Urea. Ureasa-GLDH. Cinético. Líquido	Ref.: URE-015	5 x40 +1x50 mL
Determinación cuantitativa de urea	URE-015B	1x1000 +1x250 mL
Solo para uso in vitro en el laboratorio clínico	URE-015S	1x40 + 1x10 mL
Conservar a 2-8ºC	URE-115	3x250 + 1x200 mL CAL: 1 x 5 mL

UREA

CE

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, presente en la muestra, en amoniaco (NH_4^+) y anhídrido carbónico (CO_2).
Los iones amonio formados se incorporan al α-cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) con oxidación paralela de NADH a NAD^+ :

$$\text{Urea} + H_2O + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{Ureasa}} (NH_4)_2^+ + CO_2$$

$$NH_4^+ + \alpha\text{-Cetoglutarato} + NADH \xrightarrow{\text{GLDH}} H_2O + NAD^+ + \text{L-Glutamato}$$

La disminución de la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración de urea de la muestra ensayada[1].

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 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 Tampón	TRIS pH 7,8 α-Cetoglutarato Ureasa	80 mmol/L 6 mmol/L 75000 U/L
R 2 Enzimas	GLDH NADH	60000 U/L 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 RT es de 1 mes a 2-8ºC o una semana temperatura ambiente (15-25ºC)
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 2-8ºC, 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 heparinizado[1]: No usar sales de amonio o fluoruro como anticoagulantes.
- Orina[1]: 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 2-8ºC.

PROCEDIMIENTO
1. Condiciones del ensayo:
   Longitud de onda ..... 340 nm
   Cubeta ..... 1 cm paso de luz
   Temperatura ..... 37ºC / 15-25ºC
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetear en una cubeta[(Nota 4)]:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón [(Nota2,3)] (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

4. Mezclar. Leer las absorbancias a los 30 s (A_1) y a los 90 s (A_2).
5. Calcular: $\Delta A = A_1 - A_2$.

CÁLCULOS

$$\frac{(A1-A2)\,Muestra - (A1-A2)\,Blanco}{(A1-A2)\,Patrón - (A1-A2)\,Blanco} \times 50 \text{ (Conc. Patrón)} = \text{mg/dL de urea en la muestra}$$

mg/dL urea x 0,466 = mg/dL de urea BUN (Blood Urea Nitrogen)[1]

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

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados.
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:
20 – 35 g/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* 0.743mg/dL hasta el *límite de linealidad* 400 mg/dL.
Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.
Precisión:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (mg/dL)	37.5	120	40.0	126
SD	1.05	0.92	1.06	2.07
CV (%)	2.79	0.77	2.65	1.65

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,00180 A
Exactitud: Los reactivos BSM (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)[2]: 0,98209.
Ecuación de la recta de regresión: y= 1,0343x – 1,2105.
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 fluoruro[1].
Se han descrito varias drogas y otras substancias que interfieren en la determinación de la urea[2,3]

NOTAS
1. UREA CAL: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo consumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
2. El material empleado así como el agua destilada que se utilice deben estar libres de amoniaco y/o sus sales[1].
3. La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
4. Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
5. **BSM dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFÍA

1. *Kaplan A. Urea. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1257-1260 and 437 and418.*
2. *Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.*
3. *Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.*
4. *Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.*
5. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

Bio-Science Medical S.L. C/ Velázquez,64-66, 7ª plta. 28001 MADRID (SPAIN)

Urea.Urease-GLDH. Kinetic. Liquid	Ref.: URE-015	5 x40 +1x50 mL
Quantitative Determination of urea	URE-015B	1x1000 +1x250 mL
Only for *in vitro* use in clinical laboratory	URE-015S	1x40 + 1x10 mL
Store at 2-8ºC	URE-115	3x250 + 1x200 mL
		CAL: 1 x 5 mL

UREA

CE

PRINCIPLE OF THE METHOD

Urea in the sample is hydrolized enzymatically into ammonia (NH_4^+) and carbon dioxide (CO_2).

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

$$\text{Urea} + H_2O + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{Urease}} (NH_4^+)_2 + CO_2$$

$$NH_4^+ + \alpha\text{-Ketoglutarate} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{GLDH}} H_2O + NAD^+ + \text{L-Glutamate}$$

The decrease in concentration of NADH, is proportional to urea concentration in the sample[1].

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 Buffer	TRIS pH 7.8	80 mmol/L
	α-Ketoglutarate	6 mmol/L
	Urease	75000 U/L
R 2 Enzymes	GLDH	60000 U/L
	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 enzymes.

The (WR) is stably for 1 month at 2-8ºC or 1 week at room temperature (15-25ºC)

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 2-8ºC, 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 plasma[1]: Do not use ammonium salts or fluoride as anticoagulants.
- Urine[1]: 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 2-8ºC for 5 days.

PROCEDURE

1. Assay conditions:
   Wavelength: . . . . . 340 nm
   Cuvette: . . . . . .1 cm light path
   Temperature: . . . . . 37ºC / 15-25ºC
2. Adjust the instrument to zero with distilled water.
3. Pipette into a cuvette(Note 4):

	Blank	Standard	Sample
WR (mL)	1,0	1,0	1,0
Standard(Note 2,3) (µL)	--	10	--
Sample (µL)	--	--	10

4. Mix and read the absorbance after 30 s (A_1) and 90 s (A_2).
5. Calculate: $\Delta A = A_1 - A_2$.

CALCULATIONS

$$\frac{(A1-A2)Sample-(A1-A2)Blank}{(A1-A2)Standard-(A1-A2)Blank}$$ x 50 (Standard conc) = mg/dL urea in the sample

mg/dL urea x 0,466 = mg/dL urea BUN (Blood Urea Nitrogen)[1].

Conversion factor: mg/dL x 0,1665 = mmol/L.

QUALITY CONTROL

Control Sera are recommended to monitor the performance of assay procedures.

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:

20 – 25 g/24 h

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From *detection limit* 0.743 mg/dL to *linearity limit* 400 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:

	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
Mean (mg/dL)	37.5	120	40.0	126
SD	1.05	0.92	1.06	2.07
CV (%)	2.79	0.77	2.65	1.65

Sensitivity: 1 mg/dL = 0,00180 A.

Accuracy: Results obtained using BSM 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)[2]: 0,98209.

Regression equation y= 1,0343x – 1,2105.

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 fluoride[1].

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

NOTES

1. UREA CAL: Proceed carefully with this product because due its nature it can get contaminated easily.
2. Glassware and distilled water must be free of ammonia and ammonium salts[1].
3. Calibration with the aqueous standard may cause a systematic error in automatic procedures. In these cases, it is recommended to use a serum Calibrator.
4. Use clean disposable pipette tips for its dispensation.
5. **BSM has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.**

BIBLIOGRAPHY

1. 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.
2. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
3. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
4. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
5. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

Bio-Science Medical S.L. C/ Velázquez,64-66, 7ºplta, 28001 MADRID (SPAIN)