

## Determinación de la urea sérica utilizando o-ftaldehido: Evaluación y adaptación del método al Coulter Chemistry CA-3 y ABA-100.<sup>(1)</sup>

J.M. Paz, A. López Urrutia, J.C. Tutor y R. del Río

*Se adaptó el método de o-ftaldehido, desarrollado por Jung, para la medida de la urea al Coulter Chemistry CA-3 y al ABA-100. Se evaluó la precisión, exactitud, linealidad y la contaminación entre muestras de ambos procedimientos.*

*La precisión obtenida fue buena, mientras que el error analítico total no mostró significación clínica. Se*

*La correlación lineal, en 121 muestras tomadas al azar entre el método de diacetilmono-oxima y el del o-ftaldehido adaptados al Coulter Chemistry CA-3, fue de  $r=0,998$  ( $y=0,98 \times +0,58$ ). En 63 muestras la correlación lineal entre el método de o-ftaldehido (Coulter Chemistry) y el de ureasa/glutamato deshidrogenasa (ABA-100) fue de  $r=0,998$  ( $y=0,98 \times +1,09$ ). En 75 muestras se obtuvo una correlación entre el método de la diacetilmono-oxima (Coulter Chemistry) y el de o-ftaldehido (ABA-100) de  $r=0,999$  ( $y=0,99 \times +0,85$ ).*

*La adaptación del método de Jung, al Coulter Chemistry CA-3 y al ABA-100, es simple y representa una alternativa precisa, exacta y económica a los métodos de la diacetilmono-oxima y de la ureasa/glutamato deshidrogenasa.*

### Introducción

En 1975 Jung y cols. (1) propusieron un método colorimétrico para la determinación de la urea basado en la condensación en medio ácido del o-ftaldehido con ami-

*The o-phthaldehyde procedure developed by JUNG for measurement of urea, was adapted to the Coulter Chemistry CA-3 and ABA-100 and evaluated for accuracy, precision, linearity and sample to sample interaction.*

*The precision obtained is very good and the total analytical error have not medical significance.*

*A sample-to-sample interaction was observed only for Coulter Chemistry. For 121 random samples diacetyl (Coulter Chemistry) versus o-phthaldehyde (Coulter Chemistry) gave a Pearson coefficient (r) of 0.998 ( $y=0.98 \times +0.58$ ). For 63 samples O-phthaldehyde (Coulter Chemistry) versus Urease/GLDH (ABA-100)  $r=0.998$  ( $y=0.97 \times +1.09$ ). For 75 samples diacetyl (Coulter Chemistry) versus O-phthaldehyde (ABA-100),  $r=0.999$  ( $y=0.99 \times +0.85$ ).*

*The adaptation of JUNG procedure to the Coulter Chemistry and ABA-100 is simple and provides an accurate, precise and economical alternative to the diacetyl and urease/GLDH methods.*

das primarias descrita por Reynolds y cols. (2). Las prestaciones del método señaladas por sus autores lo hacen en principio muy competitivo con los demás métodos utilizados habitualmente, sin embargo en nuestro conocimiento no ha sido evaluado suficientemente y su difusión es escasa. En una revisión de la bibliografía se han encontrado pocas referencias sobre este método (3) (4) (5) que recientemente ha sido comercializado en España en forma de kit por Gervi S. A.

Nos pareció en consecuencia de interés evaluar el método de Jung y cols. (1) para la determinación de la urea adaptado al Coulter Chemistry y al ABA-100, comparándolo con los dos métodos mas utilizados en la ac-

Laboratorio Central. Hospital General de Galicia. Universidad de Santiago de Compostela

(1) Una comunicación previa fue presentada en el "International Congress on Automation in the Clinical Laboratory". Barcelona. Abril 1982.

tualidad en el laboratorio clínico (diacetilmonoxima y ureasa/GLDH). Los resultados son satisfactorios y demuestran la bondad del método.

## Material y métodos

Se utilizaron reactivos "Spinreact Urea" (Gervi S. A., Barcelona) que responden a las especificaciones del método de Jung y cols. (1).

