



AMMONIA

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA dell'AMMONIO su PLASMA con Analizzatore MINDRAY BS-300

Σ 300 tests (20 x 3 mL)

REF NCAAM8870

DESTINAZIONE D'USO

Una fase fondamentale del metabolismo proteico è la deaminazione, durante la quale i singoli aminoacidi vengono privati del gruppo aminico (NH_2). Questo gruppo viene trasferito all'alfa-chetoglutarato (intermedio del ciclo di Krebs), con formazione di glutammato; quest'ultimo subisce una deaminazione ossidativa nella matrice mitocondriale con produzione di ammoniaca libera (NH_3).

L'ammoniaca è una molecola tossica, soprattutto per il cervello. Un organismo sano è in grado di trasformarla in composti atossici, che ne costituiscono anche la forma di trasporto e di pre-eliminazione:

- 1) può essere aggiunta all'alfa-chetoglutarato per riformare glutammato,
- 2) può essere incorporata nella molecola di glutammato per dare glutammina,
- 3) può essere indirizzata alla sintesi del carbamilfosfato, precursore del ciclo dell'urea, che a livello epatico porta alla trasformazione dell'ammoniaca in urea, atossica, eliminata nell'urina.

In presenza di gravi malattie epatiche quali cirrosi, epatite e Sindrome di Reye, l'ammonio si accumula nel sangue.

Elevate concentrazioni di ammonio possono risultare tossiche, specialmente per il cervello, e possono essere implicate nello sviluppo della encefalopatia portosistemica.

PRINCIPIO

L'Ammonio reagisce con il 2-ketoglutarato per dare L-glutamato, in presenza della glutamato deidrogenasi (GLDH) e di NADPH; in questa reazione NADPH viene ossidato ad NADP.

La quantità di NADPH che viene ossidata nella reazione letta in UV, è proporzionale alla concentrazione dell'Ammonio nel campione esaminato.

Usando lo standard contenuto nel kit è possibile preparare una curva di calibrazione a cui fare riferimento. Riportando sulla medesima i valori di assorbanza e le concentrazioni dei singoli punti, si possono determinare le concentrazioni dei singoli campioni.

PRECAUZIONI D'USO

1. Questo prodotto è stato formulato per uso diagnostico in vitro.
2. Una variazione proporzionale dei volumi di reazione non modifica il risultato.
3. NON miscelare tra loro Reagenti da diversi lotti di produzione.
4. Per concentrazioni di Ammonio maggiori di 1000 $\mu\text{g/dL}$ (587.0 $\mu\text{mol/L}$), diluire il campione 1:2 con fisiologica, ritestare e moltiplicare il risultato x 2.
5. Oltre alle eventuali indicazioni di rischio, il Reagente contiene conservanti (sodio azide o altri), la cui concentrazione totale è inferiore ai limiti riportati nelle Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE e relative modifiche per la classificazione, etichettatura ed

imballaggio di preparati pericolosi (Reagenti). Tuttavia si raccomanda di manipolare i reagenti con cautela, evitandone l'ingestione ed il contatto con gli occhi, la pelle e le mucose; di seguire quindi le norme di buona pratica di laboratorio nell'utilizzo di questi materiali. Nelle schede di sicurezza vengono descritte le procedure operative per la manipolazione di questo prodotto. Le schede di sicurezza vengono fornite su richiesta.

ATTENZIONE!

A) Le applicazioni su analizzatori di routine possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale; inoltre le procedure sono specifiche per ciascun analizzatore.

B) Elevata attenzione deve essere data alle sostanze interferenti: alcuni farmaci ed altre sostanze potrebbero influenzare i livelli od il dosaggio di Ammonio (cfr Bibliografia 2).

C) Il Reagente deve essere impiegato SOLO per l'uso indicato, da personale esperto e addestrato, seguendo le norme della buona pratica di laboratorio.

D) La diagnosi clinica non può essere fatta correttamente usando il risultato di un solo test, ma deve essere fatta integrando criticamente i risultati di diversi test di laboratorio con differenti dati clinici.

E) Una serie di fattori, quali la temperatura ambientale, la temperatura dei reagenti di lavoro, l'accuratezza dei lavaggi e il tipo di spettrofotometro, possono influire sulle prestazioni del test.

