

Desarrollo de una formulación estable de ureasa líquida para la determinación de urea en suero

Development of a stable formulation of liquid urease for determination of serum urea

MSc. Lisandra García Borges, Téc. Belkis Rodríguez Fernández, MSc. Gissel Aja Maza, MSc. Juan Alberto Pérez Carrasco, MSc. Niurka Russeaux Guía, MSc. Lilliam Valdés Diez, MSc. María Victoria Licea Tornés

Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la determinación de urea en suero reviste gran importancia para el diagnóstico clínico de diversas afecciones de origen renal. Los métodos más aplicados para este fin implican el uso de la enzima ureasa por su alta especificidad en la hidrólisis de este analito, entre los cuales el método de Berthelot, emplea la ureasa en el primer paso de la reacción, seguido de una reacción colorimétrica del amoníaco liberado. La presentación de la ureasa en forma líquida es uno de los elementos que hacen más sencillo este proceso, de fácil y rápida ejecución con resultados confiables.

Objetivo: desarrollar una solución de ureasa estable, como componente del juego de diagnosticador de urea en suero.

Métodos: se diseñó y optimizó la formulación teniendo en cuenta: la concentración de la enzima, las soluciones *buffer*, los preservos y los compuestos orgánicos polihidroxilados para lograr un producto en forma líquida estable. Se evaluó la especificidad, precisión, linealidad, exactitud (comparación de métodos) y la sensibilidad del método; así como la estabilidad en vida de estante de 2 a 8 °C, por un período de 18 meses.

Resultados: se logró un reactivo líquido estable (> 12 meses de 2 a 8 °C), donde el método analítico resultó ser específico y lineal hasta 30 mmol/L de urea ($r^2 = 0,999$), sensible, preciso coeficiente de variación, $CV < 3\%$) y exacto ($r \geq 0,999$), satisfactorio para el uso al que se destina el producto, con calidad analítica comparable con los existentes en el mercado.

Conclusiones: el desarrollo de la formulación de ureasa líquida estable, permitirá introducir este componente esencial, en el juego de reactivos de urea que oferta la

Industria Nacional al Sistema de Salud de acuerdo con los requisitos vigentes (Reg. 8-2001) para su comercialización.

Palabras clave: ureasa, urea, diagnóstico clínico, laboratorio clínico.

ABSTRACT

Introduction: determination of serum urea has great importance for the clinical diagnosis of several renal illnesses. The most implemented methods involve the use of the urease enzyme because of its high specificity for this analyte hydrolysis; the Berthelot method uses urease in the first reaction step followed by colorimetric reaction of the released ammonium. The presentation of urease in liquid form is one of the elements that make this process simpler, of easy and fast application with reliable results.

Objective: to develop a stable urease solution as part of the diagnostic set for serum urea.

Methods: the adequate formulation was designed and optimized by taking into account the enzyme concentration, the buffer solutions, the preservatives and the polyhydroxylated organic compounds to attain a final stable liquid product. The parameters called specificity, precision, linearity, accuracy (comparison of methods) and sensitivity of the method were all evaluated in addition to the shelf life at 2 a 8 °C for 18 months.

Results: a stable liquid reagent (over 12 months at 2 a 8 °C) was reached; the analytical method proved to be specific and linear up to 30 mmol/L of urea ($r^2 = 0,999$), sensitive, precise, with variation coefficient lower than 3 % and accurate ($((r \geq 0,999)$), satisfactory for the intended use of the product and the analytical quality comparable to that of the already existing products.

Conclusions: the development of the stable liquid urease formulation will allow introducing this essential component in the reagent set for urea offered by the national industry to the healthcare system according to the requirements for commercialization (Reg 8-2001).

Keywords: urease, urea, clinical diagnosis, clinical laboratory.

