

USO

Este reactivo es utilizado para la determinación cuantitativa de amonio en plasma. Sólo para uso in vitro.

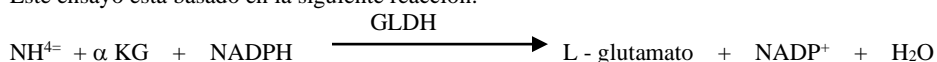
SIGNIFICADO CLÍNICO

El volumen de amonio en el cuerpo es generado en el sistema gastrointestinal por acción de enzimas bacterianas contenidas en el colon y por hidrólisis de glutamina. Es removido en el hígado y convertido a urea a través de una serie de reacciones enzimáticas en el ciclo de Krebs-Henseleit. Entre otras condiciones, enfermedad avanzada de hígado y encefalopatía hepática resultan en concentraciones elevadas de amonio en sangre. La hiperamonemia también es común en deficiencias inherentes a las enzimas implicadas en la conversión del amonio a urea. La determinación de amonio es muy usada en el diagnóstico y pronóstico del Síndrome de Reye. Mucho amonio en la sangre provoca efectos tóxicos en el sistema nervioso central.

PRINCIPIO

La determinación enzimática de amonio permite una medición directa del componente en el plasma el cual evita el largo y laborioso método de separación empleada en metodologías más viejas. El ensayo enzimático da una alta sensibilidad y un método específico.

Este ensayo está basado en la siguiente reacción:



El amonio reacciona con α -ceto-glutarato (α KG) y reduce el fosfato nicotinamida-adenin dinucleótido (NADPH) a L-glutamato y NADP en una reacción catalizada por glutamato-deshidrogenasa (GLDH). La cantidad de NADPH oxidada es, en una base molar, igual al contenido de amonio en la muestra. La reacción puede ser seguida por el decremento en absorbancia a 340 nm. El reactivo está suministrado en dos viales separados. Guardando los componentes del reactivo por separado hasta el momento del ensayo, incrementa su estabilidad después de su reconstitución. El uso de NADPH en lugar de NADH minimiza la interferencia de algunos componentes del plasma como piruvato y lactato deshidrogenasa.

REACTIVOS

Amonio Sustrato Reactivo1: buffer 100 mmol/L; EDTA 2 mmol/L; α -cetoglutarato 3.4 mmol/L; adenosin-difosfato 0.5 mmol/L; NADPH 0.3mmol/L; estabilizadores; pH = 8.6 +/- 0.1

Amonio Enzima Reactivo2: buffer 100 mmol/L; EDTA 2 mmol/L; adenosin-difosfato 0.5 mmol/L; GLDH 400 KU/L; estabilizadores; pH = 7.8 +/- 0.1

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Use sólo agua libre de amonio, recién desionizada o destilada. Disuelva el reactivo 1 y el reactivo 2 con el volumen de agua que indica la etiqueta en el vial. Mantenga las soluciones bien tapadas.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Los reactivos en polvo que no han sido abiertos son estables hasta la fecha de expiración que indica la etiqueta del vial. Los reactivos reconstituidos son estables por lo menos 15 días guardados a 2-8 °C.

PRECAUCIONES

Evite la contaminación por el amonio proveniente del aire, agua y cristales. La contaminación con amonio puede ser analizada ensayando el agua que se usa con estos reactivos.

El humo de tabaco debe ser evitado en la habitación del paciente y en el área del laboratorio mientras el ensayo es realizado. El flebotomista debe ser un no fumador. Si el paciente es un fumador, lave el sitio de la punción. La sangre debe ser extraída en un lugar donde no se permitan fumadores.

No use el reactivo si la absorbancia del reactivo 1 cuando se lee a una absorbancia de 340 nm contra un blanco de agua es menor que 1.200. Evite usar reactivos contaminados. Si el reactivo muestra contaminación microbiana, la cuál es indicada por turbidez, no lo use.

