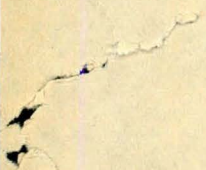


§ 500 =
DLCSA-



UNIVERSIDAD DE MONTERREY

Instituto de Ciencias
Naturales y Exactas

"ESTUDIO SOBRE EL CONTROL DE CALIDAD
DE UNA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN
DE UREA EN SANGRE"

Tesina que presenta

DOLORIS MARCELA AGUIRRE MATA

En opción al título de

Químico Farmacéutico Biólogo

Monterrey, N. L.

Junio de 1972.

040.6151
A284c
1972
C.2

800522

Con cariño a mi madre:

Marcela M. Vda. de Aguirre

A la memoria de mi padre:

Rubén Aguirre

A mis hermanos:

Rubén

E. de los Angeles

Consuelo Guadalupe

A la Universidad Labastida.

A todos mis maestros con gratitud.

Con especial agradecimiento

a mis maestros:

Sr. José Vargas Mena, Q.F.B., M.Sc.

Q.F.B. María Teresa Garza Gallardo.

Q.F.B. Blanca S. Garza Fernández.

I.Q. Aureliano García Fernández.

Por su valiosa colaboración en la

elaboración de esta tesina.

Este trabajo se efectuó en el
Laboratorio de Análisis Clíni-
cos Servicio Social "Labasti-
da - U. de M."

Bajo la dirección del Sr. ---

José Vargas Mena

Q.F.B., M.Sc.

INDICE

Introducción	1
Material y métodos	11
Resultados	16
Discusión y conclusiones	22
Resumen	24
Bibliografía	25

INTRODUCCION

La urea es el producto final más importante del metabolismo de las sustancias proteínicas en el hombre.

El lugar de formación de la urea fue demostrado por Balman, Maun y Magsth (citado por 5) que obtuvieron pruebas concluyentes, mediante experimentos en perros, a los que se les había practicado previamente hepatectomía, nefrectomía o ambas de que la urea se forma en el hígado. Al extripar solamente los riñones y suprimir la eliminación, se observaba aumento rápido de los valores de urea sanguínea. La extirpación del hígado, dejando los riñones, causó disminución de las cifras de urea en sangre. Cuando se practicaba la extirpación de ambos órganos, los valores de urea sanguínea se conservaba constantes, ya que no había formación ni eliminación de urea.

Trabajos in vitro han permitido comprobar que las enzimas encargadas de transformar el amoníaco a urea se encuentran en el hígado.

