

BioLyzer® Order information:

Catalog No.	BioLyzer	Contents		
B1731	200 / 600	R1	2 x	14 ml
		R2a	2 x	5 ml
		R2b	2 x	5 ml
B1703	300 / 600*	R1	2 x	20 ml
		R2a	2 x	5 ml
		R2b	2 x	5 ml

*only for instruments with a reagent tray for 20 / 70ml bottles

Intended use:

For the quantitative determination of ammonia (NH₃) in plasma.

Summary:

In 1859, Berthelot described a reaction between ammonia and an alkaline solution of phenol hypochlorite suitable for the determination of ammonia. The assay, however, proved to be subject to interferences, and several alternatives have been proposed to eliminate the problems inherent in the method.

In 1963, Kirsten, et al introduced an enzymatic method for ammonia determination based on the action of glutamate dehydrogenase. Although the enzymatic method proved to be highly specific and utilized direct evaluation based on the molar absorptivity of NADH, several problems, including difficulties in stabilizing the end reaction, were encountered.

The method presented here is based on Da Fonseca-Wollheim's modification of the Kirsten reaction. The original enzymatic method is improved by the addition of ADP to the reaction mixture, the use of NADPH in place of NADH to eliminate interference from the reaction of endogenous LDH with endogenous pyruvate, and the substitution of plasma for deproteinized supernatant.

Ammonia measurements are used in the diagnosis and treatment of severe liver disorders such as cirrhosis, hepatitis, and Reye's Syndrome.

Test principle:

Enzymatic kinetic colorimetric assay

In the reaction catalyzed by glutamate dehydrogenase (GLDH), ammonia reacts with α -ketoglutarate and NADPH to form glutamate and NADP.



The inclusion of ADP in the reaction mixture causes an acceleration of the rate of conversion and stabilizes the GLDH in the indicated pH range.

The amount of NADPH oxidized during the reaction is equivalent to the amount of ammonia in the specimen and can be measured photo-metrically by the resulting decrease in absorbance.

Reagent concentration:

R1:	
Triethanolamine buffer pH 8.6	151 mmol/l
α -Ketoglutarate	16.6 mmol/l
ADP	≥ 1.2 mmol/l
Preservatives	

R2a:	
NADPH	≥ 458 μ mol/l
GLDH (EC 1.4.1.3; bovine liver; +25°C)	≥ 24.3 U/ml
Triethanolamine buffer pH 8.6	151 mmol/l
α -Ketoglutarate	16.6 mmol/l
ADP	≥ 1.2 mmol/l
Preservatives	

R2b:	
Triethanolamine buffer pH 8.6	151 mmol/l
α -Ketoglutarate	16.6 mmol/l
ADP	≥ 1.2 mmol/l
Preservatives	

Preparation and stability:

R1: Ready for use.

R2: Reconstitute one Bottle R2a (GLDH) with the content of one bottle R2b and let stand 20 minutes at room temperature, occasionally swirling gently.

Unopened kit components: at +2° to +8°C up to the expiration date.
 Reconstituted GLDH: at +2° to +8°C 42 days when stored tightly closed
 Onboard Stability: R1: 28 days
 R2: 14 days

Specimen:

EDTA plasma, nonhemolyzed.

Draw the specimen from a stasis-free vein and centrifuge in a tightly closed tube as soon as possible.

Stability: Place specimen on ice and assay immediately.

Separated plasma: 3 hours at +4°C in a tightly closed container.

Centrifuge samples containing precipitate before performing the assay.

Notes:

For in vitro diagnostic use.



Warning! R2 contains hazardous components.

The material safety data sheet contains further safety-related information. It is available for download from our homepage <http://www.analyticon-diagnostics.com>.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

NOTE: Do not leave sample, calibrator, or quality control cups open for longer than 15 minutes. Results may be affected. Repeat assays must be performed on freshly poured cups, due to evaporation of ammonia.

Limitations - interference:

Criterion: Recovery within $\pm 10\%$ of initial value.

Icterus: No significant interference up to an index I of 20 (approximate conjugated and unconjugated bilirubin: 20 mg/dl)

Hemolysis: No significant interference up to an index H of 12 (approximate haemoglobin concentration: 12 mg/dl).

Lipemia (Intralipid): No significant interference up to an index L of 25 (approximate triglycerides concentration: 50 mg/dl) There is poor correlation between turbidity and triglycerides concentration.

Blood samples should only be drawn prior to the administration of sulfasalazine and sulfapyridine. Physiological plasma concentrations of sulfasalazine or sulfapyridine can lead to incorrect results.

The effect of drugs or their metabolic products on the test is not known in all cases. In case of doubt it is recommended to repeat the test after the medication has been discontinued. However, the medication may only be discontinued according to instructions of the attending physician.

