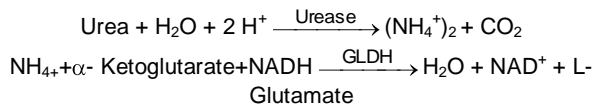


Quantitative determination of urea IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

 Urea in the sample is hydrolyzed enzymatically into ammonia (NH₄⁺) and carbon dioxide (CO₂).

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

 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 their destruction.

 It can appear the urea elevated 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
	Urease	75000 U/L
R 2	GLDH	60000 U/L
Enzymes	NADH	0.32 mmol/L
	UREA CAL	Urea aqueous primary standard 50 mg/dL

PREPARATION

 Working reagent (WR): Mix **4 vol. R1 Buffer + 1 vol. R2 Substrate**.

The (WR) is stably for 1 month at 2-8°C.

UREA CAL: Ready to use.

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 in distilled water. Mix. Multiply the 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

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

 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, reagent and calibration for problems.

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

REFERENCE VALUES^{4,5}

Serum or plasma:

15-45 mg/dL ≅ 2.5-7.5 mmol/L

Urine:

26 - 43 g/24 h ≅ 428-714 mmol/24 h

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS
Measuring range: From detection limit 1 mg/dL to linearity limit 350 mg/dL.

If the concentration is greater than linearity limit dilute 1:2 the sample with ClNa 9 g/L and multiply the result by 2.

Precision:

Mean (mg/dL)	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
	40.6	141	42.5	141
SD	1.22	1.03	2.12	1.15
CV (%)	2.99	0.73	4.99	0.81

Sensitivity: 1 mg/dL = 0,00087 A.

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

The results obtained using 50 samples was the following:

Correlation coefficient (r): 0.99.

Regression equation y= 0.9993x + 0.0394.

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 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.

PACKAGING

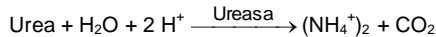
Ref. 41040		R1: 1 x 40 mL, R2: 1 x 10 mL, CAL: 1 x 2 mL
Ref. 41042	Cont.	R1: 1 x 100 mL, R2: 1 x 25 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref. 41041		R1: 1 x 240 mL, R2: 1 x 60 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref. 41043		R1: 1 x 480 mL, R2: 1 x 120 mL, CAL: 1 x 5 mL

Determinación cuantitativa de urea IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

 La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, presente en la muestra, en amoníaco (NH₄⁺) y anhídrido carbónico (CO₂).

 Los iones amonio formados se incorporan al α-cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) con oxidación paralela de NADH a NAD⁺:

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

SIGNIFICADO CLÍNICO

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

 La concentración de urea en sangre (uremia) aumenta como consecuencia de dietas con exceso de proteínas, enfermedades renales, insuficiencia cardíaca, 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 Tampón	TRIS pH 7,8	80 mmol/L
	α-Cetoglutarato	6 mmol/L
	Ureasa	75000 U/L
R 2 Enzimas	GLDH	60000 U/L
	NADH	0,32 mmol/L
	UREA CAL	Patrón primario acuoso de Urea 50 mg/dL

PREPARACIÓN

Reactivo de trabajo (RT): Mezclar

4 vol. de R1 Tampón + 1 vol. R2 Enzimas.

La estabilidad del RTes de 1 mes a 2-8°C.

UREA CAL: Listo para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales 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 en 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 ^(Nota2-3) (μL)	--	10	--
Muestra (μL)	--	--	10

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

CÁLCULOS

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

 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:

SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210)

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar los instrumentos, los reactivos y la calibración.

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 REFERENCIA^{4,5}

Suero o plasma:

15-45 mg/dL ≅ 2,5-7,5 mmol/L

Orina:

26 - 43 g/24 h ≅ 428-714 mmol/24 h

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

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO
Rango de medida: Desde el límite de detección 1 mg/dL hasta el límite de linealidad 350 mg/dL.

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

Precisión:

Media (mg/dL)	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
	40,6	141	42,5	141
SD	1,22	1,03	2,12	1,15
CV (%)	2,99	0,73	4,99	0,81

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,00087 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 regresión (r): 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: y = 0,9993x + 0,0394.

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 a su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFÍA

- 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.

PRESENTACIÓN

Ref. 41040	Cont.	R1: 1 x 40 mL , R2 : 1 x 10 mL , CAL: 1 x 2 mL
Ref: 41042		R1: 1 x 100 mL , R2: 1 x 25 mL , CAL: 1 x 5 mL
Ref. 41041		R1: 1 x 240 mL , R2: 1 x 60 mL , CAL: 1 x 5 mL
Ref. 41043		R1: 1 x 480 mL , R2: 1 x 120 mL , CAL: 1 x 5 mL