INTRODUCCIÓN

La ureasa o urea amidohidrolasa es una enzima del grupo de las amidas, que escinde enlaces C-N no peptídicos, es una metaloenzima que cataliza la conversión de urea a amonio y carbamato, en una reacción de orden cero:¹



Es una enzima altamente específica que se inactiva por la presencia de iones metálicos pesados como son mercurio, cadmio, cobre, plata, igualmente es inhibida por algunos boratos, halógenos, quinonas, formaldehídos, peróxido de hidrógeno entre otros. Estructuralmente está caracterizada como una metaloproteína

heteropolimérica, por presentar en su centro activo dos iones Ni^{2+} unido a tres subunidades independientes (alfa, beta y gamma).

La enzima es estabilizada por EDTA, compuestos tiólicos y azúcares, en un intervalo de pH entre 5 a 8 y baja fuerza iónica.

Por su especificidad ha sido introducida en la determinación de urea y ha dado lugar a un gran número de ensayos que conllevan un primer paso de hidrólisis de esta. Varios autores y firmas comerciales han dedicado sus trabajos a lograr la mayor estabilidad de este producto en su empleo por el método Berthelot con este fin.²

La Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay" (La Habana, Cuba) tiene un diagnosticador capaz de cuantificar los niveles de urea en suero por el método Berthelot; este juego cuenta con un reactivo liofilizado de ureasa, el cual encarece su producción y solo es estable durante 7 días una vez restituido.

La posibilidad de contar con un reactivo enzimático en solución estable, es uno de los elementos que hacen más sencillo este proceso, de fácil y rápida ejecución con resultados confiables, garantiza una disminución en los costos y tiempo de producción, elimina el paso de reconstitución de un liofilizado y permite utilizar solamente la cantidad necesaria de este componente para el desempeño durante el día, lo que garantiza su estabilidad durante el tiempo en uso. Tomando en consideración estos aspectos, el objetivo del trabajo fue desarrollar una solución de ureasa estable.

MÉTODOS

Los productos químicos utilizados fueron de calidad analítica. Las muestras utilizadas corresponden a sueros control comercial con valores normales (Precinorm U No.Cat. 10171735) y patológicos (Precipath U No.Cat. 10171760) (Roche, Alemania). Se emplearon los componentes del juego SalicUrea® (Laboratorios Finlay, La Habana): reactivo alcalino, reactivo color y solución de referencia de urea 8,33 mmol/L.

Los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro modelo T70 UV/Vis a una longitud de onda de 620 nm y se procesaron estadísticamente con un software Stagraphics plus 5.5

Para el procedimiento analítico se preparó un reactivo de trabajo (RT) con 20 μL de la solución ureasa por 2 mL de solución reactivo color. Se realizó la técnica analítica y el cálculo de la concentración de urea según se describe:

	Blanco	Muestra/referencia
RT	2 mL	2 mL
Muestra/solución de referencia	-	20 μL
Mezclar e incubar 5 min a 37 °C		
Reactivo alcalino	2 mL	2 mL
Mezclar e incubar 5 min a 37 °C, leer a 620 nm contra blanco reactivo		

$$C_m = A_m^* (Cr/Ar)$$

Donde:

Cm: concentración de la muestra.

Am: absorbancia de la muestra.

Cr: concentración de la referencia.

Ar: absorbancia de la referencia.

En el diseño de la nueva formulación se estudió la concentración de la enzima ureasa y *buffers*: HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiracina N'-2-etanosulfónico) o citrato). En el estudio se tuvo en cuenta la relación entre las variables dependientes objeto de análisis y las variables independientes $y = f$ (concentración de ureasa; concentración del buffer) en un modelo factorial 3×2 , en el cual el rango de concentraciones analizado (x_1 = ureasa de 4 a 10 U/mL y x_2 = HEPES de 0,4 a 0,8 % o citrato 3 a 5 %), varía para cada formulación, lo cual permite definir la combinación óptima de concentraciones para dos variables en 18 corridas, por triplicado. Además, se tomaron en cuenta diferentes composiciones de sustancias auxiliares como preservante y agente quelante, lo que garantizará una solución estable.