La adaptación al ABA-100 se hizo programando el analizador como se indica a continuación:

Temperatura	37°C
Mode selector	End point
Analysis time	10 minutos
Carousel revolution	2
Reaction direction	Up
Filters	550/650
Placa de dilución	1:201
Sample size	2,5 µl
Zero setting	0000
Factor de calibración:	Calculado con estándares

El monoreactivo de trabajo se preparó con un tiempo máximo de 5 minutos antes de su uso dada la inestabilidad del mismo.

En el Coulter Chemistry se adaptó al canal de la GPT poniendo una conexión en Y a la salida del solenoide correspondiente al primario para activar simultáneamente dos bombas de 1,5 ml. Se dejó la bomba del secundario libre al aire y a la salida de una de las bombas de 1,5 ml se conectó a la línea del primario y la otra a la línea del secundario para tomar independientemente los dos reactivos. Mediante otra conexión en Y se unen las dos salidas para conseguir la mezcla de ambos reactivos

en el momento de la adición al tubo de reacción, evitando así la coloración que se desarrollaría con el tiempo en los reactivos mezclados. Se coloca un loop de 20 µl, cubeta de lectura pequeña conectada a una bomba de 2,5 ml y un filtro de 540 nm. Se intercambian las salidas de los dos fotómetros de la urea y GPT, que se programan simultáneamente poniendo la GPT en OFF.

La calibración de los dos analizadores se hizo con 3C Calibrator (Coulter Electronics Inc.) y para el control de calidad se usaron los siguientes sueros control y estándares comerciales:

Set Standard glucosio-urea (Clinicals rs Carlo Erba)  
 Standard combinado glucosa-urea (Cromatest)  
 Standard urea (BioMerieux)  
 Solución patrón (Gervi)  
 Seronorm (Nyegaard)  
 Control Serum Dried, normal y anormal (SKI)  
 Suero Ortho, normal y anormal (Ortho Diagnostic System)  
 QAP I y II (Dade División American Hospital Supply Corporation)  
 Precinorm U y Precipath U (Boehringer Mannheim GmbH)  
 Validate A (General Diagnostics Division of Warner Lambert Company)  
 Pool de sueros preparado por nosotros según las normas de la AAPC.

Asimismo la urea fue determinada por el método de la ureasa/GLDH (BUN SpinChem, SmithKline Instruments Inc.) y de la diacetilmonoxima/antipirina (Coulter Electronics Inc.).

Para el cálculo de los errores fortuito, sistemático y analítico total se utilizó el criterio de Westgard y cols. (6) y Natrella (7) y como criterio de significación médica

Tabla I

### Estimación de la precisión por el método de los duplicados

	n	Rango	x	d	DE	C.V.	EF
<b>Coulter Chemistry</b>							
Intradía	14	19-160	72,14	0,86	0,88	1,22	1,95 (1,36-2,53)
Interdía	10	25-108	64,25	1,10	0,92	1,43	2,14 (1,36-2,93)
<b>ABA-100</b>							
Intradía	16	22-140	71,53	0,81	0,73	1,02	1,62 (1,13-2,10)
Interdía	10	24-109	63,95	1,10	0,92	1,44	2,14 (1,36-2,93)

Unidades: mg/100 ml

Tabla II

### Estimación de la exactitud mediante procesamiento de sueros control y estándares comerciales

	n	x	y	y = ax + b	r	s <sub>y,x</sub>	ES	ET	EMA
<b>Coulter Chemistry</b>	14	65,86	65,57	y = 0,98x + 1,31	0,999	1,38	0,39 (0,04-0,74)	2,54 (1,76-3,31)	6
<b>ABA-100</b>	14	65,86	65,21	y = 0,97x + 1,13	0,999	1,03	0,29 (0,22-0,36)	2,24 (1,46-3,01)	6

Unidades: mg/100 ml

Tabla III

Estudio de la linealidad comparada con estándares acuosos en mg/100 ml

	n	x	y	y = ax + b	r	$s_{y \cdot x}$	F	P	Rango
Coulter Chemistry	21	111,75	111,76	$y = x - 0,0034$	1	1,37	3,26	>0,05	8-270
ABA-100	26	111,86	111,83	$y = x + 0,003$	1	1,10	3,28	>0,05	8-300

Tabla IV

Correlación entre el método de o-ftaldehido ABA-100 (x) y el método DAM Coulter Chemistry (y)

n	Rango	x	y	y = ax + b	r	$s_{y \cdot x}$	$s_x/s_{y \cdot x}$
75	12-175	61,11	61,17	$y = 0,90x + 0,85$	0,999	1,92	20,8

Unidades: mg/100 ml

el de Barnet (8).

