

Reagenz zur quantitativen In-vitro-Bestimmung von Harnstoff im Blut

HST 321

Best. Nr. HST 321
Inhalt: 20 Tests
 20 Pipettenspitzen, 500µL

Methode
 Berthelot modifiziert
 Bestimmung im verdünnten Plasma nach Abtrennung der Erythrocyten durch Zentrifugation

Probenmaterial
 Kapillarblut oder EDTA-Blut (frisch);
 Kapillarblut sofort in das Reaktionsgefäß „R“ geben.
 Haltbarkeit der Probe im Reaktionsgefäß „R“:
 6 Stunden (+15°C bis +25°C)

Reagenz
 Inhalt / Konzentrationen:
 1. Startreagenz (Kappen in der PE-Flasche)
 Dichlorisocyanursäure Natriumsalz 3,4 mmol/L,
 Nitroprussid Natrium 2,9 mmol/L
 2. Pufferlösung (vorportioniert in Rundküvetten)
 tri-Natriumcitrat 118 mmol/L, Natriumsalicylat 217 mmol/L,
 Natriumhydroxid 32 mmol/L
 3. Enzymlösung (Reaktionsgefäße „R“)
 Urease >20 kU/L, Natriumchlorid 9 g/L, Natriumazid < 0,1%

Sicherheitshinweise
 Einstufung des Kits HST 321 gemäß EG-Verordnung 1272/2008 (CLP)
 H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
 H319: Verursacht schwere Augenreizung.
 H361d: Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
 H411: Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
 Ein Sicherheitsdatenblatt wird auf Anforderung zur Verfügung gestellt.¹⁾

Lagerung und Haltbarkeit
 Die Reagenzien sind im Dunkeln bei +2°C bis +8°C bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfalldatum haltbar

Messbedingungen
 Messgeräte: Diaglobal Photometer

Messwellenlängen: 520 nm, 546 nm

Temperatur: Raumtemperatur

Zusätzlich erforderlich: Minizentrifuge

Messbereich
 10 - 100 mg/dL (1,7 – 16,7 mmol/L)
 Bei höheren Werten Bestimmung mit 10 µL Probe wiederholen oder Probe 1+1 mit Kochsalzlösung verdünnen. Ergebnis x 2.

Hinweise
 1. Der Test wird durch Ammoniak gestört. Es darf während der Bestimmung nicht geraucht werden.
 2. Die Minizentrifuge muss - wie in der Bedienungsanleitung angegeben - gleichmäßig ausgelastet werden.

Arbeitsanleitung
 A. Einfachbestimmung
 • 20µL Kapillarblut mit end-to-end-Kapillare aus der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen entnehmen und diese in das Reaktionsgefäß „R“ stellen
 • Durch kräftiges Schütteln das Blut aus der Kapillare in die Reagenzlösung überführen
 • Reaktionsgefäß „R“ in die Minizentrifuge einsetzen und eine Minute zentrifugieren
 • 500µL Überstand mit Pipette entnehmen, in eine Rundküvette pipettieren (Leerwert-Küvette)
 • Test <HST> anwählen
 • Leerwert-Küvette einsetzen (Nullpunkteinstellung)
 • Leerwert-Küvette entfernen
 • Auf Leerwert-Küvette Kappe mit Startreagenz aus der PE-Flasche aufschrauben und kräftig mischen (Analysen-Küvette)
 • [ON/ENTER] drücken und sofort die Analysen-Küvette in das Photometer einsetzen.
 • Ergebnis nach 10 Minuten ablesen

B. Serienmessung (bis zu 20 Proben)
 • Test <HST> anwählen
 • Leerwert-Küvetten nacheinander in das Photometer einsetzen und die Nullpunkte einstellen
 • Auf alle Leerwert-Küvetten Kappen aus der PE-Flasche mit Startreagenz aufschrauben und gleichzeitig kräftig mischen (Analysen-Küvetten)
 • [ON/ENTER] drücken und sofort die erste Analysen-Küvette in das Photometer einsetzen. Das Ergebnis wird nach 10 Minuten angezeigt.
 • Alle weiteren Analysen-Küvetten in der gleichen Reihenfolge wie die der Leerwert-Küvetten in das Photometer einsetzen. Die jeweiligen Ergebnisse werden sofort angezeigt.

Berechnung
 Die Methode wurde mit Vollblut kalibriert. Die Berechnungsformel ist in den Diaglobal Photometern gespeichert. Werden Human- oder Kontrollseren (Ringversuchsproben) eingesetzt, ist der angezeigte Wert bei Messungen mit dem DP 300 und DP 550 mit 0,75 und bei Messungen mit dem DP 310 mit 0,73 zu multiplizieren.