F) Lavorare in una atmosfera libera da vapori di ammonio (NON SI DEVE FUMARE in laboratorio!).

G) NON DIMENTICARE MAI che l'Ammonio evapora molto facilmente dai campioni.

H) I campioni devono essere tenuti sempre in contenitori ben chiusi ed in bagno di ghiaccio.

I) La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.

J) Per la manipolazione dei Reagenti devono essere osservate le precauzioni normalmente adottate in laboratorio.

Tutti i calibratori e controlli vanno considerati come campioni umani, quindi potenzialmente infettivi; devono quindi essere adottate tutte le misure di protezione adeguate allo scopo di evitare ogni tipo di potenziale rischio biologico.

REAGENTI

Composizione del kit:

R1 - BUFFER	Good buffer > 10 mmol/L	REF AM8870 1 x 60 mL
R2 - ketoglutarate	ketoglutarato > 4 mmol/L	20 x 3 mL
R3 - GLDH, NADPH	(PRONTO ALL'USO) GLDH > 200 U/L NADPH > 0.1 mmol/L	1 x 16 mL
	ADP > 3 mmol/L Eccipienti	

R4 - **CAL**

1 x 5 mL

(PRONTO ALL'USO)

Soluzione di Ammonio = 500 µg/dL (= 293.5 mmol/L)

NaN₃ < 0.1%

STABILITÀ: i Reagenti chiusi sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette, se conservati nel loro contenitore primario integro, a 2-8°C se non esposti a fonti termiche e/o variazioni di pressione. In caso di danneggiamento del contenitore primario provvedere allo smaltimento.

CONTROLLO QUALITÀ

La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI LAVORO

Dissolvere un vial di **R2 - ketoglutarate** con 3 mL di **R1 - BUFFER**, mescolare gentilmente evitando la formazione di schiuma. Portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso. Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione.

L'uso non competente ci solleva da ogni responsabilità.

STABILITÀ DEL REAGENTE DI LAVORO

Il reagente di lavoro è stabile 10 giorni a 2-8°C. Fino a 40 giorni se congelato a -20°C. CONGELARE solo UNA VOLTA. NON RIPETERE IL CONGELAMENTO.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Normale attrezzatura da laboratorio.

Micropipette in grado di erogare da 3 a 500 µL.

Puntali monouso per micropipette.

Provette in vetro trasparente per la diluizione dei campioni.

Soluzione fisiologica.

Spettrofotometro od analizzatore automatico di chimica clinica.

CAMPIONI

• Plasma EDTA fresco NON EMOLIZZATO.

Raccolta dei campioni in accordo con CLSI (NCCLS)

(cfr Bibliografia 3).

Tenere SEMPRE i campioni in provette ben chiuse ed in ghiaccio; separare il plasma dagli elementi figurati nel più breve tempo possibile dal prelievo (cfr. Bibliografia 1).

SMALTIMENTO DEI MATERIALI

Per lo smaltimento dei rifiuti attenersi alle regolamentazioni locali vigenti.

PROCEDURA ANALITICA su

SPETTROFOTOMETRO MANUALE

- Lunghezza d'onda: 340 nm (334 - 365 nm)
- Cammino ottico: 1 cm
- Lettura: contro aria o acqua distillata
- Temperatura: 37°C
- Metodo: fixed-time
- Reazione: 7 - 10 minuti
- Rapporto campione/reagente: 1/10/2.5

Portare i reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso.

Pipettare in una provetta o in una cuvetta così etichettata:

R/B: bianco reagente, ST: calibratore, S: campione

	R/B	ST	S
REAGENTE DI LAVORO	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Acqua distillata	100 µL	----	----
R4 - CAL	----	100 µL	----

Campione	----	----	100 µL
Miscelare ed incubare per circa 3 minuti a 37°C. Poi aggiungere:			
R3 - GLDH, NADPH	250 µL	250 µL	250 µL

Miscelare con attenzione, incubare a 37°C.

Dopo 2 minuti leggere AS1 (campione), AST1 (standard) e AR/B1 (bianco).

Attendere ancora 5 minuti e leggere AS2, AST2 and AR/B2.

Calcolare per il campione $AS = (AS1 - AS2)$.

Calcolare per lo standard $AST = (AST1 - AST2)$.

Calcolare per il Reagent/Blank $AR/B = (AR/B1 - AR/B2)$.

