

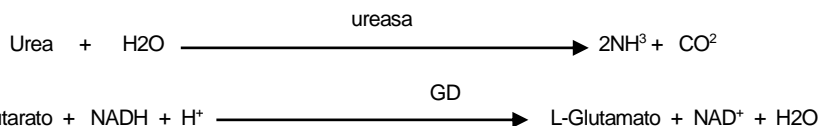
SIGNIFICADO CLINICO

La determinación de Nitrógeno de Urea en suero se utiliza como una prueba de respaldo para función renal. Cuando se determina en conjunción con la creatinina en suero es de ayuda en el diagnóstico diferencial de los 3 tipos de azotemia: pre-renal, renal y post-renal.

HISTORIA DEL METODO

La urea ha sido determinada por el método directo donde la urea se condensa con diacetil para formar un cromógeno y un método indirecto donde el amonio es medido como un producto de la acción de la ureasa en urea. El amonio liberado se mide usando el reactivo de Nessler y la reacción de Berthelot. Talke y Schubert introdujeron un procedimiento totalmente enzimático en 1965 utilizando ureasa y glutamato deshidrogenasa. El presente procedimiento está basado en una modificación de su método.

PRINCIPIO



La urea es hidrolizada por la ureasa para producir amonio y bióxido de carbono. El amonio liberado reacciona con alfa-cetoglutarato en la presencia de NADH para producir glutamato. Una cantidad equimolar de NADH sufre oxidación durante la reacción resultando en un decremento en la absorbancia que es directamente proporcional a la concentración del nitrógeno de urea en la muestra.

REACTIVOS

Concentraciones del reactivo de trabajo: ureasa (Jack Bean) 15 000 U/L, GLDH (bovino) 1667 U/L, ADP 2.0 mM, alfa-cetoglutarato 4.0 mM, NADH 0.28 mM, buffer pH 7.7 - 7.9, estabilizadores, azida de sodio(0.2%) como preservativo.

El reactivo de trabajo se prepara mezclando 5 partes del reactivo de enzima (R1) con una parte de coenzima (R2).

Tanto los reactivos R1 y R2 como el reactivo de trabajo deben ser guardados a 2-8 °C .

El reactivo de trabajo es estable 14 días en refrigeración y 3 días a temperatura ambiente.

El reactivo no debe ser usado si el reactivo de trabajo tiene una absorbancia en el blanco de reactivo menor a 1.0 a 340 nm.

INTERFERENCIAS

La acción de la ureasa es inhibida por el Flúor .

Las muestras con niveles anormales de amonio dan resultados de BUN falsamente elevados.

Bilirrubinas a un nivel de 20 mg/dL causan interferencia en esta prueba (<2%).

Se encontraron hemoglobinas a un nivel de 200 mg/dL para exhibir interferencias (<5%).

MATERIAL

Nitrógeno de urea reactivo enzimático (R1)

Nitrógeno de urea reactivo de coenzima (R2)

MATERIAL RQUERIDO NO PROVISTO

Pipetas automatizadas (10 uL y 1 mL).

Cronómetro capaz de medir intervalos de 30 y 60 segundos.

Tubos de ensayo.

Espectrofotómetro con temperatura controlada, capaz de medir a 340 nm.

PROCEDIMIENTO (AUTOMATIZADO GENERAL)

Longitud de onda	340 nm.
Tipo de ensayo	Razón inicial
Relación muestra / reactivo	1:101
Dirección de la reacción:	Decremento
Temperatura	37°C
Fase lag	30 segundos
Tiempo de lectura	60 segundos
Valor normal bajo	7 mg/dL
Valor normal alto	18 mg/dL

PROCEDIMIENTO (MANUAL)

Preparar el reactivo de trabajo de acuerdo a las instrucciones.
Ajustar el espectrofotómetro a cero con agua destilada a 340 nm.
Pipetear 1.0 mL de reactivo en cada tubo, permita al reactivo llegar a 37 °C.
Agregar 10 uL de calibrador, control o muestra al tubo de prueba e inmediatamente colocar en el espectrofotómetro.
Después de 30 segundos leer y anotar la absorbancia(A1).
60 segundos después tomar la segunda lectura (A2).
Determinar el cambio de absorbancia entre las dos lecturas (A1_A2).
Repetir el procedimiento para cada muestra.
Ver cálculos para determinar resultados.

LIMITACIONES

Las muestras arriba de 150 mg / dL deben ser diluidas en solución salina 0.9 % 1:1, repetir el ensayo y multiplicar el resultado por 2.

CALIBRACIÓN

Utilice un estándar BUN (20 mg / dL) o suero calibrador. La prueba debe ser calibrada de acuerdo a las instrucciones de calibración del instrumento. Si los resultados del control se encuentran fuera del rango, la prueba debe ser recalibrada.

CALCULOS

(A1-A2) = cambio de absorbancia entre lecturas.

$$\frac{(A1-A2) \text{ desconocido}}{(A1-A2) \text{ estándar}} * \text{concentración del estándar} = \text{concentración de BUN}$$

CONTROL DE CALIDAD

La validez de la reacción debe ser monitoreada por el uso de un suero control con valores normales y anormales de BUN conocidos. Estos controles deben ser corridos por lo menos cada sesión en la que se ejecuten ensayos de BUN. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propias frecuencias de determinación de control.

VALORES ESPERADOS

7-18 mg/dL.

Se recomienda ampliamente que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

LINEARIDAD

0-150 mg/dL.

FABRICADO POR:

POINTE SCIENTIFIC, INC.
E.E.U.U.