



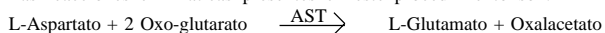
Stanbio AST/SGOT (Liqui-UV®)

Procedimiento No. 2920

Para la determinación Cinética cuantitativa de la AST/SGOT en suero, para procedimientos Manuales o Automatizados.

Resumen y Principios

El aspartato de aminotransferasa (AST), es una de varias enzimas que catalizan el intercambio de grupos amino y oxo entre alfa-amino ácidos y alfa-oxoácidos. Está ampliamente distribuida en los tejidos corporales con mayor cantidad de AST como el corazón e hígado.¹ Los que está pero con menor cantidad de AST son el músculo esquelético, riñones, páncreas, vaso, pulmones y cerebro. El daño a estos tejidos de como resultado una liberación de la enzima AST a la circulación general. En el infarto del miocardio, la AST séica, puede empezar a incrementarse dentro de las 6 - 8 horas después del ataque, por dos días y vuelve a la normalidad para el cuarto ó quinto día después del infarto.² En enfermedades como hepatitis, cirrosis y metástasis en hígado, se han entrado también incrementos en las concentraciones séicas de AST.³ Karmen⁴ fue el primero en reportar un método cinético para medir la actividad de AST en suero. Subsecuentemente el método ha sido actualizado y optimizado por Bergmeyer et al.⁵ El método de Stanbio para medir AST, es similar al método recomendado por la Federación Internacional de Química Clínica.⁶ Las reacciones enzimáticas presentes en este procedimiento son:



La AST, cataliza la transferencia del grupo amino entre el L-Aspartato y el 2 Oxo-glutarato. El Oxalácetico formado en la primera reacción, va a reaccionar con el NADH en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) para formar NAD. La actividad de AST se determina midiendo el valor total de oxidación del NADH a 340nm. La lactato deshidrogenasa se incluye en el reactivo para convertir al piruvato endógeno de la muestra a lactato, durante la fase lag anterior a la medición.

Reactivos

AST Buffer (R1), Ref. No. 2921

Composición:

Tris, pH 7.5	80 mmol/L
L-Aspartato	240 mmol/L
MDH (músculo de porcino)	600 U/L
LDH (músculo de conejo)	600 U/L

Enzima AST (R2), Ref. No. 2922

Composición:

2-Oxoglutarato	12 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 deberán 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. Refiérase 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 claro y sin color. Desechelo si alguno aparece turbio o si contiene partículas de materia. El reactivo a utilizar, esta 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., esta bajo de 0.800.

Materiales Requeridos Pereo No Incluidos

Espetrofotometro 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 • Cronometro

Recolección y Preparación de la Muestra^{7,8,9,11}

Un suero claro y no hemolizado libre de hemolisis, deberá ser utilizado. Siempre que sea posible, los especímenes deben ser separados y analizados el día que se recolectan. El suero AST es relativamente estable por un mínimo de 7 días, si la muestra es refrigerada (de 2 a 8°C). Guarde el suero en tubos bien tapados.

Interferencia de Sustancias: La hemólisis debe ser evitada porque la concentración de AST en las células rojas excede 10 veces la del suero. Ciertas drogas y otras sustancias también se conoce que afectan los valores del AST. Los niveles de Bilirubina arriba de 40mg/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 AST con la que va a trabajar de acuerdo a las instrucciones.
2. Calibre el cero del espectrofotometro 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 100µL (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 para verificar precisión y exactitud. Otros controles comerciales disponibles con valores de AST ensayados por este método son también convenientes. La actividad de la AST 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 AST, 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 AST/SGOT, 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 Esperados¹⁰

El Rango normal (en adultos): 8—33 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.

Características⁸

Comparación: Un grupo de 62 sueros dentro de un rango de actividad AST de 12 a 463 U/L, fueron probados por el método AST descrito y por un reactivo comercial similar disponible. Al comparar resultados se produjo un coeficiente de correlación de 0.993 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 AST (U/L)	25	51	116
Desv. Std (U/L)	0.8	1.6	0.9
C.V. (%)	3.3	3.1	0.8
	Precisión Total		
	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Media AST (U/L)	26	49	115
Desv. Std (U/L)	1.1	0.7	0.8
C.V. (%)	4.4	1.4	0.7

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 NCCSL.

Sensitividad: Esta basada en la resolución de un instrumento de $A = 0.001$, el método presentado muestra una sensibilidad de 1.75 U/L.

Referencias

1. Wilkinson JH. Principles and Practice for Diagnosis Enzymology. Year Book Medical Publishers, 1976
2. Kachmar JR: Enzymes. In Fundamentals of Clinical Chemistry, NW Tietz, Editor, Saunders, Philadelphia, 1976, p 674.
3. Sacks HJ, Lanchantin GF: An elevation of serum transaminase in the jaundice state. Am J Clin Pathol 33:97, 1960
4. Karmen A: A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood. J Clin Invest 34:131, 1955
5. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW: Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin Chem 24: 58, 1978.
6. Expert Panel of Enzymes of the International Federation of Clinical Chemistry: Part 3. Revised IFCC method for aspartate aminotransferase. Clin Chem 24:720, 1978.
7. Demetriou JA et al. In Clinical Chemistry - Principles and Technics 2nd ed. RJ Henry et al. Eds. Harper & Row, Hagerstown MD, 1974, p 873.
8. International Federation of Clinical Chemistry. Provisional Recommendations on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentrations of Enzymes. Clin Chem 23: 887, 1977.
9. Young D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests. AACC Press, Washington D.C., 1990
10. Henry JB. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 17th ed. WB Saunders Co., 1984, p 1437.
11. 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.2920CE.02 • Last Revision: 07/04 • Procedure No. 2920CE