Testing procedure:

Materials provided

• Working solutions as described above

Additional materials required

• Calibrators and controls as indicated below

• 0.9% NaCl

Calculation:

Conversion factor: $\mu\text{g/dl} \times 0.587 = \mu\text{mol/l}$

Measuring /reportable range:

Plasma: 40 - 1000 $\mu\text{g/dl}$ (23.5 - 587 $\mu\text{mol/l}$)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function using 0.9% NaCl solution as diluents.

Expected values:

Male: 25-94 $\mu\text{g/dl}$ (14.7 - 55.3 $\mu\text{mol/l}$)

Female: 19-82 $\mu\text{g/dl}$ (11.2 - 48.2 $\mu\text{mol/l}$)

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference range. For diagnostic purposes, ammonia results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examinations and other findings.

Analytical sensitivity (lower detection limit):

Detection limit: 40 $\mu\text{g/dl}$ (23.5 $\mu\text{mol/l}$)

The lower detection limit represents the lowest measurable substance concentration that can be distinguished from zero. It is calculated as three standard deviations of 21 replicates of the lowest standard.

Imprecision:

Within-Run precision was determined using human-based controls in an internal protocol run (n = 20). Lot-to-lot precision was determined with three different lots of human-based controls. The following results were obtained:

Sample	Within run		
	Mean $\mu\text{g/dl}$	SD $\mu\text{g/dl}$	CV %
Calibrator A/E/C*	519	3.43	0.66
Control A/E/C* Normal	115	3.89	3.37
Control A/E/C* Abnormal	391	3.78	0.97

Sample	Lot to lot		
	Mean Recovery %	SD %	CV %
Control A/E/C* Normal	99.3	5.75	5.79
Control A/E/C* Abnormal	94.3	3.14	3.33

*Ammonia/Ethanol/CO₂

Method comparison:

A comparison of the ammonia determination using the BioLyzer ammonia assay (y) with another ammonia assay (x) gave the following correlation ($\mu\text{g/dl}$):

$$y = -0.8969x - 27.79; \quad r = 0.9836$$

NH₃

AMMONIA



Quality Control:

Suitable control material should be used.

The control intervals and limits must be adapted to the individual laboratory and country-specific requirements. Values obtained should fall within established limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the limits.

Calibration:

Standardization: The method was standardized against a gravimetric standard.

Calibration Type: Linear

S1: 0.9% NaCl

S2: Suitable calibrator for Ammonia

e.g. the Ammonia/Ethanol/CO₂ Calibrator from Roche

Calibration frequency

Two point calibration is recommended:

- every 24 hours
- after reagent bottle change
- after reagent lot change
- as required following quality control procedures

Disposal:

Please note the legal regulations.

Literature:

1. Berthelot MPE. Repert Chem Appl. 1859:282.
2. Da Fonseca-Wollheim F. Z Klin Chem Klin Biochem. 1973;1 1 :421 ,426. Dokumentation Roche Diagnostics.
3. Hohorst HJ. Biochem Z. 1956;328:507.
4. Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical Chemistry Theory, Analysis and Correlation. St. Louis, Mo: CV Mosby Co; 1984:1231.
5. Kirsten E, et al. Biochem Z. 1963;337:312.
6. Prellwitz W, et al. Med Welt. 1976;27:1277.
7. Siegel JM, Montgomery GA. Arch Biochem/Biophys. 1956;82:288.
8. Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests. 3rd ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co; 1995:44.

Text passages with grey background were changed in the latest revision of this package insert.



BioLyzer® Bestellinformation:

Katalog-Nr.	BioLyzer	Inhalt
B1731	200 / 600	R1 2 x 14 ml
		R2a 2 x 5 ml
		R2b 2 x 5 ml
B1703	300 / 600*	R1 2 x 20 ml
		R2a 2 x 5 ml
		R2b 2 x 5 ml

*nur für Instrumente mit Reagenzteller für 20 / 70ml Flaschen

Anwendungszweck:

Zur quantitativen Bestimmung von Ammoniak (NH₃) in Plasma.

Zusammenfassung:

1859 beschrieb Berthelot eine Reaktion zwischen Ammoniak und alkalischer Phenolhypochlorid-Lösung, die zur Bestimmung von Ammoniak geeignet war. Der Test erwies sich aber als störanfällig und zur Behebung der methodischen Probleme wurden verschiedene Alternativen vorgeschlagen.

1963 führten Kirsten et al. eine enzymatische Ammoniak-Bestimmungsmethode ein, die auf der Aktivität von Glutamatdehydrogenase beruht. Obwohl sich die enzymatische Methode als sehr spezifisch erwies und aufgrund der molaren Absorption von NADH eine direkte Bewertung erlaubte, traten, besonders bei der Stabilisierung des Endproduktes, verschiedene Schwierigkeiten auf.

