

ENZIMAS

ASPARTATO AMINO TRANSFERASA (A.S.T) (G.O.T.)

Objetivos

- Determinación de AST por método cinético.
- Interpretación de la información provista por el fabricante de métodos.

INTRODUCCION

Aspartato amino transferasa, AST, L- aspartato: 2- oxoglutarato aminotransferasa, glutamato oxalacetato transaminasa sérica, SGOT (EC 2.6.1.1)

PM 110000 D, Clase química: enzima, proteína

La aspartato aminotransferasa (AST) es una enzima bilocular (citoplasmática y mitocondrial) ampliamente difundida. Se encuentra en mayor concentración en hígado y corazón. Cualquier alteración de estos tejidos produce un aumento en los niveles de AST circulante. En el infarto agudo de miocardio, se observa un aumento moderado de la enzima a las 6 u 8 horas de ocurrido el episodio, alcanza niveles máximos alrededor de las 48 horas y retorna a la normalidad entre el 4º y el 6º día.

En pacientes con afecciones hepáticas se observan las mayores elevaciones de AST, sobre todo en los casos de hepatitis con necrosis. La determinación de AST adquiere importancia diagnóstica cuando sus valores se comparan con los de otras enzimas de similar origen tisular, es decir que permite completar el perfil enzimático de órganos tales como corazón e hígado.

ETAPA PREANALITICA

1) Condiciones del paciente:

FUENTES NO PATOLOGICAS DE VARIACION: BIOLOGICAS Y PREANALITICAS

Los traumatismos musculares debido a inyecciones intramusculares, el ejercicio o a las operaciones quirúrgicas pueden aumentar notablemente los valores de AST. Los aumentos de la actividad enzimática en suero después del ejercicio pueden persistir durante varios días.

En el momento del muestreo, la ingestión de alimentos y el reposo en cama no interfiere sobre los valores de AST. Los resultados sí son alterados con los cambios de postura o estasis venosa. Ingestión moderada de alcohol días previos a la toma de muestra provocan disminución de la actividad enzimática en plasma.

La actividad en plasma de AST durante el embarazo son 20-30% menores que en las mujeres no embarazadas.

Se debe tener especial cuidado con pacientes desnutridos, más aun en aquellos que tienen hipovitaminosis B, ya que estos pacientes tienen déficit de piridoxal fosfato, que actúa como coenzima, y producen valores falsamente disminuidos. La misma recomendación vale para pacientes dializados. Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

2) Toma de muestra:

TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION

Los valores obtenidos por punción venosa en plasma heparinizado y suero no varían. Oxalato, citrato, EDTA pueden utilizarse sin que afecten las determinaciones. Además, la adición de yodoacetato o fluoruro a la heparina tampoco cambian los resultados. Se recomienda no guardar las muestras en contacto con el paquete de glóbulos rojos durante mucho tiempo y evitar la hemólisis. Se recomienda el uso de plasma en el caso de usar muestras capilares porque puede dar valores falsamente aumentados, si se usa suero capilar.

- Las muestras con hemólisis visible o intensa producen valores falsamente aumentados por lo que no deben ser usados.

- Las muestras con concentraciones de cetoácidos endógenos particularmente elevadas producen valores falsamente aumentados.

La muestra para determinar actividad de AST es estable 24 hs a temperatura ambiente y cerca de una semana a 4°C. Congelación y descongelación deterioran la actividad de AST en formas variables.

ETAPA ANALITICA

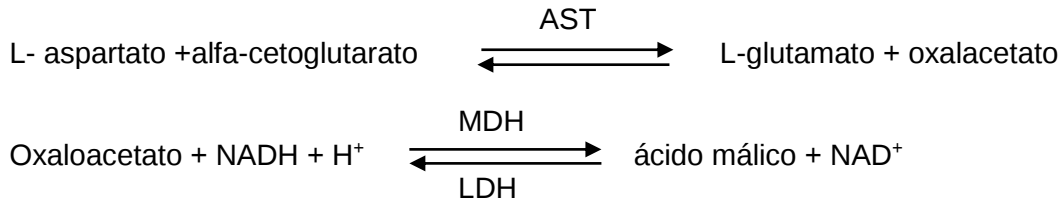
1) Metodología:

Método recomendado por la IFCC, la SSCC y la DGKC

FUNDAMENTO

El método de referencia es un método cinético UV., que tiene la reacción anterior y además acoplada una reacción redox:

La AST cataliza la transferencia de un grupo amino de aminoácidos específicos (L- glutámico o L- aspártico) a cetoácidos específicos (alfa-cetoglutarato u oxalacético):



REACTIVOS

Buffer: solución de Buffer TRIS pH 7,8 (a 30°C) con L- aspartato. Listo para usar.

Sustrato: viales conteniendo 2- oxoglutarato, nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), malato deshidrogenada (MDH) y lactato deshidrogenasa (LDH).