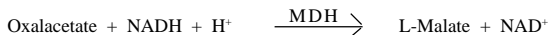
Stanbio AST/GOT (Liqui-UV®) Procedure No. 2920

For the Kinetic Quantitative Determination of AST/GOT in Serum for Manual and/or Automated Procedures

Summary and Principle

Aspartate aminotransferase (AST) is one of several enzymes that catalyze the exchange of amino and oxo groups between alpha-amino acids and alpha-oxo acids. It is widely distributed throughout body tissues with significant amounts in the heart and liver.¹ Lesser amounts are found in skeletal muscle, kidneys, pancreas, spleen, lungs and brain. Injury to these tissues results in release of the AST enzyme to the general circulation. In myocardial infarction, serum AST may begin to rise within 6-8 hours after onset, peak within two days and return to normal by the fourth or fifth day of post infarction.² An increase in serum AST is also found with hepatitis, liver necrosis, cirrhosis and liver metastasis.³

Karmen⁴ first reported a kinetic method for measuring AST activity in serum. Subsequently, the method has been modified and optimized by Bergmeyer et al.⁵ The Stanbio assay procedure for AST measurement is similar to the method recommended by the International Federation of Clinical Chemistry.⁶ The enzymatic reactions involved in the assay procedure are as follows:



AST catalyzes the transfer of the amino group aspartate to 2-oxoglutarate to yield oxalacetate and glutamate. The oxalacetate formed in the first reaction is then reacted with NADH in the presence of malate dehydrogenase (MDH) to form NAD. AST activity is determined by measuring the rate of oxidation of NADH at 340 nm. Lactate dehydrogenase is included in the reagent to convert endogenous pyruvate in the sample to lactate during the lag phase prior to measurement.

Reagent

AST Buffer (R1), Ref. No. 2921

Composition:	L-Aspartate	240	mmol/L
	MDH (porcine muscle)	600	U/L
	LDH (rabbit muscle)	600	U/L
	Tris Buffer, pH 7.5	80	mmol/L

AST Enzyme (R2), Ref. No. 2922

Composition:	2 - Oxoglutarate	12	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 Work-

ing 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 and Interval timer

Specimen Collection and Storage

Non-hemolyzed serum is the specimen of choice, yet EDTA treated plasma or heparinized plasma can be used.⁷ Whenever possible specimens should be separated and analyzed on the day of collection. Store serum in stoppered tubes. The enzyme in serum is reportedly stable for a minimum of 7 days at 2-8°C.⁸

Interfering Substances: Hemolysis must be avoided as the concentration of AST in red cells is roughly 10 times that of serum.⁷ Bilirubin levels up to 40 mg/dL and triglyceride levels up to 2000 mg/dL show no interference in this test.¹¹ Certain drugs and other substances are also known to affect AST values.⁹

Manual Procedure

1. Prepare AST 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 uL (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 (DA/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 AST values assayed by this method are also suitable. AST 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: AST 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 AST contents of a control serum with known AST 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 AST/GOT activity is that amount of enzyme which oxidizes one μmol/L of NADH per minute.

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

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

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

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. AST 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 Values¹⁰

Normal Range: 8 - 33 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 62 sera ranging in AST activity from 12 - 463 U/L was assayed by the described AST method and by a similar commercially available AST reagent. Comparison of the results yielded a correlation coefficient of 0.993 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 AST (U/L)	25	51	116
Std. Deviation (U/L)	0.8	1.6	0.9
C.V. (%)	3.3	3.1	0.8

	Total Precision		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean AST (U/L)	26	49	115
Std. Deviation (U/L)	1.1	0.7	0.8
C.V. (%)	4.4	1.4	0.7

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

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

Sensitivity: Based on an instrument resolution of A = 0.001, the method presented shows a sensitivity of 1.75 U/L.

References

1. Wilkinson JH. Principles and Practice for Diagnosis Enzymology. Year Book Medical Publishers, 1976
 2. Kachmar JR: Enzymes. In Fundamentals of Clinical Chemistry, NW Tietz, Editor, Saunders, Philadelphia, 1976, p 674.
 3. Sacks HJ, Lanchantin GF; An elevation of serum transaminase in the jaundice state. Am J Clin Pathol 33:97, 1960
 4. Karmen A: A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood. J Clin Invest 34:131, 1955
 5. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW: Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin Chem 24: 58, 1978.
 6. Expert Panel of Enzymes of the International Federation of Clinical Chemistry: Part 3. Revised IFCC method for aspartate aminotransferase. Clin Chem 24:720, 1978.
 7. Demetriou JA et al. In Clinical Chemistry - Principles and Technics 2nd ed. RJ Henry et al. Eds. Harper & Row, Hagerstown MD, 1974, p 873.
 8. International Federation of Clinical Chemistry. Provisional Recommendations on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentrations of Enzymes. Clin Chem 23: 887, 1977.
 9. Young D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests. AACC Press, Washington D.C., 1990
 10. Henry JB. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 17th ed. WB Saunders Co., 1984, p 1437.
 11. 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.2920CE.02 • Last Revision: 07/04 • Procedure No. 2920CE