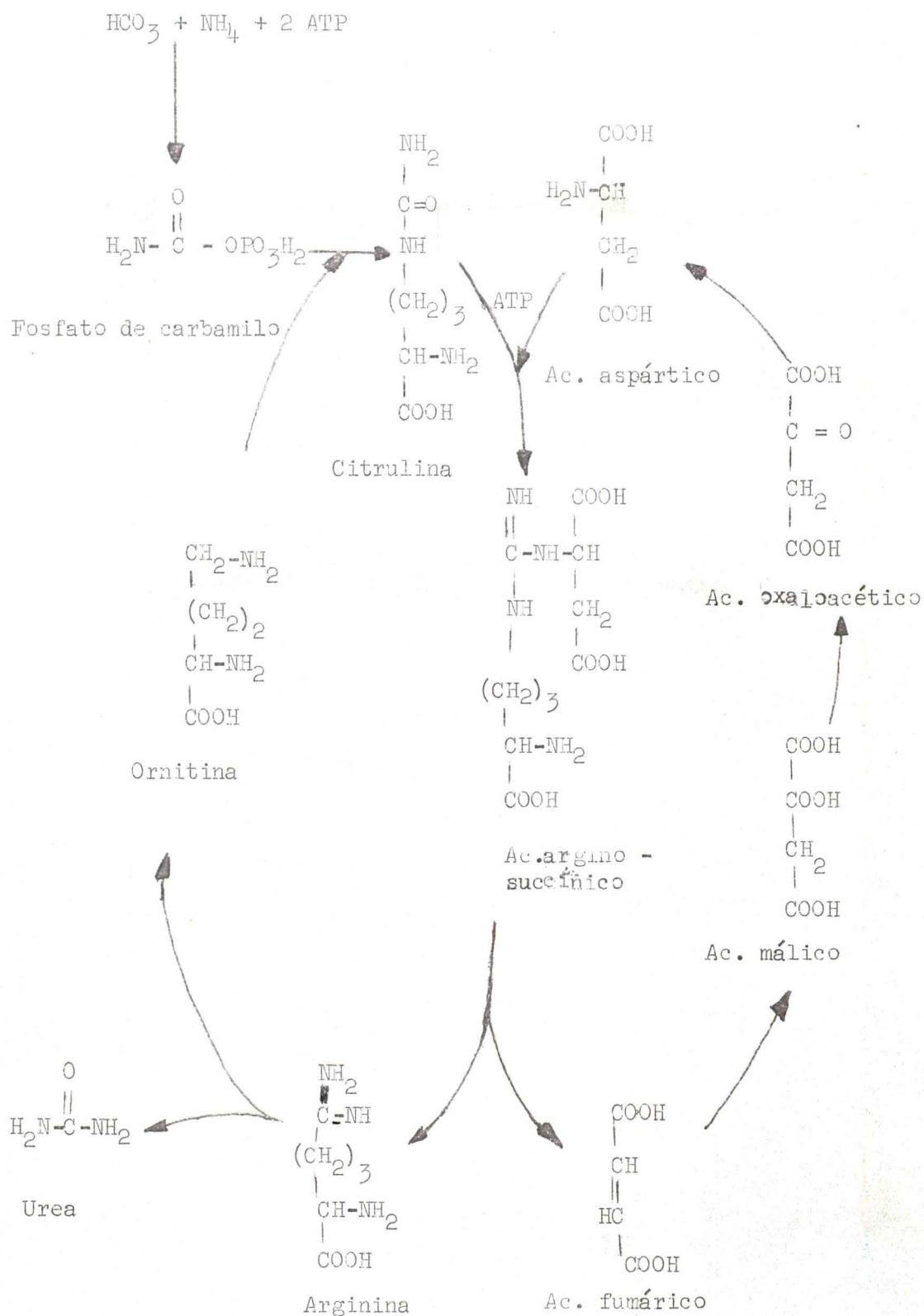
La biosíntesis de la urea fue demostrada por Krebs y Henseit (citado por 5) que por medio de estudios en cortes de hígado -

podieron establecer el mecanismo general por virtud del cual el amoníaco se transforma en urea. Estos investigadores incubaron cortes de hígado con sales de amonio, bicarbonato como fuente de bióxido de carbono y lactato como fuente de energía, y estudiaron la velocidad de formación de urea; observaron que la adición de ornitina la aumentaba notablemente y que la citrulina ejercía un efecto análogo. Descubrieron también que el aminoácido arginina es un producto intermedio de la reacción, y que el hígado posee la enzima arginasa que hidroliga la arginina a ornitina y urea.

Experimentos de balance demostraron que durante la síntesis de urea no disminuyó en forma apreciable la suma de las concentraciones de ornitina y arginina, mientras que la cantidad de amoníaco que desapareció era en esencia equivalente a la urea formada. La ornitina no fue consumida en el proceso, demostrándose que su acción es catalizadora; la citrulina intervino en la síntesis pero no actuó catalíticamente, ya que uno de sus nitrógenos apareció en la urea formada.

Tomando como base las anteriores observaciones los mismos investigadores postularon un mecanismo cíclico para la síntesis de urea en el cual participarían la ornitina, citrulina, arginina, amoníaco y bióxido de carbono. (fig. 1).

Fig. 1 Ciclo de formación de la Urea.



En la reacción inicial en este ciclo, se obtiene fosfato de carbamilo a partir de bióxido de carbono y amoníaco en presencia de ATP y de ácido n-acetil glutámico como cofactor. La citrulina se forma por la reacción de la ornitina con el fosfato de carbamilo. La arginina se forma a partir de la citrulina que reacciona con el ácido aspártico con producción inmediata de ácido arginosuccínico, que se transforma después en arginina, formando simultáneamente ácido fumárico. El ácido aspártico es regenerado del ácido fumárico por acción de enzimas del ciclo del ácido cítrico y por transaminación. La arginina, catalizada por la enzima arginasa forma urea y regenera ornitina.

En cada vuelta del ciclo dos moléculas de amoníaco y una de bióxido de carbono son transformadas en una molécula de urea y la ornitina es regenerada.