PRECAUCION: Este reactivo contiene azida de sodio.

RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO

El plasma con EDTA es el espécimen adecuado. No se recomienda el uso de heparina como anticoagulante. La sangre debe extraerse de la vena y colectada en un tubo con EDTA. El plasma debe ser separado del suero inmediatamente. No utilice muestras hemolizadas.

El análisis debe ser realizado durante los primeros 30 minutos.

Es permitido un máximo de 2 horas de retraso si el plasma se guarda en hielo.

INTERFERENCIAS

La mayor interferencia para este ensayo es la contaminación por amonio proveniente del aire y el agua.

MATERIALES SUMINISTRADOS

Reactivos de Amonio en polvo, listos para ser reconstituidos como se describió anteriormente.

MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

1. Pipetas para dispensar los volúmenes adecuados.
2. Celdas de reacción, cuadradas, paso de luz de 1 cm.
3. Estándares o calibradores de Amonio.
4. Espectrofotómetro capaz de leer a 340 nm.
5. No es necesario un dispositivo para mantener constante la temperatura. De todas maneras, utilice la misma temperatura para controles y muestras.

PROCEDIMIENTO

Longitud de onda	340 nm
Temperatura	25 °C
Cuvas (cuadradas)	1 cm de paso de luz
Blanco:	Agua
Reactivo 1	1 mL
Muestra	0.2 mL.

Mezcle. Incube por 4 minutos. Lea la absorbancia a 340 nm con el instrumento llevado a absorbancia cero con el blanco de agua.

Esta es la lectura del R1, la cuál debe ser corregida para compensar la adición del volumen del R2:

$$R1 \times 0.96 = R_{1C}$$

R_{1C} es calculada para calcular la Δ de absorbancias.

Agregar 0.05 mL del Reactivo 2, mezcle, incube. Después de 5 minutos lea la absorbancia otra vez. Esta es la lectura R2.

Calcule el cambio en la absorbancia, ΔA . Use este valor de ΔA en el cálculo:

$$\Delta A = R_{1C} - R_2$$

NOTA: Corra un ensayo con blanco empleando agua en lugar de muestra para saber si hay contaminación.

El valor obtenido del blanco debe ser sustraído del valor encontrado para la muestra.

LIMITACIONES

Las muestras con concentraciones de amonio que exceden 600 $\mu\text{mol/L}$ ($\Delta A > 0.600$) deben ser ensayadas otra vez después de una dilución 1:1 empleando agua destilada o agua desionizada. Multiplique el resultado por 2.

CALIBRACIÓN

Esta prueba puede trabajarse usando estándares de amonio ó un factor.

CÁLCULOS

1.- Factor

$$\Delta A \times \frac{1.25 \times 1000}{6.22 \times 1 \times 0.2} = \Delta A \times 1005 = \mu\text{mol/L de amonio en muestra}$$

En donde:

1.25 = volumen total del ensayo (mL)

1000 = conversión a litros

6.22 = coeficiente de extinción milimolar del NADPH a 340 nm

1 = paso de luz (cm)

0.2 = volumen de la muestra (mL)

El factor 1005 multiplicado por ΔA es igual a la concentración de amonio en la muestra en $\mu\text{mol/L}$.

2.- Estándar

Concentración del estándar de Amonio = 500 $\mu\text{mol/L}$

ΔA del estándar de Amonio = 0.496

ΔA de la muestra = 0.115

$$\frac{500}{0.496} \times 0.115 = 116 \mu\text{mol/L de Amonio en la muestra}$$

CONTROL DE CALIDAD

Los controles se recomiendan para monitorear la ejecución del ensayo, ofreciendo una revisión constante del instrumento, los reactivos y la técnica.

VALORES ESPERADOS

Los parámetros esperados reportados para el procedimiento enzimático descrito son 11-35 $\mu\text{mol/L}$.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios parámetros de referencia.

LINEARIDAD

600 $\mu\text{mol/L}$