Las muestras analizadas, procedían de pacientes hospitalizados y ambulatorios a los que se les solicitaba la determinación de urea, y para su selección no se tuvo en cuenta si recibían o no medicación alguna.

## Resultados

La precisión inter e intradía obtenida con los dos aparatos por el método de o-ftaldehido así como los correspondientes errores fortuitos se indica en la Tabla I.

El estudio de la exactitud se hizo procesando distintos sueros control y estándares comerciales y los resultados se indican en la Tabla II. Se observa una buena correlación entre los valores asignados y los encontrados y no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias. Asimismo se indican los errores sistemático, analítico total y medicamento aceptable, observándose que el error analítico total carece de significación médica.

La linealidad se estudió utilizando un standard Cromatest de urea con una concentración de 1000 mg/100 ml y en la Tabla III se indican los resultados de los que se desprende que en el ABA-100 el método es lineal al menos para el rango 8-300 mg/100 ml y en el Coulter Chemistry para el rango 8-270 mg/100 ml.

En el ABA-100 no se encontró contaminación entre muestras sucesivas discrepantes. Por el contrario en el Coulter Chemistry se observó contaminación significativa sobre todo en el análisis de muestras de baja concentración procesadas inmediatamente después de una concentración alta. Algunos de los resultados se indican a continuación:

300-37, 10,3%; 300-18, 23,5%; 300-125, 1,6%; 18-300, 0,7%; 225-9, 22,2%; 225-18, 10,5%; 225-37, 10,8%; 37-225, 0,9%; 9-225, 0,9%.

La correlación de los resultados proporcionados por

el ABA-100 con el método de o-ftaldehido y los suministrados por el Coulter Chemistry con el método DAM es muy buena (Tabla IV), no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las medias ( $0,7 > P > 0,6$ ) y se observó homogeneidad de varianzas ( $P > 0,05$ ).

La correlación de los resultados proporcionados por el Coulter Chemistry por el método de o-ftaldehido y DAM es muy buena (Tabla V), no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las medias ( $P > 0,4$ ) y se observó homogeneidad de varianzas ( $P > 0,05$ ).

La correlación entre los resultados proporcionados por el Coulter Chemistry con el método del o-ftaldehido y los suministrados por el ABA-100 con el método de la ureasa /GLDH es muy buena (Tabla VI), no se encontró diferencia de medias estadísticamente significativa ( $0,1 > P > 0,05$ ) y se observó homogeneidad de varianzas ( $P > 0,05$ ).

En todos los estudios de correlación y regresión el rango de valores utilizados es el adecuado de acuerdo con el criterio de Westgard y cols. (9) y los puntos están muy agrupados en torno a la recta de regresión no existiendo ningún dato aberrante de acuerdo con el criterio de Burnet y cols. (10).

## Discusión

El espectro del cromógeno resultante permite la lectura en amplio rango de longitudes de onda, sin embargo Levinson (3) recomienda hacerlo a 550 nm, donde la relación de la absorbancia de la muestra a la del blanco de reactivos es máxima. Según este autor la absorbancia registrada es el resultado de dos componentes, uno debido a la reacción del o-ftaldehido con la urea y el otro debido a la reacción que se desarrolla entre los propios reactivos una vez mezclados. Nosotros, en el ABA-100,

Tabla V

Correlación entre el método de o-ftaldehido (x) y el método DAM (y) en el Coulter Chemistry

n	Rango	x	y	y = ax + b	r	S <sub>y-x</sub>	S <sub>x/S<sub>y,x</sub></sub>
121	13-204	57,28	47,12	y = 0,98x + 0,58	0,998	2,11	14,8