Calcolare la differenza $\Delta AS = AS - AR/B$ e

$\Delta AST = AST - AR/B$.

ATTENZIONE!

Il kit è sperimentato per spettrofotometro manuale e per sistemi HITACHI, COBAS e MINDRAY.

Le applicazioni su analizzatori automatici possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale.

VALORI DI RIFERIMENTO (cfr Bibliografia 1)

Valori normali Ammonio: 15 - 45 µg/dL (8.8 - 26.4 µmol/L).

Poiché i valori normali dipendono dall'età, dal sesso, dalla dieta, dall'area geografica e da altri fattori, ogni laboratorio deve stabilire i propri valori normali per questa procedura.

CALCOLO

Usare questa formula generale per calcolare la concentrazione:

$[\Delta AS / \Delta AST] \times 500^* = \text{AMMONIO } (\mu\text{g/dL})$

*500 è la concentrazione di R4 - **CAL**

Ammonio in µmol/L = 0.587 x µg/dL di Ammonio.

PRESTAZIONI ANALITICHE

(validate su MINDRAY BS300)

Le prestazioni del Reagente **Ammonia** sono state sperimentate con un analizzatore MINDRAY BS300. I dati, pur rappresentando le caratteristiche del prodotto, potrebbero variare per ogni singolo laboratorio e per i diversi analizzatori.

Limitazioni del metodo: non sono conosciute limitazioni.

Linearità del metodo: il test è lineare fino a 1000 µg/dL

(587.0 µmol/L). Per concentrazioni ≥ 1000 µg/dL, diluire il campione 1:2 con soluzione salina, ripetere la determinazione e moltiplicare il risultato x 2.

Sensibilità del metodo (LoD): il limite di sensibilità, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dallo zero è 2.8 µg/dL.

Interferenze: cfr Bibliografia punto 2.

Criterio delle prove di interferenza: recupero $\pm 15\%$ del valore iniziale. Non si sono osservate interferenze su campioni con:

- bilirubina totale fino a 20 mg/dL;
- lipemia [Intralipid®] fino a 1000 mg/dL;
- acido ascorbico fino a 50 mg/dL.

Precisione nella serie: determinata su 20 replicati di due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (µg/dL) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	490.7 \pm 20.1	2.1
Umano 2	67.8 \pm 5.1	3.7



Precisione tra le serie: determinata per 5 giorni su 20 replicati al giorno per due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media ($\mu\text{g/dL}$) \pm 2s	CV%
Umano 1	494.3 \pm 15.9	1.6
Umano 2	68.2 \pm 7.8	5.8

Accuratezza: un gruppo di 20 sieri è stato testato con questa procedura ed usando un reagente simile disponibile in commercio.

Il confronto ha dato i seguenti risultati:

Regressione lineare $y = 0.9988x + 2$
Coefficiente di correlazione $r = 0.9997$ $n = 20$

BIBLIOGRAFIA

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
2. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
3. CLSI(NCCLS) C49-A/H56-A: Collection, Handling, Transport and Storage for Body Fluids. Quick Guide.

Codice Ramo CND W01010301



AMMONIA



QUANTITATIVE KINETIC UV DETERMINATION OF PYRUVATE KINASE (PK)
in SERUM and ERYTHROCYTES on MINDRAY BS-300 Analyzer



300 tests (20 x 3 mL)

REF NAAM8870

INTENDED USE

Deamination is a fundamental step in the proteic metabolism. During it, the aminoacids lose the amino group (NH₂). This group pass to alpha-ketoglutarate (Krebs cycle intermediate), forming glutamate; this last reacts by oxidative deamination in the mitochondrial matrix giving free ammonia (NH₃).

Ammonia is a toxic molecule, particularly for brain.

An healthy organism is able to change it in atoxic compound, which are also transport and pre-elimination means:

- 1) may be add to alpha-ketoglutarate to form again glutamate,
- 2) may be incorporated in a glutamate molecule to give glutamine,
- 3) may be used for the carbamylphosphate synthesis, urea cycle precursor, which transforms ammonia into urea at hepatic level; urea is no toxic molecule and is then eliminated by urine.

In presence of serious hepatic diseases such as cirrhosis, hepatitis and Reye's Syndrome, the Ammonia is accumulated in the blood. Elevated ammonia concentrations are toxic, especially for the brain and can be involved in the development of the portosystemic encephalopathy.

