

## Quantitative determination of Ammonia IVD

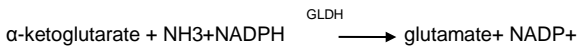
Store at 2-8°C

### INTENDED USE

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

### PRINCIPLE OF THE METHOD<sup>(1, 4, 5)</sup>

Ammonia combines with  $\alpha$ -ketoglutarate and NADPH in the presence of glutamate dehydrogenase (GLDH) to yield glutamate and NADP<sup>+</sup>. 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

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

### PRECAUTIONS

**R1b:** H315-Causes skin irritation. H319-Causes serious eye irritation. Follow the precautionary statements given in MSDS and label of the product.

### 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 ( $\pm 0,1^\circ\text{C}$ )
- Matched cuvettes 1,0 cm light path.
- General laboratory equipment <sup>(Note 1)</sup>.

### SAMPLES <sup>(2)</sup>

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<sup>(2)</sup>

Plasma ammonia:	10	-	47 $\mu\text{mol/L}$
	0,17	-	0,80 $\mu\text{g/mL}$
	0,017	-	0,080 $\text{mg/dL}$

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

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Linearity:** The method is linear to 1180  $\mu\text{mol/L}$  (20  $\mu\text{g/mL}$ , 2  $\text{mg/dL}$ ). 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  $\mu\text{mol/L}$  (0.39  $\mu\text{g/mL}$ ).

### Precision:

	Intra-assay (n=43)			Inter-assay (n=43)		
	Mean ( $\mu\text{mol/L}$ )	66,86	162,23	403,26	66,86	162,23
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  $\mu\text{mol/L}$  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<sup>(3)</sup>

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  $\rightarrow$  5 mL, R1b:1 x 60 mL, R2:1 x 1 mL, CAL:1 x 5.5 mL

### Determinación cuantitativa de Amoníaco IVD

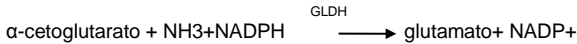
Conservar a 2-8°C

#### USO PREVISTO

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

#### PRINCIPIO DEL METODO<sup>(1, 4, 5)</sup>

El amoníaco 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 amoníaco en plasma.



#### SIGNIFICADO CLINICO

La principal fuente de difusión de amoníaco es el tracto gastrointestinal. En condiciones normales, el amoníaco es metabolizado a urea por las enzimas del hígado. Varias enfermedades, tanto congénitas como adquiridas, causan incrementos de amoníaco (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 amoníaco es tóxico para el sistema nervioso central.

#### REACTIVOS

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

#### PRECAUCIONES

R1b: H315-Provoca irritación cutánea. H319-Provoca irritación ocular grave.  
Seguir los consejos de prudencia indicados en la FDS y etiqueta del producto.

#### 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 (± 0,1°C)
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio <sup>(Nota 1)</sup>.

#### MUESTRAS<sup>(2)</sup>

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 amoníaco 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.

#### 3. 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).

#### 5. 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

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

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

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

#### CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: Control de Amoníaco 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<sup>(2)</sup>

Amoníaco en plasma:	10	-	47 μmol/L
	0,17	-	0,80 μg/mL
	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 μmol/L (20 μg/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 μmol/L (0,39 μg/mL).

#### Precisión:

	Intraserie (n=43)			Interserie (n=43)		
Media (μmol/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 μmol/L fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (r)<sup>2</sup>: 1,0.

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

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

#### INTERFERENCIAS<sup>(3)</sup>

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

**Determinação quantitativa de Amoníaco IVD**

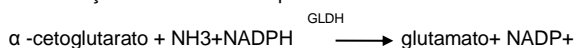
Armazenar a 2-8 °C.

**UTILIZAÇÃO PREVISTA**

 Para a determinação quantitativa *in vitro* de Amoníaco no plasma.

**PRINCÍPIO DO MÉTODO**<sup>(1, 4, 5)</sup>

O amoníaco combina-se com o  $\alpha$ -cetogluturato e NADPH na presença de glutamato desidrogenase (GLDH) para produzir glutamato e NADP+. A diminuição correspondente na absorvância a 340 nm é proporcional à concentração de amoníaco no plasma.


**SIGNIFICADO CLÍNICO**

A principal fonte de difusão de amoníaco é o tracto gastrointestinal. Em condições normais, o amoníaco é metabolizado em ureia pelas enzimas do fígado. Várias doenças, tanto congénitas como adquiridas, provocam aumentos de amoníaco (hiperamónémia). A principal causa de hiperamónémia nos bebés é a deficiência hereditária de enzimas do ciclo da ureia. As doenças de hiperamónémia adquiridas são causadas por doença hepática, insuficiência renal e Síndrome de Reye. Um nível elevado de amoníaco é tóxico para o sistema nervoso central.

**REAGENTES**

<b>R 1a</b> Reagente	NADPH $\alpha$ -cetogluturato	0,26 mmol/L 3,88 mmol/L
<b>R1b</b> Tampão	Trietanolamina pH 8,6	0,15 mol/L
<b>R2</b>	GLDH	$\geq 1200$ U/mL
<b>CAL</b>	A concentração do padrão de amoníaco é a que está indicada na etiqueta do vial.	
<b>OPCIONAL</b>	Controlo de Amoníaco 4x2 mL ref.1002240	

**PRECAUÇÕES**

**R1b:** H315-Provoca irritação cutânea. H319- Provoca irritação ocular grave. Seguir os conselhos de prudência dados em SDS e etiqueta.