Qualitätssicherung
 Für die Qualitätssicherung empfehlen wir die Universal Kontrollseren der Firma Roche, www.roche.de:
 PreciControl ClinChem Multi 1 / Multi 2 (4 x 5 mL)
 Order-No.: 05 947 626 190 / 05 947 774 190
 Ref.: Roche / Hitachi analyzers, Method: kinetic UV

Referenzwerte ²⁾		
Serum, Plasma	mg/dL	mmol/L
Männer < 50 Jahre	19 - 44	3,2 - 7,3
Männer > 50 Jahre	18 - 55	3,0 - 9,2
Frauen < 50 Jahre	15 - 40	2,8 - 7,2
Frauen > 50 Jahre	21 - 43	2,6 - 6,7
Kinder bis 13 Jahre	11 - 36	1,8 - 6,0
Kinder bis 19 Jahre	18 - 45	2,9 - 7,5

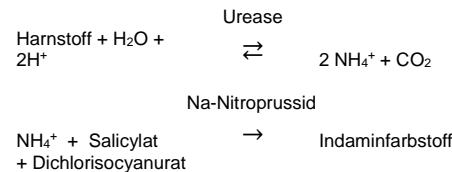
Zusammenfassung
 Harnstoff ist das Endprodukt des Protein- und Aminosäureabbaus, der sich in der Leber vollzieht. Die Ausscheidung erfolgt durch glomeruläre Filtration über die Nieren. Die Harnstoffkonzentration im Serum ist abhängig von der Nierenfunktion, der Nierendurchblutung, dem Harnvolumen und der Proteinzufuhr mit der Nahrung. Bei Nierenerkrankungen treten erhöhte Harnstoffwerte auf, wenn die glomeruläre Filtrationsrate stark vermindert ist und die Proteinaufnahme einen Wert von 200 g/Tag überschreitet.

Indikationen / Diagnostische Bedeutung^{2,3)}
 - Diagnose und Verlaufskontrolle der Niereninsuffizienz
 - Überwachung der Diät bei konservativer Therapie der chronischen Niereninsuffizienz
 - Differentialdiagnose komatöser Zustände

Im Sportbereich⁴⁾ kommt es bei Langzeitbelastungen zu einem Anstieg des Serumharnstoffspiegels, da die Muskelzellen ihren Energiebedarf nach Leerung der Glycogenspeicher verstärkt aus dem Aminosäureabbau decken. Die Bestimmung des Serum-Harnstoffspiegels ermöglicht daher eine Steuerung der Belastung (Regeneration) während des Trainings und nach Wettkämpfen.

Zur Harnstoff-Bestimmung werden heute ausnahmslos enzymatische Methoden eingesetzt, die auf der Spaltung von Harnstoff mittels Urease beruhen. Der Diaglobal-Farbstest HST 321 wurde speziell für Vor-Ort-Untersuchungen entwickelt und ermöglicht eine direkte Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Plasma. Als Probenmaterial wird Kapillar- oder venöses Blut eingesetzt.

Messprinzip
 Die Probe wird mit einer ureasehaltigen Kochsalzlösung verdünnt und kurz zentrifugiert. Hierbei werden die Erythrocyten separiert. Gleichzeitig erfolgt eine Spaltung des Harnstoffs. Das entstehende NH₃ wird mit Salicylat und einem Chlorierungsmittel zu einem grünen Farbstoff umgesetzt (modifizierte Berthelot-Reaktion⁵⁾), der bei 546 nm bzw. 520 nm gemessen werden kann.



Leistungsmerkmale
Spezifität / Interferenzen⁶⁾
 Keine Störungen durch Ascorbinsäure, Glucose und andere reduzierende Substanzen. Werte unabhängig vom Hämatokrit. Interferenzen durch Arzneimittel sind nicht bekannt.

Unpräzision
 Die Reproduzierbarkeit wurde mit Human- und Kontrollproben überprüft.