PRINCIPLE

Ammonia reacts with 2-glutarate to give L-glutamate, in the presence of glutamate dehydrogenase (GLDH) and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH); in this reaction NADPH is oxidized.

The amount of NADPH oxidized at UV wavelength is proportional to the concentration of Ammonia in the tested sample.

Using the standard contained in the kit it is possible to prepare a Calibration Curve to refer.

Plotting on the Calibration Curve absorbance values and concentration for each single sample, may be determined the concentration of each sample.

PRECAUTIONS FOR USE

1. This product has been formulated for in vitro diagnostic use.
2. A proportional variation of the reaction volumes does not change the result.
3. DO NOT mix Reagents from different Production lots.
4. For concentration of Ammonia higher than the 1000 µg/dL (587.0 µmol/L), dilute the sample 1:2 with saline solution, repeat the determination and multiply the result by 2.
5. In addition to the possible risk indications, the Reagent can contain preservatives (as sodium azide or others), which total concentration is lower than the limits mentioned in Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE and following modifications regarding classification, labelling and packaging of dangerous preparations (Reagents). However it is recommended to handle the reagents carefully, avoiding ingestion and contact with eyes, mucous membranes and skin; to use reagents according to good laboratory practice. On the

material safety data sheet are detailed the operating procedures for the manipulation of this product. Material safety data sheet should be supplied on request.

ATTENTION!

A) Applications on routine analysers may be totally different from what developed as manual determination; in addition the procedures are specific for each analyser.

B) Very deep attention must be given to interfering substances: certain drugs and other substances are able to influence levels of Ammonia (see References 2).

C) The reagent must be used ONLY for the intended destinations, by expert and trained people and in according to good laboratory practice.

D) The clinical diagnosis cannot be done correctly using the result of only one test, but have to be done integrating critically the results of different laboratory tests and clinical data.

E) A lot of factors, as ambient temperature, the working reagent temperature, wash accuracy and the type of spectrophotometer, may affect the tests performances.

F) To work in a free atmosphere from ammonium vapors (DO NOT SMOKE in laboratory).

G) NEVER FORGET that Ammonia evaporates very easily from samples.

H) Keep always the samples in test-tube well closed and in ice.

I) The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

J) All the precautions normally used in the laboratory must be respected for reagents handling.

All the calibrators and controls must be considered as human sample, so potentially infectious; all the protection actions must be applied to avoid any potential biological risk.

REAGENTS

Components of the kit:

R1 - BUFFER **REF** AM8870 **1 x 60 mL**

Good buffer > 10 mmol/L

R2 - ketoglutarate **20 x 3 mL**

ketoglutarate > 4 mmol/L

R3 - GLDH, NADPH **1 x 16 mL**

(READY TO USE)

GLDH > 200 U/L ADP > 3 mmol/L

NADPH > 0.1 mmol/L Eccipienti

R4 - CAL **1 x 5 mL**

(READY TO USE)

Solution of Ammonia = 500 µg/dL (= 293.5 mmol/L)

NaN₃ < 0.1%

STABILITY: the Reagents are stable up to the expiry date mentioned on the labels, stored at 2-8 °C, if closed and kept in their intact primary container; if not exposed to heat sources and/or pressure variations.



In case of damaging of the primary container organize the waste disposal.

QUALITY CONTROL

The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

PREPARATION OF THE WORKING REAGENT

Dissolve a vial of **R2 - ketoglutarate** with 3 mL of **R1 - BUFFER**, mix gently avoid foaming.

R3 - GLDH, NADPH is ready to use. Before use, mix gently avoid foaming.

Let the reagent reach the room temperature before use.

Close immediately after handling.

The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination.

An incompetent handling relieves us from any responsibility.

STABILITY OF THE WORKING REAGENT

The WORKING REAGENT is stable 10 days at 2-8°C. Till 40 days frozen at -20°C. FREEZE only ONE TIME. DO NOT REPEAT FREEZING.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Normal laboratory equipment.

Micropipettes to deliver from 3 to 500 µL.

Disposable micropipettes tips .

Transparent glass tubes for sample dilution.

Saline solution.

Spectrophotometer or automatic analyser for Clinical Chemistry.