Después de que se ha formado en el hígado, la urea pasa a la sangre y es excretada en la orina. En los líquidos extracelulares e intracelulares tales como plasma, suero, líquido cefalorraquídeo y secreciones intestinales, la concentración de urea es prácticamente la misma por unidad de agua. En la sangre completa la concentración de urea varía con la cantidad de eritrocitos debido a la diferencia en el contenido de agua que existe entre el plasma y los eritrocitos

Los valores normales de nitrógeno de la urea están entre seis y veintidos mg. por cien ml. de plasma y varían directamente

con la cantidad de nitrógeno proteínico contenido en la dieta. La amplitud del rango de los valores normales del nitrógeno de la urea se debe a la variación en la cantidad de proteínas ingeridas y a la variación en el volumen urinario, este último depende a su vez de la cantidad de líquidos ingeridos.

La urea constituye aproximadamente la mitad (unos 25 g.) de la cantidad de sólidos urinarios. Su excreción por filtración glomerular está relacionada con el catabolismo y la cantidad de proteínas ingeridas.

Las hormonas que intervienen en el metabolismo proteínico pueden causar variaciones en la concentración de nitrógeno de la urea. Los andrógenos y la hormona del crecimiento, debido a su efecto anabólico, causan disminución de la concentración del nitrógeno de la urea mientras que los corticosteroides, un exceso de tiroxina o una deficiencia de insulina elevan la concentración debido a que aumentan el catabolismo.

Al aumento de nitrógeno de la urea en la sangre hasta niveles patológicos se le denomina azotemia, y puede producirse en casos de deshidratación, en problemas gastrointestinales especialmente cuando hay obstrucción intestinal, cuando hay desviación prerenal del agua por retención del nitrógeno de la urea; un catabolismo protéico aumentado produce también retención principalmente en la diabetes mellitus incontrolada, tirotoxicosis, hiperfunción adrenocortical, y algunas enfermedades neoplásticas.

Las lesiones patológicas que pueden causar disminución de la función renal para excretar el nitrógeno de la urea depende de 4 mecanismos: 1) disminución del flujo sanguíneo renal, 2) destrucción glomerular, 3) destrucción tubular y 4) aumento de la presión en el espacio capsular glomerular.

La concentración de urea en los líquidos biológicos es generalmente expresada como nitrógeno de la urea, la conversión de nitrógeno de la urea se lleva a cabo multiplicando el valor del nitrógeno de la urea por un factor que se obtiene relacionando el peso molecular de la urea 60 con el peso molecular de los dos átomos de nitrógeno 28 contenidos en la molécula de urea, de donde: $60/28$ es igual a 2.14 (factor de conversión de nitrógeno de la urea a urea).

Por lo anteriormente expuesto se deduce la importancia de la urea tanto en el funcionamiento hepático como renal, y precisamente por este hecho se decidió hacer un estudio sobre el control de calidad de una técnica para la determinación de urea sanguínea.

Los métodos mas usados para la determinación de urea sanguínea se basan en la incubación de una cantidad determinada de filtrado libre de proteínas con preparados de la enzima ureasa que cataliza la conversión de urea a carbonato de amonio. El amoníaco formado por acción de alcali sobre el carbonato de amonio puede determinarse directamente por métodos fotométricos o puede separarse por destilación y después determinarse fotocolorimétricamente o gravimétricamente. Al mismo tiempo el bióxido de carbono producido por la descomposición ácida del carbonato puede medirse gasométricamente o

por titulación. Existen otros métodos en los que no se utiliza la en zima ureasa, entre los cuales se encuentran principalmente la cromatografía en papel y la reacción con dimetilaminobenzaldehído que es específica para urea.

Métodos por reacción con la enzima ureasa:

a).- Método de Folin y Svedberg (6). En éste método el amoníaco producido por la acción de la enzima ureasa sobre un filtrado libre de proteínas se destila y se determina colorimétricamente con el reactivo de Nessler (yoduro alcalino de potasio y mercurio).

b).- Método de Seligson (6). El amoníaco es liberado por hidrólisis de la urea con la enzima ureasa en presencia de un alcalí. El amoníaco liberado en forma de gas es recolectado por difusión en un ácido, la solución ácida se nessleriza y se lee fotocolorimétricamente.

c).- Método de Van Slyke y Cullen (1). La sangre se trata con ureasa para convertir la urea en carbonato de amonio. Se alcaliniza con carbonato potásico y el amoníaco es arrastrado por aire y capturado con ácido bórico. El amoníaco se titula directamente con un ácido valorado.

Todos estos métodos se basan en el mismo principio o sea la liberación de amoníaco por acción de la enzima ureasa y solo difieren en la manera de separar y determinar el amoníaco liberado.

