

Quantitative determination of Ammonia IVD

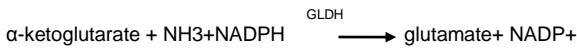
Store at 2-8°C

INTENDED USE

For the quantitative *in vitro* determination of Ammonia in plasma.

PRINCIPLE OF THE METHOD^(1, 4, 5)

Ammonia combines with α-ketoglutarate and NADPH in the presence of glutamate dehydrogenase (GLDH) to yield glutamate and NADP⁺. The corresponding decrease in absorbance at 340 nm is proportional to the plasma ammonia concentration.



CLINICAL SIGNIFICANCE

The major source of circulating ammonia is the GI tract. Under normal conditions, ammonia is metabolized to urea by liver enzymes. Several diseases, both inherited and acquired, cause elevated ammonia (hyperammonemia). The inherited deficiencies of urea cycle enzymes are the major cause of hyperammonemia in infants. The acquired hyperammonemia diseases are caused by liver disease, renal failure, and Reye's syndrome. Elevated ammonia is toxic to the central nervous system.

REAGENTS

R 1a Reagent	NADPH α-ketoglutarate	0,26 mmol/L 3,88 mmol/L
R1b Buffer	Triethanolamine pH 8,6	0,15 mol/L
R2	GLDH	≥1200 U/mL
CAL	The concentration of Ammonia CAL is stating on the vial label.	
OPTIONAL	Ammonia Control 4x2 mL ref. 1002240	

PRECAUTIONS

R1b (Sodium hydroxide): **Xi, Irritant.** R36/38 Irritating to eyes and skin. S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. S37/39 Wear suitable gloves and eye/face protection. S45 In case of accident or if you feel unwell seek medical advice immediately
R2, CAL (Sodium azide): **Xn, Harmful.** R22 Harmful if swallowed. R32: Contact with acids liberates very toxic gas. S28: After contact with skin wash immediately with plenty of water. S45: In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show label where possible).

PREPARATION

- **R1a – R1b** Reconstitute the contents of one vial R1a with 5 mL Buffer R1b.
- **R2 – CAL** Ready to use.
- 20 mL of R1b will be used to dilute R2 in case of using the reagent in automatic analyzers.

STORAGE AND STABILITY

R1 (reagent reconstituted with buffer) is stable 5 days at 15-25 °C or 3 weeks at 2-8 °C, stored in the absence of bacterial contamination. The other 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.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 340 nm.
- Thermostatic bath at 37° C (± 0,1°C)
- Matched cuvettes 1,0 cm light path.
- General laboratory equipment ^(Note 1).

SAMPLES ⁽²⁾

Heparinized plasma or EDTA plasma.
 Blood is collected from a stasis-free vein and stored in an ice bath. The plasma is then separated within 30 min. Ammonia assay should be carried out immediately. The plasma may be stored for 2 hours at 2-8 °C.

PROCEDURE

- Assay conditions:
 Wavelength: 340nm
 *Cuvette: 1 cm light path
 Constant temperature 25/30/37°C
 * Please try not to use flow cell. Exchangeable cuvettes are suggested to avoid clogover in manual photometers.
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette:

	WR Blank	Standard	Sample
Sample	----	----	0,1 mL
Distilled water	0,1 mL	----	----
Standard	----	0,1 mL	----
Reagent (R1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- Mix, and allow to stand for 5 min. Read initial absorbance of sample and blank (A1).

- Then add:

GLDH (R2)	0,01 mL	0,01 mL	0,01 mL
-----------	---------	---------	---------

- Mix, and incubate for 5 min. Read final absorbance of sample and blank (A2).

CALCULATIONS

$$A_{\text{blank}} = \text{Blank } A_1 - \text{Blank } A_2$$

$$A_{\text{sample}} = \text{Sample } A_1 - \text{Sample } A_2$$

$$\text{Conc. of Ammonia} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}} \times \text{Standard conc}$$

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: Ammonia Control 4x2 mL ref. 1002240. Control should be assayed at least once a day. Values obtained should fall within the specified range.