In der Serie [n = 20]	Mittelwert [mg/dL]	Standard-Abweichung [mg/dL]	VK [%]
Probe 1	19,0	1,01	5,3
Probe 2	138	4,41	3,2
Von Tag zu Tag* [n = 20]	Mittelwert [mg/dL]	Standard-Abweichung [mg/dL]	VK [%]
Probe 1	56,0	1,46	2,6

* Kontrollprobe

Analytische Sensitivität
 Untere Nachweisgrenze: 5 mg/dL (0,8 mmol/L)

Methodenvergleich
 Ein Vergleich des Diaglobal-Tests HST 321 (y) mit dem Diaglobal-UV-Test HST 013 (x) ergab nach dem Verfahren von Passing/Bablok⁷⁾ die Korrelation:
 $y = 1,030x - 0,678$
 $r = 0,997$

n = 80
 Konzentrationsbereich: 19 - 200 mg/dL

Literatur

- http://www.diaglobal.de/de/service/downloads/index.html
- Thomas L. Labor und Diagnose. 4.Aufl. Marburg: Die Medizinische Verlagsgesellschaft 1995: 462
- Rick W. Klinische Chemie und Mikroskopie. 6.Aufl.. Berlin Heidelberg: Springer Verlag 1972: 245
- Neumann G, Pfützer A, Hottenrott K. Alles unter Kontrolle. 6.Aufl. Aachen: Meyer und Meyer Verlag 2000: 148
- Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999:1038
- Sonntag O. Arzneimittelinterferenzen. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, 1985:47
- Passing H, Bablok W. A new biometric procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. J Clin Chem Clin Biochem. 1983; 21:709-720

Reagent for quantitative In-vitro-determination of urea in blood

Order No. HST 321
Contents: 20 tests
 20 pipette tips, 500µL

Method
 Berthelot modified
 Determination in diluted plasma after separation from erythrocytes by centrifugation

Sample material
 Capillary or EDTA blood (fresh).
 Set capillary blood immediately in reaction tube "R".
 Stability of the sample in reaction tube "R":
 6 hours (+15°C to +25°C)

Reagents
 Contents / concentrations:
 1. Starter reagent (caps in PE-bottle)
 Dichloro-cyanuric acid sodium salt 3.4 mmol/L, sodium nitroprussid 2.9 mmol/L
 2. Buffer solution (pre-portioned in round cuvettes)
 Tri-sodium citrate 118 mmol/L, Sodium salicylate 217 mmol/L, Sodium hydroxide 32 mmol/L
 3. Enzymatic solution (Reaction tubes "R")
 Urease > 20 kU/L, Sodium chloride 9 g/L, sodium azide < 0.1 %

Safety information
 Classification of the kit HST 321 according to EC regulation 1272/2008 (CLP)
 H301: Harmful if swallowed.
 H319: Causes serious eye irritation.
 H361d: Suspected of damaging the unborn child.
 H411: Toxic to aquatic life with long lasting effects.

A safety data sheet is available on request.¹⁾

Storage and shelf life
 The reagent have to be kept in a dark place at a temperature between + 2°C and + 8°C until the expiry date indicated on the packaging.

Measurement conditions
 Measurement devices: Diaglobal Photometer
 Meas. wavelengths: 520 nm, 546 nm
 Temperature: Room temperature
 Additionally required: Mini centrifuge

Measurement range
 10 - 100 mg/dL (1.7 – 16.7 mmol/L)
 Should values exceed this range, repeat determination with 10 µL sample or dilute sample 1+1 with saline solution. Multiply the result by 2.

Tips
 1. The test is disturbed by ammonia. Therefore smoking is prohibited during the determination.
 2. The "R"-tubes in Mini-centrifuge needs to be equally distributed, see operating instructions.

Working instructions
 A. Single measurement
 • Withdraw 20µL capillary blood from finger pulp or earlobe and insert in reaction tube "R"
 • Transfer blood in reagent solution by mixing strongly
 • Insert reaction tube "R" in Mini centrifuge and centrifuge for 1 minute
 • Pipette 500µL supernatant into round cuvette (blank cuvette)
 • Select the <Urea> test.
 • Set the photometer's zero point using the blank cuvette
 • Remove blank cuvette
 • Screw the cap from PE-bottle onto the blank cuvette, dissolve the starter reagent by mixing very strongly (analysis cuvette)
 • Press [ON/ENTER] and insert immediately analysis cuvette into photometer
 • Wait 10 minutes for result

B. Measurement of series (up to 20 samples)
 • Select the <Urea> test.
 • Insert the blank cuvettes one after another and measure the zero points.
 • Screw the caps from PE-bottle onto all blank cuvettes, dissolve the starter reagents by mixing all cuvettes very strongly at the same time (analysis cuvettes)
 • Press [ON/ENTER], insert the first analysis cuvette immediately and wait 10 minutes for result of sample 01.
 • Insert the other analysis cuvettes one after another in the same order as of the blank measurement. The result of the respective analysis cuvette can be read immediately.

