

TECO GRAM S.A.
Av. San Jorge 428 y 10ma.
Guayaquil - Ecuador
042396966 – 042397979 – 042396610
tecoqram@gye.satnet.net

JUEGO DE REACTIVOS DE BUN (METODO UV-CINETICO)

JUEGO DE REACTIVOS DE UREA NITROGENO (BUN)

Para la determinación de urea nitrógeno en suero humano.

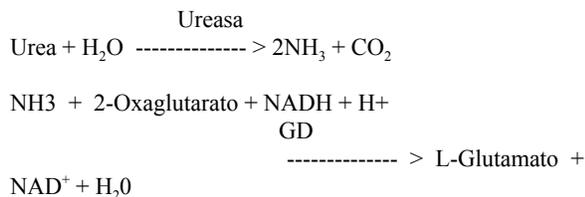
INTRODUCCION

Urea es el mayor producto final del metabolismo del nitrógeno proteína. Se sintetiza en el hígado partiendo del amonio la cual es producida por la deaminación del ácido amino. La determinación de la urea nitrógeno en suero es un importante indicador de la función del hígado. Los niveles elevados de urea nitrógeno se asocian con una función renal o con un colapso en el incremento de proteínas de tejido, en cambio los niveles bajos se asocian con daños en el hígado o embarazo.

En 1965 Talke y Schubert introdujeron un procedimiento que utilizaba la ureasa y la Deshidrogenasa de glutamato (GD). Tiffany et. al. luego cambió este sistema a un procedimiento cinético que reducía el tiempo de reacción y permitía una adición directa de la muestra, proveyendo un análisis rápido para la determinación cuantitativa de la urea nitrógeno.

PRINCIPIO

La secuencia enzimática de reacción empleada en el ensayo de BUN es la siguiente:



La Urea en la muestra es hidrolizada por la ureasa para producir amonio y dióxido de carbono. El amonio liberado reacciona con el 2-Oxaglutarato, en la presencia de GD y de la coenzima NADH, para producir L-glutamato. En esta reacción 2 moles de NADH son oxidados a NAD por cada mol de urea hidrolizada. La disminución resultante en la absorbancia de NADH a 340 nm es proporcional al nivel de urea nitrógeno en la muestra.

COMPOSICION DEL REACTIVO

Cuando se ha reconstituido como se indica, nuestro reactivo de BUN contiene lo siguiente:

1. Reactivo BUN: (Concentraciones se refieren al reactivo reconstituido) NADH 0.28 mM/L, Ureasa 3,000 U/l, Deshidrogenasa de Glutamato 15,000 U/L. 2-Oxaglutarato 4.0 mM/L, Buffer pH 7.8, Activadores y estabilizadores no reactivos.
2. Estándar de Urea-Nitrógeno (20 mg/dl): Urea.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Solo para uso diagnóstico in Vitro.
2. Los reactivos contienen ácido sodico el cual puede ser tóxico si es ingerido. El ácido de sodio puede también reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y formar ácidos metales altamente explosivos.
3. Las muestras de suero humano deben ser consideradas infecciosas y deben ser manipuladas apropiadamente.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Ambos, el reactivo de BUN y el Estándar deben ser almacenados a 2 – 8°C antes de ser reconstituido. El reactivo puede ser usado hasta antes de la fecha de expiración indicada en la etiqueta del paquete. Después de reconstituido el reactivo es estable por dos (2) días a temperatura ambiente (18 – 25°C) y por veintiún (21) días cuando se lo ha almacenado a 2 – 8°C. El reactivo debe ser claro y sin color.

DETERIORO DEL REACTIVO

El reactivo debe ser desechado si:

1. Ocurre turbidez; la turbidez puede ser una señal de contaminación.
2. Ha penetrado humedad al frasco y ha ocurrido endurecimiento.
3. El reactivo reconstituido tiene una absorbancia del blanco menor que 1.0 a 340 nm.

RECOLECCION DE LA MUESTRA

1. Las muestras deben ser suero o hemólisis.
2. No se debe usar plasma que contenga anticoagulantes.
3. Todos los materiales que entren en contacto con la muestra deben estar libres de amonio y metales duros.
4. La Urea en suero es reportada estable por setenta y dos horas refrigerada a 2 – 8°C. El suero no refrigerado no debe ser usado dentro de las ocho horas.

SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

Anticoagulantes como el fluor, citrato y EDTA pueden inhibir la ureasa y deben ser evitados. Los iones de amonio presentes en el agua u otras sustancias pueden elevar falsamente los valores de la urea.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Pipetas para medir con precisión los volúmenes requeridos.
2. Tubos de ensayo/gradilla.
3. Cronómetro.
4. Agua destilada o demonizada donde se indica.
5. Espectrofotómetro con una cubeta de temperatura controlada.

INSTRUCCIONES GENERALES

El reactivo para BUN está dirigido para usarse en un procedimiento automatizado en un equipo de bioquímica o en un procedimiento manual en un espectrofotómetro adecuado.

PROCEDIMIENTO (AUTOMATIZADO)

Refiérase al manual de aplicación apropiado disponible de Tecó.

PROCEDIMIENTO MANUAL

1. Reconstituya el reactivo de acuerdo a las instrucciones.
2. Ponga el espectrofotómetro a cero con agua a 340 nm.
3. Pipetee 1.0 ml de reactivo BUN a los tubos de ensayo y pre caliente a 37°C.
4. Añada a una cubeta 0.01 ml (10µl) de muestra (estándar o suero).
5. Después de treinta segundos mida y registre la absorbancia (A1).
6. Después de sesenta segundos adicionales tome una lectura de la segunda absorbancia (A2).
7. Determine la ΔA entre las dos lecturas (A1 – A2).
8. Repita el procedimiento para cada muestra.
- USE EL CALIBRADOR MULTIPROPÓSITO TC PARA REMPLAZAR EL ESTÁNDAR.

NOTA:

- Para una linealidad más alta, lea solo por 30 segundos en lugar de 60 segundos como se detalla en el procedimiento.
- Si el espectrofotómetro que se usa requiere de un volumen final mayor que 1.0 ml para lecturas precisas, use 0.025 ml (25 µl) de muestra de 3.0 de reactivo y realice la prueba como se ha descrito.

LIMITES DEL PROCEDIMIENTO

El reactivo es lineal a 80 mg/dl de urea nitrógeno. Las muestras con valores por encima de 80 mg/dl deben ser diluidas a 1:1 con solución salina al 0.9%, re-ensayadas y el resultado debe ser multiplicado por dos.

CALCULOS

$(A_1 - A_2)$ = Cambio de absorbancia.

$\frac{(A_1 - A_2) \text{ desconocido}}{(A_1 - A_2) \text{ de estándar}}$ x Concentración de estándar = BUN (mg/dl).

Ejemplo: Si el desconocido tiene $A_1 = 1.5$ y un $A_2 = 1.0$ el estándar $A_1 = 1.5$ y $A_2 = 0.9$ y la concentración del estándar = 20 mg/dl entonces:

$$\frac{(1.5 - 1.0)}{(1.5 - 0.9)} = \frac{0.5}{0.6} \times 20 = 17 \text{ mg/dl}$$

UNIDADES SI

$$\text{mg/dl} \times \frac{10}{28} = \text{mg/dl} \times 0.357$$

Donde 10 = Conversión de dl a litros.
28 = Peso molecular del nitrógeno.

Ejemplo: Si 17 mg/dl es el resultado, entonces $17 \times 0.357 = 6.06 \text{ mMol/L}$.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda que se incluyan controles en cada juego de ensayos. Se puede usar material de control comercialmente disponible con valores establecidos de BUN para el control de calidad. Los valores asignados del material de control deben ser confirmados por la aplicación escogida. El fracaso al obtener un rango apropiado de valores en el ensayo del material de control puede indicar deterioro del reactivo, mal funcionamiento del equipo, o errores en el procedimiento.

VALORES ESPERADOS

7 – 18 mg/dl.

Se recomienda mucho que cada laboratorio establezca su propio rango normal

CARACTERÍSTICAS DE LA PRUEBA

1. Linealidad: 80 mg/dl.
2. Comparación: Una comparación usando el procedimiento enzimático condujo a un coeficiente de correlación de 0.96 con una ecuación de regresión de $y = -0.95x + 3.67$.
3. Estudios de precisión:

Día a día (N = 21)

Promedio (mg/dl)	S.D.	C.V
12	0.5	4.6%
43	0.4	1.0%

Dentro de la corrida (N = 21)

Promedio (mg/dl)	S.D.	C.V
12	0.5	4.6%
43	1.6	3.8%