Se evaluó el comportamiento de compuestos orgánicos polihidroxilados (propilenglicol, sorbitol y etilenglicol) como estabilizantes de soluciones enzimáticas en la formulación seleccionada anteriormente.³ Se analizó la estabilidad de la enzima con la adición de la albúmina bovina como estabilizante, además de usar azida sódica, a tiempo cero y 30 días a temperatura de 37 °C.

Para la selección de la mejor variante se tuvo en cuenta el cumplimiento de todos los parámetros evaluados: características organolépticas, pH y funcionabilidad del método analítico en la determinación de urea en suero; para lo cual las soluciones preparadas se llenaron a 2 mL en frasco de cristal ámbar con capacidad de 5 mL, y se sometieron a estudio de estabilidad acelerada a temperatura de 37 °C en un periodo de 15 días.

Con la variante escogida se prepararon tres lotes de escalado a 5 L para 2 500 estuches cada lote y se efectuó la estabilidad en vida de estante a temperatura de 2 a 8 °C, evaluándose los parámetros antes mencionados durante 18 meses con una frecuencia trimestral. Se realizó el estudio de validación con estos lotes, evaluándose la especificidad, sensibilidad, precisión, linealidad y exactitud del método analítico.

La sensibilidad del ensayo funcional fue estimada a partir de la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración a concentraciones de 3 mmol/L a 20 mmol/L, utilizando tres concentraciones inferiores al menor valor de la curva de calibración.

La linealidad se realizó con soluciones a concentraciones de urea entre 0,12 mmol/L y 30 mmol/L, se determinaron los valores de absorbancia correspondientes, en tres réplicas por punto y se efectuó el ajuste entre la relación de estas variables a partir de un análisis de regresión lineal.

La precisión se analizó a través de los coeficientes de variación entre los valores obtenidos en el día y entre las corridas. El ensayo de repetibilidad se efectuó para

nueve réplicas consecutivas en el día y la precisión intermedia para 6 réplicas durante 3 días, utilizando sueros con valores de concentración normal y patológica.

Se determinó el coeficiente de correlación lineal en un estudio por comparación de métodos, entre el método en estudio y el método urea UV No. Cat 13101 (Diasys, Alemania),⁴ evaluándose 100 muestras de pacientes para este propósito.

Se realizó el estudio de especificidad a través del ensayo de paralelismo empleando soluciones acuosas de urea y en diluciones de una muestra biológica que abarcó el mismo intervalo de concentraciones.

RESULTADOS

Durante la optimización de la concentración de la enzima y el *buffer* citrato, en cada frecuencia del estudio de estabilidad acelerada a temperatura de 37 °C, las soluciones preparadas cumplieron con el criterio de pH y funcionabilidad, no así las características organolépticas que en el caso de la concentración de ureasa a 4 U/mL fue opalescente en un tiempo de 5 días y para 8 U/mL se deterioró en un tiempo de 11 días, de solución transparente a opalescente; por lo cual se decidió seguir el estudio con la solución a concentración de ureasa 10 U/mL.

En el caso del buffer HEPES las características organolépticas no fueron adecuadas, se observó opalescencia recién preparado; el pH estuvo fuera de los límites de aceptación (6 a 7), aspecto importante para el desarrollo de la reacción; al ajustar el pH los valores de urea en los sueros control normal y patológico se obtenían fuera del intervalo aprobado para este analito.

La tabla 1 y figura 1 muestra el resultado del estudio de los compuestos orgánicos en el tiempo que permitió seleccionar la variante con etilenglicol, la cual no mostró diferencias significativas en el análisis. La solución con polietilenglicol se enturbió en 7 días a 37 °C, por lo que no cumplió con las características organolépticas para su empleo; la solución con sorbitol a pesar de encontrarse los resultados de los diferentes ensayos dentro del intervalo de aceptación, los valores de los controles se aproximaban al límite inferior disminuyendo aún más su valor en el transcurso del estudio. Con la adición de los preservados, se alcanzó mayor estabilidad dada por la repetibilidad en los resultados obtenidos en el análisis funcional a los diferentes tiempos de estudios, demostrado estadísticamente por una pendiente más próxima a cero.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del estudio en vida de estante de 2 a 8 °C. La formulación preparada cumplió con el criterio de pH y funcionabilidad, así como las características organolépticas que se mantuvieron transparente y ligeramente amarilla en cada frecuencia de análisis.