Calculation
 The method is calibrated with whole blood. The calculation formula is programmed in the Diaglobal Photometers. If human or control sera are used (or ring test samples resp.), multiply the indicated value at measurements with DP 300 and DP 550 by 0.75 and at measurements with DP 310 by 0.73.

Quality assurance
 For quality assurance we recommend universal control sera from company Roche, www.roche.de:
 PreciControl ClinChem Multi 1 / Multi 2 (4 x 5 mL)
 Order-No.: 05 947 626 190 / 05 947 774 190
 Ref.: Roche / Hitachi analyzers, Method: kinetic UV

Reference values ²⁾	mg/dL	mmol/L
Serum, plasma		
Men < 50 years	19 - 44	3.2 - 7.3
Men > 50 years	18 - 55	3.0 - 9.2
Women < 50 years	15 - 40	2.8 - 7.2
Women > 50 years	21 - 43	2.6 - 6.7
Children up to 13 years	11 - 36	1.8 - 6.0
Children up to 19 years	18 - 45	2.9 - 7.5

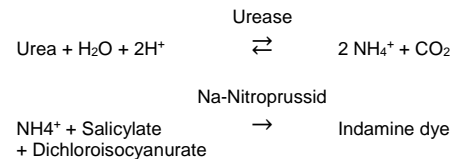
Summary
 Urea is the end product of protein and amino acid decomposition, which takes place in the liver. Excretion occurs through glomerular filtration over the kidneys. The urea concentration in serum depends on the renal function, the renal circulation, the uric volume, and the protein supply through nourishment. If the glomerular filtration rate is highly derogated and the protein absorption exceeds a value of 200 g/day, elevated urea counts will arise with affected kidneys.

Indications / diagnostic significance^{2,3)}
 - Diagnosis and devolution control of renal insufficiency
 - Control of diet with conservative therapy of chronic renal insufficiency
 - Differential diagnosis on comatose status

In the sports sector⁴⁾, the serum urea level increases during longtime activity since the muscle cells increasingly supply their energy requirement from the amino acid decomposition after clearance of the glycogen storages. Therefore, the determination of the serum urea level allows control of stress (regeneration) during training and after tournaments.

Nowadays, for the determination of urea only enzymatic methods are applied that are based on the cleavage of urea by means of urease. The Diaglobal colorimetric test HST 321 was developed especially for onlocation analyses and allows a direct determination of the urea concentration in plasma. Capillary or venous blood is used as sample material.

Measurement principle
 The sample is diluted with saline solution containing urease and centrifugated shortly. Here, the erythrocytes become separated. At the same time, cleavage of urea takes place. The emerging NH₃ is converted into a green dye by means of salicylate and a chlorination substance (modified Berthelot reaction⁵⁾), which can be measured at 546 or 520 nm.



Performance parameters
Specificity / interferences⁶⁾
 No interferences due to ascorbic acid, glucose, and other reducing substances. Values are independent of haematocrit. Interferences due to pharmaceuticals are not known.

Inaccuracy
 The reproducibility was checked using human and control samples.

In series [n = 20]	Average [mg/dL]	Standard deviation [mg/dL]	VK [%]
Sample 1 Sample 2	19.0 138	1.01 4.41	5.3 3.2
From day to day* [n = 20]	Average [mg/dL]	Standard deviation [mg/dL]	VK [%]
Sample 1	56.0	1.46	2.6

* Control sample

Analytic sensitiveness
 Lower detection limit: 5 mg/dL (0.8 mmol/L)

Comparison of methods
 A comparison of the Diaglobal test HST 321 (y) and the Diaglobal UV test HST 013 (x) resulted in the following correlation according to the Passing/Bablok⁷⁾ process:

$$y = 1.030x - 0.678$$

$$r = 0.997$$

n = 80
 Cconcentration range: 19 - 200 mg/dL

Bibliography
 1. <http://www.diaglobal.de/de/service/downloads/index.html>
 2. Thomas L. Labor und Diagnose. 4.Aufl. Marburg: Die Medizinische Verlagsgesellschaft 1995: 462
 3. Rick W. Klinische Chemie und Mikroskopie. 6th edition. Berlin Heidelberg: Springer Verlag 1972: 245
 4. Neumann G, Pfützner A, Hottenrott K. Alles unter Kontrolle. 6th edition. Aachen: Meyer and Meyer Verlag 2000: 148
 5. Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999:1038
 6. Sonntag O. Arzneimittelinterferenzen. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, 1985:47
 7. Passing H, Bablok W. A new biometric procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. J Clin Chem Clin Biochem. 1983; 21:709-720