Entre los métodos que no usan la enzima se encuentran el de Levine (6). En este método muchos de los compuestos nitrogenados en un filtrado libre de proteínas preparado con ácido tricloroacético reaccionan con el reactivo de Erlich (solución de ácido p-dimetilamino benzaldehído) produciendo varios compuestos coloreados, pero el complejo producido durante la reacción con urea es el único que absorbe luz a una longitud de onda de 425 milimicras.

Para fines clínicos la determinación de nitrógeno de la urea es mucho más simple y proporciona la misma información por lo que en la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos la determinación de urea ha sido reemplazada por la determinación del nitrógeno de la urea.

El nitrógeno de la urea se puede determinar también por nesslerización directa usando la enzima ureasa, o por reacción con dia cetilmonoxima.

Métodos por nesslerización directa:

a).- Método de Karr (1). En este método el filtrado libre de proteínas en incubado con la enzima ureasa y una solución amortiguadora de acetato. La solución obtenida se nessleriza y compara en el

colorímetro con una solución tipo de urea sometida al mismo tratamiento.

b).- Existe un método por nesslerización directa para la de terminación de nitrógeno uréico en sangre capilar. Este método ideado por Keller (1) sigue el mismo principio del método anterior.

c).- Existe un micrométodo (3) en el cual el amoníaco producido por la acción de la enzima ureasa sobre la urea se determina por la reacción de Beerthelot con hipoclorito y fenol para producir un co lor azul intenso.

Método de la diacetilmonoxima para determinar el nitrógeno uréico.

En este método ideado por Ormsby (1) la urea se calienta con la diacetilmonoxima con solución ácida, formándose un color amari llo. Este color, intensificado por oxidación con persulfato de potasio, se compara después en el colorímetro con una solución valorada de urea tratada en igual forma.

Esta última técnica fué la que se escogió para la realización de este estudio por las siguientes ventajas:

- 1.- Es un método sencillo.
- 2.- Es bastante reproducible.
- 3.- Es un método bastante exacto y sus resultados no son -

alterados por la presencia de amoníaco u otros constituyentes nitrogenados de la sangre normal.

4.- Los reactivos que se utilizan son de fácil adquisición.

5.- La reacción requiere poco tiempo.

MATERIAL Y METODOS

La técnica que se empleó en este estudio fue la de Ormsby.

Se hicieron un total de 30 determinaciones en 5 soluciones de concentración conocida y 14 determinaciones en filtrados libres de proteínas de un "pool" de sueros. Las lecturas se hicieron en el fotocolorímetro Klett-Summrson modelo 8003.

1)- Determinaciones en suero.

a)- Preparación del "pool" de sueros. Las muestras de sangre que se emplearon para preparar el "pool" de suero se obtuvieron de personas, seleccionadas al azar, que asistieron al Laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labastida durante el mes de abril de 1972. A cada una de ellas se le extrajeron, por punción en el pliegue del codo con aguja calibre 21, de 5 a 10 ml. de sangre. Cada una de estas muestras fué depositada en un tubo de 13 X 100 mm., se dejó coagular, retraer el coagulo y se separó el suero por centrifugación; los sueros hemolizados o turbios fueron descartados. Las porciones de suero así obtenidas se fueron juntando en un matraz que se mantuvo constantemente en el congelador (-10°C). Una vez recolectada la cantidad adecuada de suero, se descongeló a temperatura ---

ambiente, se homogenizó por rotación y se repartió en tubos de 12 X 75 mm., estos tubos se congelaron (-10°C) y se mantuvieron a esa temperatura hasta el momento de ser usados. Los volúmenes contenidos en cada tubo fueron los necesarios para preparar un filtrado libre de proteínas por el método de Folin Wu (1), de tal manera que para cada filtrado se sacó un tubo del congelador, se descongeló a temperatura ambiente y se utilizó de inmediato. Todo este procedimiento se llevó a cabo con material previamente lavado con mezcla crómica, enjuagado con agua destilada y esterilizado en horno.

b)- Preparación de un filtrado libre de proteínas (1:10) por el método de Folin Wu (1).

En suero:

- 1)- Se pone en tubo de ensaye de 18 X 150 mm. un volumen de suero.
- 2)- Se agregan 4 volúmenes de ácido sulfúrico 1/12 normal (0.083 N).
- 3)- Se agregan 0.5 volúmenes de tungstato de sodio al 10%.
- 4)- Se tapa el tubo y se agita hasta que el precipitado que de fino, de color blanco.
- 5)- Se filtra o se centrifuga.

c)- Método de Ormsby. (1)

- 1) Se colocan 3 ml. de filtrado libre de proteínas en un tubo de ensaye.