Para usar, agregar 20 ml de Buffer a un frasco de sustrato. Tapar, agitar hasta disolución completa y fechar.

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

CONDICIONES DE REACCION (Disminución de absorbancia)

- Longitud de onda: 340 nm
- Temperatura de reacción: 25, 30 ó 37°C. Ver los VALORES DE REFERENCIA correspondientes a cada temperatura.
- Tiempo de reacción: 4 minutos.
- Volumen de muestra y reactivo: Vol. M = 200 ul y Vol. Rvo. sustrato reconstituido = 2 ml. Si el volumen de lectura del espectrofotómetro lo permite, se pueden reducir proporcionalmente sin que varíe el factor de cálculo.
- Estabilidad y almacenamiento del sustrato reconstituido: estable 5/30 días en refrigerador (2-10°C) o 1/3 días a temperatura ambiente a partir del momento de su reconstitución (ver inserto del fabricante).
- Cuando el espectrofotómetro ha sido llevado a cero con agua destilada y se observan lecturas de absorbancia del sustrato reconstituido inferiores a 0,800 D.O. o superiores a 1,800 D.O. (a 340nm), no utilizarlo.
- Absorbancia inicial baja: cuando una vez agregado el suero la primera lectura (tiempo 0) es inferior a 0,800 D.O., estando el Sustrato en condiciones, indica una muestra con muy alta actividad de GOT (que consume el NADH aún antes de esta lectura) o con una concentración de cetoácidos endógenos particularmente elevada. En este caso, repetir la determinación con muestra diluida con solución fisiológica y multiplicar el resultado por la dilución efectuada.
- La humectación es causa de deterioro del Sustrato.

PROCEDIMIENTO

Reconstituir el Reactivo liofilizado. Preincubar a 37°C 2 ml por 5 min. Agregar 200 ul de muestra, mezclar por agitación y verter en la cubeta. Disparar el cronómetro. Esperar 1 min y leer la absorbancia inicial y luego a los 1, 2 y 3 min. Determinar las diferencias promedio de absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar el ΔA promedio para los cálculos.

ACTIVIDAD de GOT (U/l) = $\Delta A/\text{min}$. x factor

Factor = (vol. reacción/vol. muestra) x 1 / coef. ext. NADH

Coeficiente de extinción del NADH a 340 nm = $6,22 \times 10^3$ l/cm-mol

En cada caso deberá emplearse el factor de cálculo correspondiente de acuerdo a la temperatura de reacción seleccionada (30-37°C o 25°C), como se indica en la siguiente tabla:

Temperatura Long.de onda	30-37°C	25°C
340 nm	1.740	791
334 nm	1.780	809
366 nm	3.207	1.453

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

RENDIMIENTO ANALITICO DEL METODO

REPRODUCIBILIDAD: A un nivel de 37U/l procesando replicados se obtiene un C.V. de 4 a 5 %.

RANGO DINAMICO: el rango útil de lectura se extiende hasta 0,200 $\Delta A/\text{min}$ (a 340 nm). Si la $\Delta A/\text{min}$ es superior a 0,200 (a 340-334 nm) o 0,100 (a 366 nm) se debe repetir la determinación con muestra diluida (1:5 ó 1:10) con solución fisiológica, corrigiendo los resultados.

SENSIBILIDAD: a 340 nm y a 30 O 37 °C el mínimo cambio de actividad detectable es de 1,8 U/l.

VALORES DE REFERENCIA (U/l)

Temperatura	25°C	30°C*	37°C*
Hombres	hasta 18 U/l	hasta 25 U/l	hasta 38 U/l
Mujeres	hasta 15 U/l	hasta 21 U/l	hasta 32 U/l

* Calculados

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

ETAPA POSTANALITICA

Interpretación y validación del resultado:

Se encuentra muy aumentada en formas fulminantes de hepatitis, especialmente hepatitis viral. Está aumentada cuando existe necrosis o daño hepático de cualquier causa, incluyendo ictericia colestática y obstructiva, hepatitis crónica, daño inducido por tóxicos (distintos fármacos, alcohol, etc.). Actualmente se recomienda no utilizarla como marcador de infarto agudo de miocardio (IAM).

Comparar esta guía con la guía del inserto provisto por Wiener del método a usar en el trabajo práctico y anotar las coincidencias o diferencias.

Buscar Valores de Referencia y citar la bibliografía.

BIBLIOGRAFIA

Kaplan-Pesce "Química Clínica". Edición 1984. Editorial Panamericana.

Luis Morán Villatoro "Obtención de muestras sanguíneas de calidad analítica" mejoría continua de la etapa preanalítica. 2001. Editorial Panamericana.

Michael L. Bishop "Química Clínica. Principios, procedimientos y correlaciones". 5ta. Ed. 2007. Editorial Mc Graw Hill.

Agregar bibliografía utilizada para estudiar el tema.