La evaluación del método de análisis para determinar urea en suero avaló la funcionabilidad del diagnosticador, a partir del nuevo diseño de la formulación en solución líquida, los resultados se explican a continuación.

Se estimó el límite de cuantificación mediante el valor de la ordenada en el origen expresado en unidades de concentración, a partir de una curva de calibración. Se obtuvo un valor de 0,036 mmol/L para el límite de detección (LOD) y de 0,12 mmol/L para el límite de cuantificación (LOQ). El valor del límite de cuantificación se demostró con la precisión (CV= 1,10 %) y la exactitud (% de recuperación= 92 %).

Tabla 1. Estudio de los compuestos orgánicos en el tiempo

Variantes	Características organolépticas															Criterio aceptación
	Tiempo (días)															
P	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
pH																
Variantes	Tiempo (días)															Criterio aceptación
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
P	6,45	6,45	6,44	6,45	6,45	6,46	6,44	6,45	6,45	6,44	6,46	6,45	6,45	6,44	6,44	
E	6,48	6,49	6,48	6,48	6,49	6,49	6,5	6,49	6,49	6,49	6,49	6,48	6,49	6,49	6,49	
S	6,41	6,39	6,40	6,40	6,40	6,41	6,39	6,40	6,40	6,40	6,39	6,40	6,40	6,40	6,39	

P: polietilenglicol; E: etilenglicol; S: sorbitol.

Tabla 2. Estudio de estabilidad en vida estante de la formulación diseñada

Lotes	Frecuencia de análisis	pH	Ensayo funcional de urea	
			Control normal (mmol/L)	Control patológico (mmol/L)
1105	Inicial	6,38	7,20	25,24
	3 meses	6,37	7,30	24,01
	6 meses	6,38	7,31	24,60
	9 meses	6,40	7,34	23,91
	12 meses	6,39	7,56	24,52
	18 meses	6,37	7,25	25,03
1106	Inicial	6,40	7,22	24,32
	3 meses	6,40	7,16	23,85
	6 meses	6,39	7,35	25,24
	9 meses	6,40	7,18	24,37
	12 meses	6,38	7,08	23,91
	18 meses	6,39	7,31	24,85
1107	Inicial	6,39	7,23	25,40
	3 meses	6,43	7,31	24,14
	6 meses	6,40	7,34	24,38
	9 meses	6,38	7,61	24,41
	12 meses	6,39	7,12	23,89
	18 meses	6,39	7,55	25,10
Límites	-	6..a 7	6,20..a 8,42	21,2..a 29

Del análisis de regresión lineal, se obtuvo la ecuación de regresión $y = 0,993x + 0,01836$ con un coeficiente de determinación $r^2 = 99,9388\%$, un p-valor en la tabla ANOVA inferior a 0,01, lo que indica una correlación fuerte entre las variables.

En la tabla 3 se ofrecen los resultados del coeficiente de variación (CV) en cada ensayo, inferiores al 5 % tanto para la repetibilidad como la precisión intermedia; comportamiento satisfactorio para un método enzimático. Se compararon los resultados empleando la prueba de Anova de clasificación simple, lo cual demostró que no hay diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0,05$) entre las repeticiones en el día y de un nivel de día a día para un 95 % de confianza. La comparación entre dos analistas diferentes dio un valor de p para suero control normal de 0,5717 y de 0,12315 para suero control patológico; ambos cumplieron con el criterio estadístico establecido, resultado que garantiza la seguridad del empleo de este reactivo en la rutina diaria del laboratorio clínico o estudios investigativos de patologías relacionadas con la urea.