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

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

REFERENCE VALUES⁽²⁾

Plasma ammonia:	10	-	47 μmol/L
	0.17	-	80 μg/dL
	0.017	-	0,080 mg/dL

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Linearity: The method is linear to 1180 μmol/L (20 μg/mL, 2 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.

Sensitivity: The minimum detectable concentration with an acceptable level of precision was determined as 23,4 μmol/L (0.39 μg/mL).

Precision:

Mean (μmol/L)	Intra-assay (n=43)			Inter-assay (n=43)		
	66,86	162,23	403,26	66,86	162,23	403,26
SD	2,86	3,16	4,10	4,72	10,49	11,69
CV (%)	4,3	1,9	1,0	7,1	6,5	2,9

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

The results obtained using 56 samples spanning the range 16.57 to 881 μmol/L were the following:

Correlation coefficient (r)²: 1,0.

Regression equation y= 1,02x – 7,33.

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

INTERFERENCES⁽³⁾

Haemolysis interferes with the assay.

NOTES

- In order to avoid contamination it is recommended to use disposable material.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.**

BIBLIOGRAPHY

- Dewan, J.G., Biochem J., 1938; **32**: 1378.
- Mondzac, A., Ehrlich, G.E., Seegmiller, J.E., J Lab Clin. Med., 1965; **66**: 526.
- Howanowitz, J.H., Howanowitz, P.J., Skrodzki, C.A., Iwanski, J.A: Clin. Chem., 1984; **30**:906.
- Neely, W.E., Phillipson, J., Clin Chem, 1988; **34**:1868.
- Pesh-Iman, M., Kumar, S., Willis, C.E., Clin. Chem., 1978; **24**:2044.

PACKAGING

Ref: 1001410

Cont.

R1a: 8 → 5 mL,, R1b: 1 x 60 mL, R2: 1 x 1 mL, CAL: 1 x 5.5 mL

Determinación cuantitativa de Amoniacó IVD

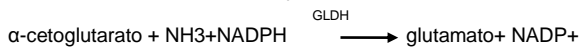
Conservar a 2-8°C

USO PREVISTO

 Para determinación cuantitativa *in vitro* de Amoniacó en plasma.

PRINCIPIO DEL METODO^(1, 4, 5)

El amoniacó se combina con α -cetoglutarato y NADPH en presencia de glutamato deshidrogenasa (GLDH) para producir glutamato y NADP⁺. El correspondiente descenso de absorbancia a 340 nm es proporcional a la concentración de amoniacó en plasma.


SIGNIFICADO CLINICO

La principal fuente de difusión de amoniacó es el tracto gastrointestinal. En condiciones normales, el amoniacó es metabolizado a urea por las enzimas del hígado. Varias enfermedades, tanto congénitas como adquiridas, causan incrementos de amoniacó (hiperamoniemia). La causa principal de hiperamoniemia en los bebés es la deficiencia hereditaria de enzimas del ciclo de la urea. Las enfermedades de hiperamoniemia adquiridas son causadas por enfermedad hepática, insuficiencia renal, y síndrome de Reye. Un nivel alto de amoniacó es tóxico para el sistema nervioso central.

REACTIVOS

R 1a Reactivo	NADPH α -cetoglutarato	0,26 mmol/L 3,88 mmol/L
R1b Tampón	Trietanolamina pH 8,6	0,15 mol/L
R2	GLDH	≥ 1200 U/mL
CAL	La concentración del estándar de amoniacó es la que viene indicada en la etiqueta del vial.	
OPCIONAL	Control de Amoniacó 4x2 mL ref.1002240	

PRECAUCIONES

R1b (Hidróxido de sodio) **Xi, Irritante**. R36/38: Irrita los ojos y la piel. S26: En caso de contacto con los ojos lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdate a un médico. S37/39: Úsense guantes adecuados y protección para los ojos/la cara. S45: En caso de accidente o malestar, acúdate inmediatamente al médico.

R2, CAL (Azida sódica) **Xn, Nocivo**. R22: Nocivo por ingestión. R32: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. S28: En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua. S45: En caso de accidente o malestar, acúdate inmediatamente al médico.