Die hier vorgestellte Methode basiert auf der Modifikation der Kirsten-Reaktion nach Da Fonseca-Wollheim. Die ursprüngliche enzymatische Methode wurde verbessert durch Zugabe von ADP zur Reaktionslösung, durch den Austausch von NADH gegen NADPH, um die Interferenzen durch die Reaktion von endogenem LDH mit endogenem Pyruvat zu eliminieren, und die Substitution von Plasma statt des entweißten Überstandes.

Die Ammoniak-Bestimmungen dienen der Diagnose und Behandlung von schweren Lebererkrankungen wie Zirrhose, Hepatitis und Reye's Syndrom.

Testprinzip:

Enzymkinetischer Test

Ammoniak bildet in der durch Glutamatdehydrogenase (GLDH) katalysierten Reaktion mit α -Ketoglutarat und NADPH Glutamat und NADP⁺.



Die Zugabe von ADP zur Reaktionslösung beschleunigt den Umsatz und stabilisiert die GLDH im angegebenen pH-Bereich. Die Menge des während der Reaktion oxidierten NADPH entspricht der Ammoniak-Konzentration der Probe und kann durch die resultierende Absorptionsabnahme photometrisch gemessen werden.

Konzentrationen der gebrauchsfertigen Lösungen:

R1:

Triethanolamin Puffer pH 8.6	151 mmol/l
α -Ketoglutarat	16,6 mmol/l
ADP	≥ 1,2 mmol/l

R2a:

NADPH	≥ 458 μ mol/l
GLDH (EC 1.4.1.3; Rinderleber; +25°C)	≥ 24,3 U/ml
Triethanolamin Puffer pH 8.6	151 mmol/l
α -Ketoglutarat	16,6 mmol/l
ADP	≥ 1,2 mmol/l

R2b:

Triethanolamin Puffer pH 8.6	151 mmol/l
α -Ketoglutarate	16,6 mmol/l
ADP	≥ 1,2 mmol/l

Herstellung und Haltbarkeit:

R1: Gebrauchsfertige Lösung
R2: Den Inhalt von einer Flasche R2a (GLDH) mit der gesamten Flüssigkeit einer Flasche R2b und unter gelegentlichem Schwenken 20 Minuten lösen.

Ungeöffnete Packungsbestandteile: bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum.

Rekonstituierte GLDH: bei 2-8°C 42 Tage, wenn die Flasche fest verschlossen ist.

Onboard Stabilität: R1: 28 Tage,
R2: 14 Tage,

Probenentnahme und Vorbereitung:

EDTA-Plasma, nicht-hämolytisch. Probe einer ungestauten Vene entnehmen und so schnell wie möglich in einem verschlossenen Röhrchen zentrifugieren.

Haltbarkeit: Probe auf Eis stellen und sofort messen.

Abgetrenntes Plasma: 3 Stunden bei 4°C in einem verschlossenen Behältnis:

Proben, die Präzipitate enthalten, müssen vor dem Test zentrifugiert werden.

Einschränkungen des Verfahrens – Interferenzen:

Als Bewertung gilt: Wiederfindung \pm 10% vom Ausgangswert Ikterus: Keine Beeinflussung bis zu einem Index I von 20 (ungefähre Konzentration an konjugiertem und unkonjugiertem Bilirubin: 20 mg/dl).

Hämolyse: Keine Beeinflussung bis zu einem Index H von 12 (ungefähre Hämoglobin-Konzentration: 12 mg/dl).

Lipämie (Intralipid): Keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index L von 25 (ca. 50 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration

Blutproben sollten nur vor der Verabreichung von Sulfasalazin und Sulfapyridin entnommen werden. Physiologische Plasmakonzentrationen von Sulfasalazin oder Sulfapyridin können zu falschen Ergebnissen führen.

Die Auswirkung von Medikamenten oder deren Metaboliten auf den Test ist nicht in allen Fällen bekannt. Im Zweifelsfall wird deshalb empfohlen, den Test nach Absetzen der Medikation zu wiederholen. Ein Absetzen der Medikation darf allerdings nur nach Anweisung des behandelnden Arztes erfolgen.

Hinweis:

In vitro Diagnostikum.



Warnung! R2 enthält Gefahrstoffe.

Weitere sicherheitsrelevante Informationen sind im Sicherheitsdatenblatt enthalten. Dieses steht auf unserer Homepage <http://www.analyticon-diagnostics.com> zum Download bereit.

Die beim Umgang mit Laborreagenzien üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten. HINWEIS: Niemals Proben-, Kalibrator- oder Qualitätskontrollgefäße länger als 15 Minuten geöffnet lassen. Dies könnte die Ergebnisse verändern. Testwiederholungen müssen aufgrund der Evaporation von Ammoniak mit frisch gefüllten Testgefäßen durchgeführt werden.

