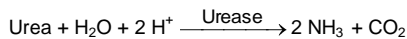


Quantitative determination of urea IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

 Urea in the sample is hydrolyzed enzymatically into ammonia (NH₃) and carbon dioxide (CO₂).

 Ammonia ions formed react with α-ketoglutarate in a reaction catalysed by glutamate dehydrogenase (GLDH) with simultaneous oxidation of NADH to NAD⁺:


$$2 \text{NH}_3 + \alpha\text{-Ketoglutarate} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{GLDH}} \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+ + \text{L-Glutamate}$$
 The decrease in concentration of NADH, is proportional to urea concentration in the sample¹.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Urea is the final result of the metabolism of proteins; it is formed in the liver from its destruction.

 It can appear elevated urea in blood (uremia) in: diets with excess of proteins, renal diseases, heart failure, gastrointestinal hemorrhage, dehydration or renal obstruction^{1,4,5}.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

R 1	TRIS pH 7.8	80 mmol/L
Buffer	α-Ketoglutarate	6 mmol/L
R 2	Urease	3750 U/L
Enzymes	Glutamate dehydrogenase (GLDH)	6000 U/L
	NADH	0.32 mmol/L
UREA CAL	Urea aqueous primary standard 50 mg/dL	

PREPARATION

Working reagent (WR): Dissolve (→) the contents of one vial R 2 Enzymes into one bottle R 1 Buffer.

Cap and mix gently to dissolve contents.

Stable: 6 weeks at 2-8°C) or 7 days at 15-25°C.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 340 nm < 1.00.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 340 nm.
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment^(Note 1).

SAMPLES

- Serum or heparinized plasma¹: Do not use ammonium salts or fluoride as anticoagulants.
- Urine¹: Dilute sample 1/50 with distilled water. Mix. Multiply results by 50 (dilution factor); Preserve urine samples at pH < 4.

Urea is stable at 2-8°C for 5 days;

PROCEDURE

- Assay conditions:
Wavelength: 340 nm
Cuvette: 1 cm light path
Temperature: 37°C / 15-25°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette:

	Blank	Standard	Sample
WR (mL)	1.0	1.0	1.0
Standard ^(Note 2-3) (μL)	--	10	--
Sample (μL)	--	--	10

- Mix and read the absorbance after 30 s (A₁) and 90 s (A₂).
- Calculate: ΔA = A₁ - A₂.

CALCULATIONS

$$\frac{(\Delta A)_{\text{Sample}}}{(\Delta A)_{\text{Standard}}} \times 50 (\text{Standard conc.}) = \text{mg/dL urea in the sample}$$

 10 mg/L urea BUN divided by 0.466 = 21 mg/L urea = 0.36 mmol/L urea¹.

Conversion factor: mg/dL x 0.1665 = mmol/L.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and calibrator for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES¹

Serum : 15- 45 mg/dL (2.49-7.49 mmol/L)

Urine : 20 - 35 gr/24 h.

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS
Measuring range: From detection limit of 1.82 mg/dL to linearity limit of 500 mg/dL.

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/2 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 2.

Precision:

Mean (mg/dL)	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
	SD	CV (%)	Mean	SD
41.9	0.89	2.13	39.96	1.10
146	2.55	1.74	144	2.79
			2.76	1.93

Sensitivity: 1 mg/dL = 0.0016 A.

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r): 0.99.

Regression equation: y=0.99x + 0.01.

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

 It is recommended to use heparin as anticoagulant. Do not use ammonium salts or fluoride¹.

 A list of drugs and other interfering substances with urea determination has been reported by Young et. al^{2,3}.