SAMPLES

• NOT HAEMOLYSED fresh plasma.

Samples collection in compliance with CLSI (NCCLS)

(see References 3).

On recommend to keep samples on ICE and to separate the plasma from blood without delay (see References 1).

WASTE DISPOSAL

Observe all federal, state and local environmental regulations for waste disposal.

ANALYTICAL SPECTROPHOTOMETER PROCEDURE ON MANUAL

- Wavelength: 340 nm (334 - 365 nm)
- Pathlength: 1 cm
- Reading: against air or distilled water
- Temperature: 37°C
- Method: fixed-time
- Reaction: 7 - 10 minutes
- Sample/reagent: 1/10/2.5

Let reagents reach the working temperature before use.

Pipette in a test tube or cuvette so labelled:

R/B: Reagent Blank, ST: Calibrator, S: Sample

	R/B	S	ST
WORKING REAGENT	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Distilled water	100 µL	----	----
R4 - CAL	----	100 µL	----
Sample	----	----	100 µL

Mix and incubate for about 3 minutes at 37°C. Then add:

R3 - GLDH, NADPH	250 µL	250 µL	250 µL
-------------------------	--------	--------	--------

Mix carefully, incubate at 37°C.

After 2 minutes read AS1 (sample), AST1 (standard) and AR/B1 (blank).

Wait again 5 minutes and read AS2, AST2 and AR/B2.

Calculate for the sample AS = (AS1 – AS2).

Calculate for the standard AST = (AST1 – AST2).

Calculate for the Reagent/Blank AR/B = (AR/B1 - AR/B2).

Calculate the difference $\Delta AS = AS - AR/B$ and

$\Delta AST = AST - AR/B$.

ATTENTION!

The kit is tested for a manual spectrophotometer and for HITACHI, COBAS and MINDRAY systems. The applications on automatic analysers could be completely different by what has been developed as manual determination.

REFERENCE VALUES (see References 1)

Normal Values Ammonia : 15 - 45 µg/dL (8.8 – 26.4 µmol/L).

Since the normal values depend on age, sex, diet, geographic area and other factors, each laboratory should establish its own normal values for this procedure.

CALCULATION

Use this general formula to calculate the concentration:

$[\Delta AS / \Delta AST] \times 500^* = \text{AMMONIA } (\mu\text{g/dL})$

*500 in R4 - **CAL** concentration

Ammonia in µmol/L = 0.587 x µg/dL of Ammonia.

ANALYTICAL PERFORMANCES

(validate on MINDRAY BS300)

The performances of the Reagent **Ammonia** have been tested with a MINDRAY BS300 analyser. The data, while representing the characteristics of the product, could be different for each laboratory and for different analysers.

Method Limitations: are not know limitations.

Method Linearity: the test is linear up to 1000 µg/dL

(587.0 µmol/L). For concentrations ≥ 1000 µg/dL, it is recommended to dilute the sample 1:2 with saline solution, test again and multiply the result x 2.

Method Sensitivity (LoD): the sensitivity limit, that is the minimum concentration that can be distinguished by zero, is 2.8 µg/dL.

Interferences: see References 2.

Interference test criterion: recovery ± 15% of initial value. No interference found on samples with:

- total bilirubin up to 20 mg/dL;
- lipemia [Intralipid®] up to 1000 mg/dL;
- ascorbic acid up to 50 mg/dL.

Within-run Precision: determined on 20 replications of 2 samples.

The results obtained are following:

Sample	Mean (µg/dL) ± 2s	CV %
Human 1	490.7 ± 20.1	2.1
Human 2	67.8 ± 5.1	3.7

Run-to-run Precision: determined for 5 days with 20 replications for each days, for two samples.

The results obtained are the following:

Sample	Mean (µg/dL) ± 2s	CV %
Human 1	494.3 ± 15.9	1.6
Human 2	68.2 ± 7.8	5.8



Accuracy: a group of 20 sera has been tested using this procedure and using a similar reagent available on the market. The comparison gave these results:

Linear regression equation $y = 0.9988x + 2$
Correlation coefficient $r = 0.9997$ $n = 20$

REFERENCES

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
2. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
3. CLSI(NCCLS) C49-A/H56-A: Collection, Handling, Transport and Storage for Body Fluids. Quick Guide.

EDMA (EDMS) CODE 11 03 01 01 00

