

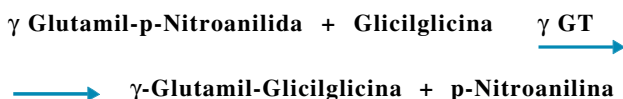
FINALIDADE

Sistema colorimétrico para quantificação da γ -Glutamyltransferase no soro ou plasma.

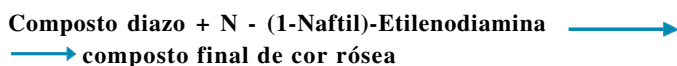
Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO

A γ -Glutamyltransferase (γ GT) é uma enzima que catalisa a transferência do grupo Glutamil, da γ -Glutamyl-p-Nitroanilida (substrato), para a Glicilglicina (receptor), com liberação de p-Nitroanilina, de acordo com a seguinte reação:



A p-Nitroanilina liberada é diazotada através da reação de Bratton-Marshall modificada:



A absorvância do composto final é medida em **530nm** ou **filtro verde**.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

O substrato e o receptor, liofilizados para testes individuais, apresentam-se otimizados, permitindo um tempo de incubação de 10 minutos e linearidade até a concentração de **175 U.I./L**.

Tempo total gasto no teste : 20 minutos.

METODOLOGIA

Naftalin modificado.

REAGENTES

Substrato: cada frasco contém, sob forma liofilizada, 5,38 μ mol de γ -Glutamyl-p-Nitroanilida e 100 μ mol de Glicilglicina.

Tampão: solução tampão de Tris 0,1M, pH 8.

Solução inibidora: solução de Ácido Acético 1M.

Nitrito de Sódio 1,5%: cada frasco contém 1,09 mmol de Nitrito de sódio em solução.

Sulfamato de Amônio 10%: solução aquosa de Sulfamato de Amônio a 10%.

Reagente de cor: solução 50mg/dL de N-1-Naftil-Etilenodiamina.

Solução padrão: solução de p-Nitroanilina em Ácido Clorídrico 0,1M. Cada 0,5mL corresponde a 100U.I./L de γ -Glutamyltransferase, dentro da metodologia adotada.

APRESENTAÇÃO

Substrato	1 x 10 flaconetes*
Tampão	1 x 14mL
Solução inibidora	1 x 60mL

Nitrito de Sódio 1,5%	1 x 5mL
Sulfamato Amônio 10%	1 x 4mL
Reagente de cor	1 x 25mL
Solução padrão	1 x 3mL

* Cada flaconete contém 26mg de sólidos.

NÚMERO DE TESTES

10 testes

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em 530nm ou filtro verde.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipetas semiautomáticas 50 μ L.
- Ponteiras descartáveis.
- Água destilada ou deionizada.
- Banho maria (37°C).
- Cronômetro.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Substrato: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Tampão: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Solução inibidora: armazenar à temperatura ambiente (2-30°C). Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Nitrito de Sódio 1,5%: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Sulfamato de Amônio 10%: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Reagente de cor: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Solução padrão: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Os reagentes são somente para **uso diagnóstico *in vitro***. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se o contato com pele e mucosas. Em caso de contaminação acidental, lavar a área afetada com água corrente. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

Observar ainda a simbologia constante nos rótulos do produto:



Corrosivo



Irritante



AMOSTRA

Soro ou plasma (colhido com EDTA ou heparina). A enzima permanece estável por 12 dias, conservada entre 2-8°C, ou por 3 meses (aproximadamente), a 20°C negativos.

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Preparo do substrato de uso:

A um frasco de substrato, adicionar **1,2mL de tampão**.

Agitar. O substrato se dissolve. Alguns cristais em suspensão não interferem com o desenvolvimento da técnica. Após reconstituição, sua estabilidade é de 5 dias, sob refrigeração (2-8°C), ou 15 dias, a 10°C negativos.

Identificar dois tubos de ensaio com **B (branco)** e **T (teste)**.

Proceder como segue:

	B	T
Substrato de uso	0,5mL	0,5mL

Colocar em banho maria, 37°C, durante 2 minutos.

Amostra	-	50 µL
---------	---	-------

Incubar a 37°C, durante 10 minutos.

Solução inibidora	2,5mL	2,5mL
-------------------	-------	-------

Retirar do banho maria.

Amostra	50 µL	-
Nitrito de Sódio 1,5%	2 gotas	2 gotas

Agitar e deixar repousar durante 3 minutos.

Sulfamato de Amônio 10%	2 gotas	2 gotas
-------------------------	---------	---------

Agitar e deixar repousar durante 2 minutos.

Reagente de cor	1,0mL	1,0mL
-----------------	-------	-------

Homogeneizar e ler a absorvância de **T** em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **530nm** ou **filtro verde**, zerando o aparelho com o tubo **B**. A cor final permanece estável por 40 minutos, à temperatura ambiente (20-30°C).