2)- En un segundo tubo se ponen 3 ml. de solución "standard"
3)- En un tercer tubo se colocan 3 ml. de agua (blanco).
4)- A cada tubo se le añaden 5 ml. de ácido clorhídrico y 0.5 ml. de solución de diacetilmonoxima.

5)- Se mezcla el contenido por rotación y se colocan los tubos en baño de agua hirviente durante diez minutos.

6)- Se sacan del baño. Pasados cinco minutos, se agregan 0.25 ml. de solución de persulfato de potasio, de tal manera que se forma una capa en la superficie. Se tapan y se mezclan rápidamente. - Pasados 15 minutos se leen los tubos en el fotocolorímetro usando el filtro azul (420 milimicras), ajustando a cero con el tubo blanco.

d)- Cálculos

Se lee el problema y la solución "standard" y se obtiene el resultado con la formula:

$$P = \frac{16}{S} \times \text{mg. de nitrógeno de la urea por 100 ml.}$$

En donde:

16 es la concentración del "standard" expresada en mg.

S es la lectura de la solución "standard".

P es la lectura del problema.

2)- Preparación de una curva de calibración.

a)- Preparación de las soluciones de urea. Se preparó una solución "stock" de urea disolviendo 322 mg. de urea en 100 ml. de -

agua destilada; de esta solución "stock" se preparó una solución "standard" diluyendo 10 ml. de solución "stock" a 1000 ml. con agua destilada. Esta solución es equivalente a una sangre que contenga 16 mg. de nitrógeno de la urea por 100 ml. una vez hecho el filtrado 1:10.

Partiendo de la solución "stock" y de la solución "standard" se prepararon 5 diluciones de la siguiente manera:

Dilución # 1: 10 ml. de solución "standard" mas 20 ml. de agua destilada.

Dilución # 2: 20 ml. de solución "standard" mas 20 ml. de agua destilada.

Dilución # 3: la solución "standard".

Dilución # 4: 10 ml. de la solución "stock" aforados a 50 ml. con agua destilada.

Dilución # 5: 10 ml. de la solución "stock" aforados a 25 ml. con agua destilada.

La concentración de nitrógeno de la urea en las diluciones anteriores es de 4.0, 8.0, 16.0, 32.0 y 64.0 mg. por 100 ml. respectivamente.

Las determinaciones para cada una de las diluciones anteriores se hicieron por el método de Ormsby poniendo 3 ml. de solución de concentración conocida en lugar de 3 ml. de filtrado.

En algunas ocasiones las lecturas se hicieron a los cinco diez y quince minutos como lo recomiendan algunos autores.

3) - Reactivos

a) - Acido clorhídrico concentrado

b) - Solución de diacetilmonoxima. Solución acuosa al 3%, se conserva por lo menos durante cuatro semanas a la temperatura ambiente e indefinidamente si se conserva bien tapada en el refrigerador mientras no se usa.

c) - Solución de persulfato potásico. Solución acuosa al 1%. Esta solución, conservada en el refrigerador, es estable durante una semana.

RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan los valores obtenidos en cada una de las determinaciones de las soluciones de concentración conocida; la concentración está expresada en mg. por 100 ml.