Testverfahren:

Gelieferte Materialien

- Arbeitslösungen wie oben angegeben.
- Zusätzlich benötigte Materialien (nicht mitgeliefert)
- Kalibratoren und Kontrollen wie unten angegeben.
- Natriumchlorid-Lösung (0,9%)
- Allgemein übliche Laborausstattung

Berechnung:

Umrechnungsfaktor: $\mu\text{g/dl} \times 0,587 = \mu\text{mol/l}$

Messbereich:

Plasma: 40 - 1000 $\mu\text{g/dl}$ (23,5 - 587 $\mu\text{mol/l}$)

Proben mit höheren Konzentrationen werden über die Rerun-Funktion mit NaCl-Lösung (0,9%) bestimmt.

Referenzbereich:

Männlich: 25-94 $\mu\text{g/dl}$ (14,7 - 55,3 $\mu\text{mol/l}$)

Weiblich: 19-82 $\mu\text{g/dl}$ (11,2 - 48,2 $\mu\text{mol/l}$)

Jedes Labor sollte die Übertragbarkeit der Referenzbereiche für die eigene Patientengruppe überprüfen und gegebenenfalls selbst ermitteln. Für diagnostische Zwecke sind die Ammoniak-Ergebnisse stets im Zusammenhang mit der Patientenvorgeschichte, der klinischen Untersuchung und anderen Untersuchungsergebnissen zu werten.

Sensitivität (analytische Nachweisgrenze):

Nachweisgrenze: 40 $\mu\text{g/dl}$ (23,5 $\mu\text{mol/l}$)

Die untere Nachweisgrenze entspricht der niedrigsten messbaren Ammoniak-Konzentration, die von Null unterschieden werden kann. Sie ist berechnet als die Konzentration, die drei Standardabweichungen über dem niedrigsten Standard liegt.

Impräzision:

Die In-der-Serie Präzision wurde mit humanbasierten Kontrollen gemäß eines internen Protokolls bestimmt (n = 20). Die Lot-zu-Lot Präzision wurde mit drei verschiedenen Lots bestimmt. Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt:

Probe	In der Serie		
	Mean $\mu\text{g/dl}$	SD $\mu\text{g/dl}$	CV %
Calibrator A/E/C*	519	3.43	0.66
Control A/E/C* Normal	115	3.89	3.37
Control A/E/C* Abnormal	391	3.78	0.97

	Lot zu Lot		
	Mean %	SD %	CV %
Control A/E/C* Normal	99.3	5.75	5.79
Control A/E/C* Abnormal	94.3	3.14	3.33

*Ammonium/Ethanol/CO₂

Methodenvergleich:

Ein Vergleich der Ammoniak-Bestimmung am BioLyzer mit dem Analyticon Ammoniak-Test (y) mit einem anderen Test ergab folgende Korrelation ($\mu\text{g/dl}$):
 $y = -0,8969x - 27,79$; $r = 0,9836$

NH₃

AMMONIAK



Qualitätskontrolle:

Geeignetes Kontrollmaterial verwenden.

Die Kontrollintervalle und Kontrollgrenzen sind den individuellen Anforderungen jedes Labors anzupassen.

Die Ergebnisse müssen innerhalb der beschriebenen Bereiche liegen. Jedes Labor sollte Korrekturmaßnahmen für den Fall beschreiben, dass Werte außerhalb des Bereichs liegen.

Kalibration:

Rückführbarkeit: Die Methode wurde an NIST-Standardmaterialien abgeglichen.

Kalibrations Typ: Linear

S1: Natriumchlorid-Lösung (0,9%)

S2: geeigneter Kalibrator

z.B. Ammonium/Ethanol/CO₂ Kalibrator von Roche

Kalibrationshäufigkeit:

Eine 2-Punkt-Kalibration wird empfohlen:

- Alle 24 Stunden
- Nach Reagenz-Flaschenwechsel
- Nach Reagenz-Chargenwechsel
- Bei Qualitätskontrollwerten außerhalb des angegebenen Bereichs.

Entsorgung:

Bitte beachten Sie die gesetzlichen Vorschriften.

Literatur:

1. Berthelot MPE. Repert Chem Appl. 1859:282.
2. Da Fonseca-Wollheim F. Z Klin Chem Klin Biochem. 1973:11:421,426.
3. Hohorst HJ. Biochem Z. 1956:328:507.
4. Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical Chemistry Theory, Analysis and Correlation. St. Louis, Mo: CV Mosby Co; 1984:1231.
5. Kirsten E, et al. Biochem Z. 1963:337:312.
6. Prellwitz W, et al. Med Welt. 1976:27:1277.
7. Siegel JM, Montgomery GA. Arch Biochem/Biophys. 1956:82:288.
8. Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests. 3rd ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co; 1995:44.

Grau hinterlegte Textpassagen wurden in der letzten Überarbeitung dieser Gebrauchsanweisung geändert.