PREPARACION

- **R1a – R1b** Reconstituir el contenido de un vial de R1a con 5 mL de R1b tampón.
- **R2 – CAL** Listos para su uso.
- Para la utilización de este reactivo en analizadores automáticos, se debe diluir R2 con 20 mL de R1b.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

R1 (reactivo reconstituido con el tampón) es estable 5 días a 15-25 °C o 3 semanas a 2-8 °C, conservado en ausencia de contaminación bacteriana. El resto de componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, 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.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 340 nm.
- Baño termostatable a 37°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$)
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio ^(Nota 1).

MUESTRAS⁽²⁾

Plasma heparinizado o EDTA plasma. Extraer sangre sin hemólisis y almacenar en baño de hielo. Separar el plasma o suero de los eritrocitos dentro de los 30 minutos después de la extracción. El ensayo de amoniacó se debe realizar inmediatamente. El plasma se puede conservar 2 horas a 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 340 nm
 - *Cubeta: 1 cm paso de luz
 - Temperatura constante: 25/30/37°C
 - *Se sugiere usar cubetas desechables en lugar de cubetas de flujo, para evitar posibles contaminaciones en analizadores manuales.

- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

- Pipetear en la cubeta:

	Blanco RT	Estándar	Muestra
Muestra	----	----	0,1 mL
Agua destilada	0,1 mL	----	----
Estándar	----	0,1 mL	----
Reactivo (R1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- Mezclar, y dejar reposar durante 5 min. Leer la absorbancia inicial de la muestra y del blanco (A1).

- Añadir entonces:

GLDH (R2)	0,01 mL	0,01 mL	0,01 mL
-----------	---------	---------	---------

- Mezclar e incubar durante 5 min. Leer la absorbancia final de la muestra y blanco (A2).

CALCULOS

$$A_{\text{blanco}} = \text{Blanco } A_1 - \text{Blanco } A_2$$

$$A_{\text{muestra}} = \text{Muestra } A_1 - \text{Muestra } A_2$$

$$\text{Conc. de Amoniacó} = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{estandar}} - A_{\text{blanco}}} \times \text{Conc. estándar}$$

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: Control de Amoniacó 4x2 mL ref.1002240. Se debe ensayar el control al menos una vez al día. Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica. 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⁽²⁾

Amoniacó en plasma:	10	-	47 $\mu\text{mol/L}$
	0,17	-	80 $\mu\text{g/dL}$
	0,017	-	0,080 mg/dL

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

CARACTERISTICAS DEL METODO

Linealidad: El método es lineal hasta 1180 $\mu\text{mol/L}$ (20 $\mu\text{g/mL}$, 2 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.

Sensibilidad: La mínima concentración detectable con un nivel de precisión aceptable, se determinó como 23,4 $\mu\text{mol/L}$ (0,39 $\mu\text{g/mL}$).

Precisión:

	Intraserie (n=43)			Interserie (n=43)		
Media ($\mu\text{mol/L}$)	66,86	162,23	403,26	66,86	162,23	403,26
SD	2,86	3,16	4,10	4,72	10,49	11,69
CV (%)	4,3	1,9	1,0	7,1	6,5	2,9

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

Los resultados obtenidos con 56 muestras de pacientes con concentraciones de 16,57 hasta 881 $\mu\text{mol/L}$ fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (r)²: 1,0.

Ecuación de la recta de regresión: $y = 1,02x - 7,33$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS⁽³⁾

La hemólisis interfiere en el ensayo.

NOTAS

- A fin de evitar contaminaciones se recomienda utilizar material de plástico de un solo uso.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFIA

- Dewan, J.G., Biochem J., 1938; **32**: 1378.
- Mondzac, A., Ehrlich, G.E., Seegmiller, J.E., J Lab Clin. Med., 1965; **66**: 526.
- Howanowitz, J.H., Howanowitz, P.J., Skrodzki, C.A., Iwanski, J.A: Clin. Chem., 1984; **30**:906.
- Neely, W.E., Phillipson, J., Clin Chem, 1988; **34**:1868.
- Pesh-Iman, M., Kumar, S., Willis, C.E., Clin. Chem., 1978; **24**:2044.

PRESENTACION

Ref: 1001410 Cont. R1a: 8 \rightarrow 5 mL, R1b: 1 x 60 mL, R2: 1 x 1 mL, CAL: 1 x 5.5 mL