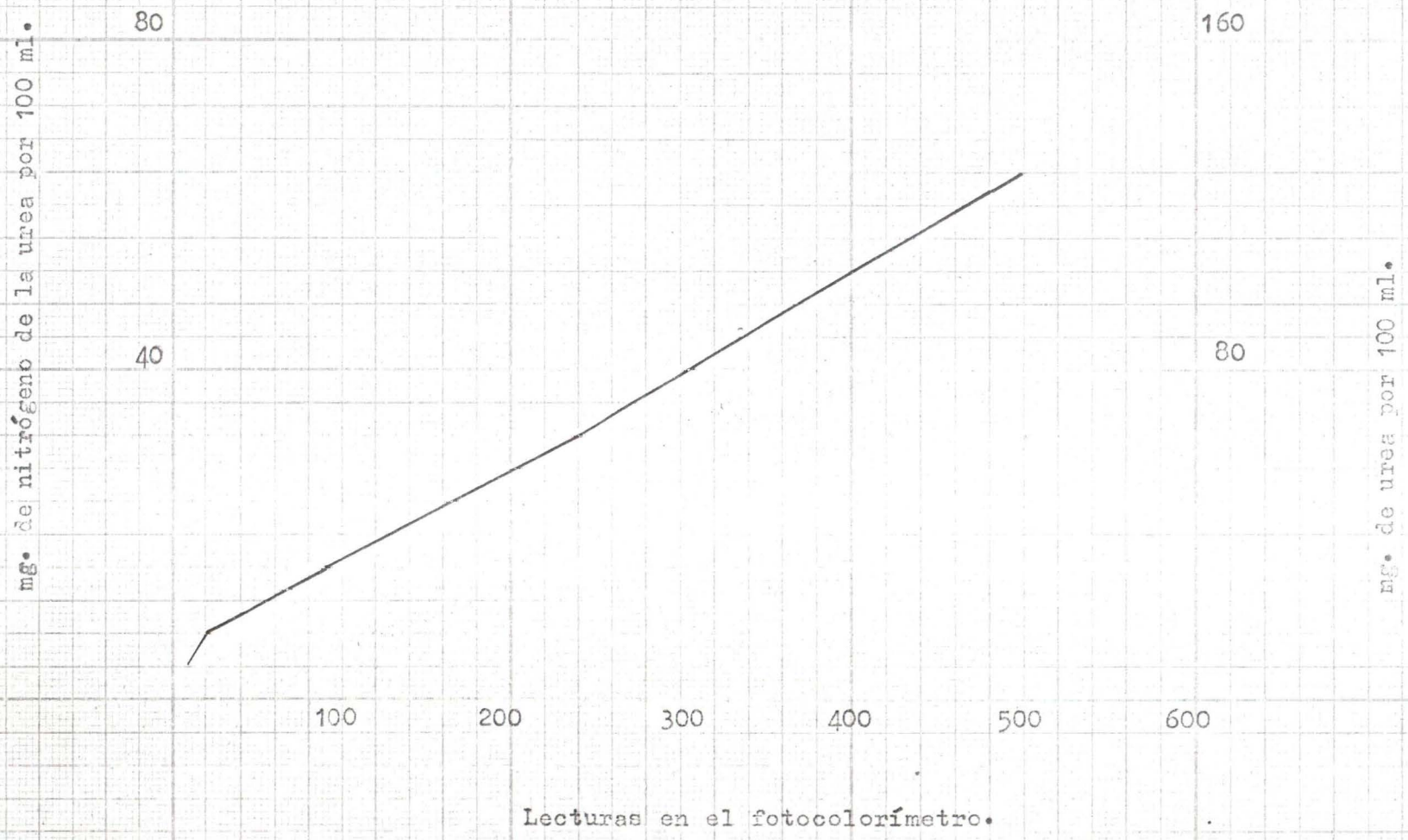
Se calculó la media aritmética para cada solución y los valores obtenidos se graficaron para obtener una curva (fig. 2), podrá ser usada como curva de calibración en el Laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labastida. En la gráfica se encuentran en el eje de las ordenadas las lecturas obtenidas en el fotocolorímetro y en el eje de las abscisas las concentraciones expresadas en mg. por 100 ml. de nitrógeno de la urea . Del lado opuesto se encuentran los valores equivalentes a la concentración de urea.

TABLA 1

Lecturas obtenidas en el fotocolorímetro para las determinaciones de las soluciones de concentración conocida.

Concentración en Mg. por 100 ml	Lecturas en el fotocolorímetro						Media Aritmética - (\bar{x})
	1	2	3	4	5	6	
4	7	10	10	11	7	10	9
8	20	21	21	25	20	25	22
16	90	90	90	93	90	90	91
32	240	240	240	240	244	244	241
64	500	500	500	500	498	498	499

Fig. 2 Curva de calibración.



En la tabla 2 se encuentran los valores obtenidos en las determinaciones del "pool" de sueros. Cada determinación se comparó con una solución "standard" conteniendo 16 mg. de nitrógeno de la urea por 100 ml.. Se calculó la concentración según la fórmula ya mencionada y se comparó con los valores obtenidos según la curva de calibración. Como puede observarse la diferencia es mínima por lo que los valores pueden considerarse iguales.

Se calculó la media aritmética (\bar{X}) de las 14 determinaciones y la desviación "standard" (DS). La media aritmética fue de 17.5 y la desviación "standard" de 0.6 que corresponde a un coeficiente de variabilidad de 3%.