Como a reação colorimétrica segue estritamente a lei de Beer, basta a determinação de um **fator (F)**. Rotular 3 tubos com **P (padrão)**.

Proceder como segue:

	P	P	P
Solução padrão	500 µL	500 µL	500 µL
Solução inibidora	2,5mL	2,5mL	2,5mL
Nitrito de Sódio 1,5%	2 gotas	2 gotas	2 gotas

Agitar e deixar repousar durante 3 minutos.

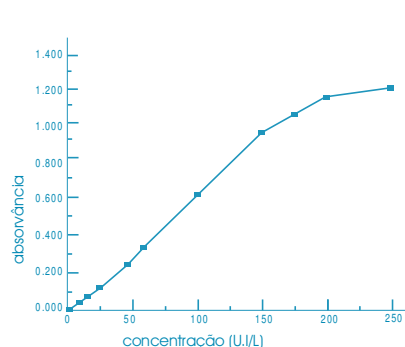
Sulfamato de Amônio 10%	2 gotas	2 gotas	2 gotas
-------------------------	---------	---------	---------

Agitar e repousar durante 2 minutos.

Reagente de cor	1,0mL	1,0mL	1,0mL
-----------------	-------	-------	-------

Homogeneizar e ler as absorvâncias de **P** em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **530nm** ou **filtro verde**, zerando o aparelho com **água destilada**. Anotar as respectivas absorvâncias e tirar a média aritmética.

CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (U./L)
1	0.000	0
2	0.033	5
3	0.060	10
4	0.121	20
5	0.251	40
6	0.376	60
7	0.615	100
8	0.932	150
9	1.076	175
10	1.140	200
11	1.205	250

Obs.: Não utilizar esta curva para determinar o resultado de seu ensaio.

- A curva de calibração é a representação gráfica da relação entre os valores das absorvâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão. São necessários três passos para confeccioná-la: (1) preparo das soluções padrão; (2) medição dos valores de absorvância das soluções padrão, de acordo com o especificado no procedimento técnico da presente instrução de uso, e (3) montagem de um gráfico em papel especial, linear, onde são relacionados os valores de absorvância com os de concentração, conforme demonstrado na figura acima. As dosagens para montagem da curva foram feitas em um espectrofotômetro "Ultrospec III", Pharmacia Biotec, comprimento de onda de 530nm e cubetas com passagem de luz de 10mm.
- A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma determinada concentração, na qual pode ser determinado um fator de calibração (F), de acordo com a Lei de Beer.
- A reação é linear até 175U.I./L. Obtendo-se valores mais elevados, dilui-se a amostra com solução fisiológica e procede-se a nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**
- O kit de γ -glutamyltransferase Doles possui padrão no intervalo de linearidade da metodologia adotada. O laboratório deve realizar o ensaio com o padrão que acompanha o kit e calcular seu fator de calibração (F), a exemplo do demonstrado nos cálculos abaixo.**
- O fator deve ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.**
- Os padrões utilizados na montagem da curva de calibração foram ajustados conforme descrito em "A Routine Procedure for Estimating Serum γ -Glutamyltransferase Activity", Naftalin, Margaret Sexton, J.F. Whitaker e D. Tracey, Clin. Chim. Acta, 26 (1969) pag. 293-296.



CÁLCULOS

$$\text{Fator (F)} = \frac{100}{\text{Média aritmética das absorvâncias de P}}$$

Exemplo:

Leituras:

Padrão (P): 0,600; 0,598; 0,602

Teste (T): 0,100

$$\text{Média aritmética das absorvâncias de P} = \frac{0,600 + 0,598 + 0,602}{3} = 0,600$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{100}{0,600} = 167$$

$$\gamma\text{GT (U.I./L)} = \text{absorvância T} \times \text{F} = 0,100 \times 167 = 16,7$$

Uma U.I. de γ -Glutamilttransferase é a quantidade de enzima que libera 1 μmol de p-Nitroanilina/ litro de soro/ minuto / 37°C.

LIMITAÇÕES DO SISTEMA

- Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso. Qualquer alteração poderá levar a resultados errôneos.
- Algumas drogas como: álcool, fenitoína e fenobarbital, podem provocar valores elevados de γ GT.
- Valores artificialmente elevados de γ GT podem ser encontrados em pacientes no uso terapêutico de sulfas.
- Algumas drogas, como os anticoncepcionais orais, podem provocar valores reduzidos de γ GT.
- Os níveis de γ GT também se elevam na doença hepática alcoólica aguda ou crônica e nas neoplasias hepáticas, primárias ou metastáticas. Para uma melhor investigação, sugere-se a dosagem em paralelo de TGO, TGP, fosfatase alcalina e eletroforese de proteínas.

CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

- 1.A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- 2.A água utilizada na limpeza do material, no preparo dos reagentes e na dosagem, deve ser de boa qualidade.
- 3.Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, amins e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
- 4.As pipetagens devem ser precisas.
- 5.O nível da água do banho maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. A temperatura (37°C) deve ser rigorosamente observada.
- 6.O uso de soro controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar um soro controle de valor na faixa de normalidade (**soro controle N - Doles**) e outro soro controle de valor elevado (**soro controle P - Doles**).

VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida.

Como orientação, sugerimos os seguintes valores:

Homens	4 - 26 U.I./L
Mulheres	4 - 22 U.I./L

SIGNIFICADO CLÍNICO

A dosagem de γ -GT pode ser vista como uma prova de estudo da capacidade excretora do fígado. Embora a enzima se apresente aumentada nas hepatites agudas, é principalmente nas formas colestáticas que mostra aumentos consideráveis. Seu estudo é de grande ajuda nas colestases intra e extra hepáticas, nas quais se encontra grandemente aumentada.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 41 testes em amostras cujos teores de γ -glutamilttransferase situavam-se no intervalo de 4 a 236 U.I./L. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação do kit de γ -Glutamilttransferase Doles (Y) com a metodologia mencionada (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 1,568 + 1,021X$, sendo o coeficiente de correlação 0,99.

Adição de γ -Glutamilttransferase (proveniente de extrato de rim de porco), na concentração de 50U.I./L, a 8 amostras de soro cujos valores de γ -Glutamilttransferase oscilavam entre 14 e 110 U.I./L, mostrou um índice de recuperação situado entre 97 e 102%.

O erro da média foi de 2,95%.

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com 3 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (U.I./L)	9,08	22,21	83,03
Desvio padrão	0,43	0,67	1,03
Coefficiente de variação (%)	4,73	3,02	1,24

Reprodutibilidade: foram realizadas 20 dosagens, durante 20 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (U.I./L)	9,77	19,12	75,04
Desvio padrão	0,47	0,79	1,22
Coefficiente de variação (%)	4,81	4,13	1,63

Especificidade: a presente metodologia é específica para determinação de γ -Glutamilttransferase no soro ou plasma.

Sensibilidade: a absorvância encontrada, de 0.006, corresponde a 1U.I./L de concentração de γ -Glutamilttransferase, quando realizados os testes em espectrofotômetro, a 530nm. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório. O substrato e o receptor estão em concentrações otimizadas, permitindo assim a atividade enzimática máxima da γ -Glutamilttransferase.

Diluição da matriz: estudos sucessivos de diluição da matriz mostraram que não há interferência na sensibilidade diagnóstica da presente metodologia de Naftalin modificado.

Substâncias interferentes: o plasma utilizado na dosagem da γ -Glutamilttransferase poderá ser colhido somente com EDTA ou heparina. Estudos realizados comprovam que o uso de anticoagulante contendo fluoreto, oxalato e citrato, em concentração de 1g/L, inibem a γ -Glutamilttransferase em aproximadamente 15%. A hemólise e o contato prolongado com os eritrócitos não interferem na análise. Certas drogas alteram os níveis de γ -Glutamilttransferase. Para controle de tal interferência recomenda-se que o paciente seja questionado quanto ao uso de medicamentos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Naftalin L., Sexton M. Whitaker JF, Tracey D.: *Clin. chem. Acta* 26: 293, 1969.
- Rosalki S. B.: *Advances in clinical chemistry*, vol. 17, 53-107; Academic Press. 1975.
- Pagana, K.D.: *Mosby's diagnostic and laboratory test reference*, 362-363; 1992.
- Chernecky, C.C.; Krech, R.L.; Berger, B.J.: *Laboratory tests and diagnostic procedures*, 524-525; 1993.
- Noe B.A; Reck R.C.: *Laboratory medicine, the selection and interpretation of clinical laboratory Studies*, 554 - 561; 1994.
- Tibúrcio H.M.: *Controle interno da qualidade analítica* - 1ª. ed, março/1995.
- Doles: dados de arquivo

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - **Código de Defesa do Consumidor**. Todos os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento dos mesmos, se obedecidas as condições abaixo:

- 1.O usuário do sistema seguir, rigorosamente, o procedimento técnico.
- 2.As condições de armazenamento deverão estar de acordo com o estabelecido nas instruções de uso.
- 3.Os materiais necessários e não fornecidos deverão estar em boas condições técnicas.

Todos os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.

CNPJ: 01.085.513/0001-05

Rodovia BR 153, Km 1273, Lt.07, Chácara Retiro

CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil

Caixa Postal 1051

e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810013

Revisão: 16 (08/2009)

NBR ISO 9001

Sistema da Qualidade certificado desde 1999

