4. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW: Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin Chem 24: 58, 1978.
  5. Bergmeyer, H.U. Principles of Enzymatic Analysis. Verlag Chemic, 1978.
  6. Young D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests. AACC Press, Washington D.C., 1990
  7. Henry JB. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 17th ed. WB Saunders Co., 1984, p 1437.
  8. Stanbio Laboratory Data
- Para asistencia técnica llame: 800-531-5535 • (830) 249-0772  
Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com  
http://www.stanbio.com  
Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006  
DN: RBR.2930CE.01 • Last Revision: 01/04 • Procedure No. 2930CE