**PREPARAÇÃO**

- **R1a – R1b** Reconstituir o conteúdo de um vial de R1a com 5 mL de tampão R1b.
- **R2 – CAL** Pronto para utilização.
- Para a utilização deste reagente em analisadores automáticos, deve-se diluir R2 com 20 mL de R1b.

**CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE**

R1 (reagente reconstituído com o tampão) é estável durante 5 dias a 15-25 °C ou durante 3 semanas a 2-8 °C, conservado na ausência de contaminação bacteriana. Os restantes componentes do kit são estáveis até à data de validade indicada na etiqueta do vial, quando os frascos são mantidos bem fechados a 2-8 °C, protegidos da luz e se evita a sua contaminação. Não utilizar reagentes que tenham excedido a data indicada.

**EQUIPAMENTO ADICIONAL**

- Espectrómetro ou colorímetro a medir a 340 nm.
- Banho termostático a 37 °C ( $\pm 0,1$  °C)
- Cuvetes equipadas 1,0 cm passo de luz.
- Equipamento de laboratório geral <sup>(Nota 1)</sup>.

**AMOSTRAS**<sup>(2)</sup>

Plasma heparinizado ou EDTA plasma.

Extraír sangue sem hemólise e armazenar em banho de gelo. Separar o plasma ou soro dos eritrócitos num intervalo de 30 minutos após a sua extração. O ensaio de amoníaco deve realizar-se imediatamente. O plasma pode conservar-se durante 2 horas a 2-8 °C.

**PROCEDIMENTO**

- Condições dos ensaios:  
 Comprimento de onda: ..... 340 nm  
 Cuvette: ..... 1 cm passo de luz  
 Temperatura constante ..... 25/30/37 °C  
 \*Sugere-se utilizar cuvettes descartáveis em vez de cuvettes de fluxo, de modo a evitar possíveis contaminações em analisadores manuais.
- Ajustar o instrumento para zero com água destilada.
- Pipetar numa cuvette:

	Branco Reagente	Padrão	Amostra
Amostra	----	----	0,1 mL
Água destilada	0,1 mL	----	----
Padrão	----	0,1 mL	----
Reagente (R1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- Misturar e deixar repousar durante 5 min. Ler a absorvância inicial da amostra e do branco (A1).

- Adicionar em seguida:

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

- Misturar e incubar durante 5 min. Ler a absorvância final da amostra e do branco (A2).

**CÁLCULOS**

$$A_{\text{branco}} = \text{Branco } A_1 - \text{Branco } A_2$$

$$A_{\text{amostra}} = \text{Amostra } A_1 - \text{Amostra } A_2$$

**Utilizando o padrão:**

$$\text{Conc. de Amoníaco} = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}}{A_{\text{padrão}} - A_{\text{branco}}} \times \text{Conc. padrão}$$

**CONTROLO DE QUALIDADE**

É conveniente analisar juntamente com as amostras, soros controlo avaliados: Controlo de Amoníaco 4x2 mL ref.1002240. Devem-se ensaiar 2 níveis de controlo pelo menos uma vez ao dia. Se os valores obtidos se encontrarem fora do intervalo de tolerância, devem-se rever o instrumento, os reagentes e a técnica. Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio esquema de Controlo de Qualidade e as acções correctivas no caso de os controlos não estarem de acordo com as tolerâncias aceitáveis.

**VALORES DE REFERÊNCIA**<sup>(2)</sup>

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

Estes valores servem apenas como referência. Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo de referência.

**CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO**

**Linearidade:** O método é linear até 1180  $\mu\text{mol/L}$  (20  $\mu\text{g/mL}$ , 2 mg/dL)

Se a concentração da amostra for superior ao limite de linearidade, diluir 1/2 com NaCl 9 g/L e multiplicar o resultado final por 2.

**Sensibilidade:** A concentração mínima detectável com um nível de precisão aceitável foi determinado como 23.4  $\mu\text{mol/L}$  (0.39  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Precisão:**

	Intrasérie (n=43)			Intersérie (n=43)		
Média ( $\mu\text{mol/L}$ )	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

**Exactidão:** Os reagentes SPINREACT (y) não apresentam diferenças sistemáticas significativas quando se comparam com outros reagentes comerciais (x).

Os resultados obtidos utilizando 56 amostras entre 16,57 e 881  $\mu\text{mol/L}$  foram os seguintes:

Coefficiente de correlação (r): 1,0.

Equação da recta de regressão :  $y = 1,02x - 7,33$ .

As características do método podem variar segundo o equipamento utilizado.

**INTERFERÊNCIAS**<sup>(3)</sup>

A hemólise interfere no ensaio.

**NOTAS**

- De modo a evitar contaminações, recomenda-se utilizar material de plástico de utilização única.
- A SPINREACT dispõe de instruções detalhadas para a aplicação deste reagente em diferentes analisadores.**

**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.

**APRESENTAÇÃO**

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