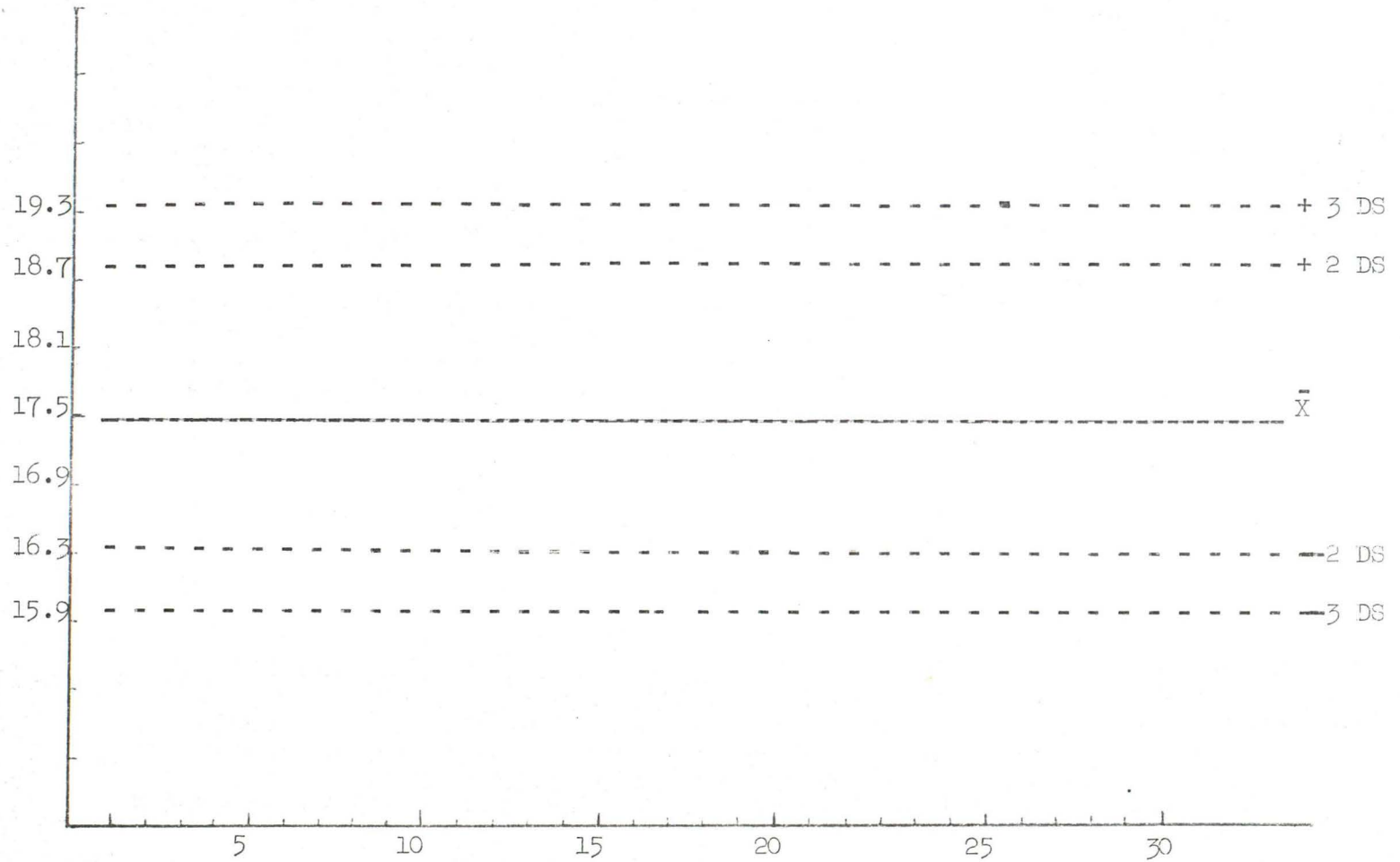
Con estos valores se trazó un diagrama para control de calidad (fig. 3).

TABLA 2

Valores, expresados en mg. por 100 ml. obtenidos para las -
determinaciones de un "pool" de suero.

Filtrado No.	Concentración de nitrógeno de la urea expresado en mg. por 100 ml.	
	Calculada contra la solución "Standard "	Calculada contra la curva de cali bración .
1	16.6	16.0
2	17.9	17.6
3	17.5	17.5
4	17.9	17.6
5	17.8	17.5
6	18.1	17.6
7	17.8	17.5
8	18.1	17.6
9	17.6	17.6
10	17.8	17.5
11	17.3	17.2
12	17.1	17.2
13	17.5	17.5
14	18.1	17.6

Fig. 3 Esquema de un diagrama de control de calidad.



DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

La técnica de Ormsby implica un procedimiento sencillo, una serie de reactivos que además de ser pocos son de fácil adquisición, preparación y costo moderado. Respecto a su estabilidad, la solución de diacetilmonoxima es estable indefinidamente si se guarda en el refrigerador; la de persulfato de potasio es estable solamente una semana pero su preparación no es problema ya que es una solución acuosa al 1%. El tiempo requerido en esta técnica es relativamente corto en relación con el tiempo requerido para las técnicas en que interviene la reacción con la enzima ureas.

El baño de agua debe estar a ebullición y el tiempo de calentamiento debe ser exacto; ya que se comprobó que al variar una de estas condiciones se obtenían lecturas mas bajas. Al leer los tubos a los cinco, diez y quince minutos no hubo variación, pero en una ocasión las lecturas se hicieron después de quince minutos y se observó que los valores bajaron.

Esta técnica puede realizarse en filtrados libres de proteínas de sangre completa, suero o plasma. Los filtrados libres de proteínas que se utilizaron en este estudio se obtuvieron de suero debido a que el suero se puede guardar facilmente en el congelador.

Los errores que se pueden cometer en esta técnica son principalmente debidos al operador y se reducen a los errores al medir los reactivos ya que las cantidades que se usan son mínimas. Otros errores pueden deberse al tiempo de calentamiento, a la temperatura del baño y al tiempo en que se deben hacer las lecturas.

Con respecto a la reproducibilidad de la técnica se puede considerar de acuerdo con los resultados anteriormente descritos que es una técnica bastante reproducible, por lo tanto tomando en cuenta este punto y los anteriormente expuestos puedo sugerir que la técnica de Ormsby es adecuada para ser usada como técnica de rutina para la determinación de urea sanguínea en el Laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labastida.

RESUMEN

Se hizo un estudio sobre el control de calidad de una técnica para la determinación de urea sanguínea en un laboratorio de análisis clínicos.

El trabajo consistió en un total de 30 determinaciones de 5 soluciones de concentración conocida y 14 determinaciones de un "pool" de suero. Se calculó la media aritmética para cada una de las soluciones y los valores se graficaron para obtener una curva de calibración. En las determinaciones en el "pool" de suero una vez obtenidos los resultados en mg. por 100 ml. se calculó la media aritmética, la desviación "standard" y el coeficiente de variabilidad graficándose un diagrama de control de calidad.

Se analizaron los resultados y se concluyó que la técnica de Ormsby es bastante reproducible y por lo tanto se recomendó para ser usada como técnica de rutina en el Laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labastida.

BIBLIOGRAFIA

1. Kolmer, J. A.; Spaulding, E. H. and Robinson, H. W.; Métodos de Laboratorio. 5a Ed.; Editorial Interamericana, México. 1152-p. 1960.
2. Lynch, J. M.; Rapahel, S. S. and Mellor. D. L.; Métodos de Laboratorio. Interamericana, México. 661 p. 1965.
3. Bauer, J. D.; Ackermann, P. G. and Toro, G.; Bray's Clinical Laboratory Methods. 7th Ed.; Mosby, Saint Lous. 764 p. 1968.
4. Davidsohn, I. and Henry, J. B.; Todd-Sanford Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. 14th Ed.; W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1308 p. 1969.
5. Mason, S. H.; Todd, R.W. y West, S. E.; Bioquímica Médica 4a. Ed.- Interamericana, México. 1214 p. 1969.
6. Oser, B. L.; Hawk's Physiological Chemistry. 4th. Ed.; Mc Graw- -- Hill, New York. 1472 p. 1965.

7. Smith, D.R.; Urología General. 3a. Ed. El Manual Moderno; México.
423 p. 1972.

8. Hoel, P. G.; Estadística Elemental; 2a. Ed. Editorial Continental,
México. 400 p. 1968.

800522

FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

Vencido el plazo, el lector pagará 5 peso por cada día que pase.

Plata 153,672

Sept
20-11-77



UNIVERSIDAD DE MONTERREY

VENCIMIENTO

OCT. 28 1996.



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

Biblioteca

08 OCT. 2002



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

**VENCIMIENTO
Biblioteca**

08 OCT. 2002

VENCIMIENTO