NOTES

- UREA CAL: Proceed carefully with this product because due its nature it can get contaminated easily.
- Glassware and distilled water must be free of ammonia and ammonium salts¹.
- Calibration with the aqueous standard may cause a systematic error in automatic procedures. In these cases, it is recommended to use a serum Calibrator.
- Use clean disposable pipette tips for its dispensation.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.**

BIBLIOGRAPHY

- Kaplan A. Urea. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1257-1260 and 437and 418.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PACKAGING

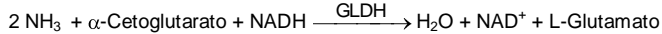
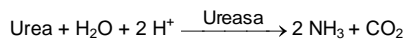
Ref: 1001332	Cont.	10 x 20 mL
Ref: 1001333		10 x 50 mL

Determinación cuantitativa de urea IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

 La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, presente en la muestra, en amoníaco (NH₃) y anhídrido carbónico (CO₂).

 El amoníaco formado se incorpora al α-cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) con oxidación paralela de NADH a NAD⁺:

 La disminución de la concentración de NAD⁺ en el medio es proporcional a la concentración de urea de la muestra ensayada¹.

SIGNIFICADO CLINICO

La urea es el resultado final del metabolismo de las proteínas; se forma en el hígado a partir de su destrucción.

 Puede aparecer la urea elevada en sangre (uremia) en dietas con exceso de proteínas, enfermedades renales, insuficiencia cardiaca, hemorragias gástricas, hipovolemia y obstrucciones renales^{1,4,5}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	TRIS pH 7,8	80 mmol/L
Tampón	α-Cetoglutarato	6 mmol/L
R 2	Ureasa	3750 U/L
Enzimas	Glutamato deshidrogenasa (GLDH)	6000 U/L
	NADH	0,32 mmol/L
UREA CAL	Patrón primario acuoso de Urea 50 mg/dL	

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT): Disolver (→) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en un frasco de R 1 Tampón.

Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

Estabilidad: 6 semanas a 2-8°C o 7 días a 15-25°C.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 340 nm < 1,00.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 340 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio (Nota 1).

MUESTRAS

 - Suero o plasma heparinizado¹: No usar sales de amonio o fluoruro como anticoagulantes.

 - Orina¹: Diluir la muestra al 1/50 con agua destilada. Mezclar. Multiplicar el resultado obtenido por 50 (factor de dilución); Evitar el crecimiento bacteriano, manteniendo el pH < 4.

La urea es estable 5 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 Longitud de onda: 340 nm
 Cubeta: 1 cm paso de luz
 Temperatura: 37°C / 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón (Nota 2-3) (μL)	--	10	--
Muestra (μL)	--	--	10

- Mezclar y leer las absorbancias a los 30 s (A₁) y a los 90 s (A₂).
- Calcular: ΔA = A₁ - A₂.

CALCULOS

$$\frac{(\Delta A)_{\text{Muestra}}}{(\Delta A)_{\text{Patrón}}} \times 50 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de urea en la muestra}$$

 10 mg/L urea BUN dividido por 0,466 = 21 mg/L de urea = 0,36 mmol/L urea¹.

Factor de conversión: mg/dL x 0,1665 = mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

Suero: de 15 a 45 mg/dL (2.49-7.49 mmol/L)

Orina: de 20 a 35 gr/24 horas

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO
Rango de medida: Desde el límite de detección de 1,82 mg/dL hasta el límite de linealidad de 500 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (mg/dL)	41,9	146	39,96	144
SD	0,89	2,55	1,10	2,79
CV (%)	2,13	1,74	2,76	1,93

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0016 A.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coeficiente de correlación (r): 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: y = 0,99x + 0,01.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

 Como anticoagulante se recomienda la heparina. En ningún caso deben utilizarse sales de amonio o fluoruro¹.

 Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la urea^{2,3}.

NOTAS

- UREA CAL: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
- El material empleado así como el agua destilada que se utilice deben estar libres de amoníaco y/o sus sales¹.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFIA

- Kaplan A. Urea. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1257-1260 and 437 and 418.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001332	10 x 20 mL
Ref: 1001333	10 x 50 mL

Cont.