Unidades: mg/100 ml

Tabla VI

Correlación entre el método de la ureasa/GLDH ABA-100 (x) y el método del o-ftaldehido Coulter Chemistry (y)

n	Rango	x	y	y = ax + b	r	S <sub>y-x</sub>	S <sub>x/S<sub>y,x</sub></sub>
63	12-162	46,84	46,33	y = 0,97x + 1,09	0,998	1,78	16,5

Unidades: mg/100 ml

hemos comprobado que el blanco de reactivos aumenta gradualmente su absorbancia que no llega a estabilizarse aún después de una hora, observándose una pérdida linealidad paulatina a partir de los 15 minutos lo cual podría deberse a un proceso de degradación de alguno de los componentes de la mezcla. Esta es la razón por la que si es necesario, la preparación del monoreactivo debe hacerse estandarizando el tiempo transcurrido después de su preparación y que en ningún caso debe ser superior a 15 minutos antes de la lectura fotométrica.

Nuestros resultados ponen de manifiesto la buena precisión y exactitud alcanzada en la determinación de la urea sérica por el método de Jung y cols. (1) en las condiciones experimentales utilizadas, presentando además un amplio rango de linealidad. Los valores obtenidos son enteramente superponibles a los encontrados con los métodos de la diacetilmonoxima/antipirina y ureasa/GLDH, sobre los que el método de o-ftaldehido presenta la ventaja de su menor costo. Los reactivos son estables y no volátiles y la técnica no requiere una temperatura elevada. Como desventaja debe indicarse que el hecho de utilizar reactivos corrosivos puede ser un inconveniente en algunos analizadores.

Parecen ser pocas las substancias que pueden afectar los resultados del método de o-ftaldehido. El posible efecto interferente de las sulfamidas fue ya estudiado por Jung y cols. (1) y confirmado por Levinson (3). La bilirrubina a concentraciones superiores a 20 mg/100 ml puede producir errores por exceso y Pauli y cols. (5) encuentran que el fibrinógeno interfiere positivamente por producción de opalescencia en el medio reac-

cional, lo cual implicaría que las determinaciones no podrían realizarse en plasma.

Bibliografía

- 1) Jung D, Biggs H, Erikson J y Ledyard U. New colorimetric reaction for end-point, continuous-flow and kinetic measurement of urea. Clin. Chem. 21, 1136 (1975).
- 2) Reynolds RD, Arendsen DL, Guanci DF et al. Base-catalyzed condensations of o-phthaldehyde with primary amides. Synthesis and characterization of some isoindoline and phthalan derivatives. J. Org. Chem. 35, 3940 (1970).
- 3) Levinson SS. Kinetic Centrifugal Analyzer and Manual Determination of Serum Urea Nitrogen, with Use of O-Phthaldialdehyde Reagent. Clin. Chem. 24, 2199 (1978).
- 4) Urea Nitrogen. Ficha Técnica Technicon Quantachem (1978).
- 5) Pauli AM, Dumdulín B y Pastor J. Interférence du fibrinogène lors du dosage de l'urée par la méthode à l'o-phthalaldehyde sur des échantillons de plasma. Ann. Biol. Clin. 38, 381 (1980).
- 6) Westgard JO, Carey RN and Wold S. Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation. Clin. Chem. 20, 825 (1974).
- 7) Natrella MG. Experimental Statistics. Nat. Bur. Stand. Handb. 91, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 1963, pp. 4-1 a 4-7 y Tabla A-21, p T-36.
- 8) Barnett RN. Medical significance of laboratory results Am. J. Clin. Pathol. 50, 671 (1968).
- 9) Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, Quam EF, Garber CC and Carey RM. Citados en referencia 10.
- 10) Burnett D, Barbour HM and Woods TF. A Multicentre European Evaluation of the Kodak Ektachem GLU/BUN Analyzer Using NCCLS Guidelines and Other Approaches. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 207 (1982).