Tabla 3. Estudio de precisión del método analítico de urea

Repetibilidad (dentro del día)					
Muestra	No. de muestra	Concentración media de urea (mmol/L)	DS	CV (%)	p valor
Suero control normal	9	7,06	0,2825	4,11	0,4742
Suero control patológico	9	25,01	0,7628	3,05	0,5717
Precisión intermedia (entre días)					
Muestra	No. de muestra	Concentración media de urea (mmol/L)	DS	CV (%)	p valor
Suero control normal	18	6,966	0,3009	4,32	0,9483
Suero control patológico	18	24,59	0,8953	3,64	0,1310

En la evaluación de la exactitud, se obtuvo un coeficiente de correlación entre el juego de prueba con la solución de ureasa líquida y el método UV de referencia de 99,92 %, siendo la ecuación de la recta: método de prueba = 0,489003 + 0,977353*método de referencia.

El estudio de especificidad, representado en la figura 2, proporcionó dos curvas de calibración, preparadas en soluciones acuosas y en suero, con pendientes muy similares para ambos casos: curva estándar 0,985 y curva de muestras biológicas 0,993, en el mismo intervalo de concentración analizado, lo cual indica que no existen interferencias por efecto matriz biológico.

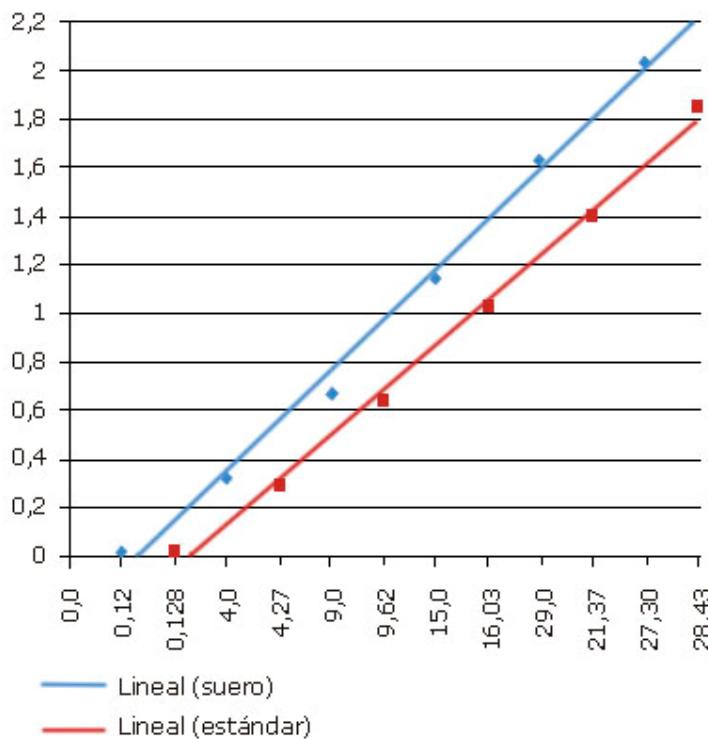


Fig. 2. Estudio de especificidad del método analítico de urea.

DISCUSIÓN

El desarrollo de esta formulación comprendió diferentes ensayos desde la selección del *buffer* hasta la estabilización con diferentes sustancias auxiliares, para garantizar la calidad del producto y la funcionalidad que define su empleo o no para el objetivo que se diseña, así como la estabilidad por un período mayor de 12 meses, para su comercialización,⁵ lo cual se demuestra en los resultados expresados anteriormente.

La actividad de la ureasa depende sobre todo del tipo de *buffer* presente que garantiza el pH de la reacción, de la concentración de la ureasa y la concentración de sales en la formulación.⁶ Con este propósito se analizó primeramente la acción del *buffer* en la reacción que permite mantener el pH estable en presencia del amonio liberado en la reacción, para lo cual se recomienda el uso de *buffer* zwitteriónico de baja conductividad como el HEPES o sales de citrato.

El comportamiento de estas variantes permitió seleccionar las sales de citrato y continuar el estudio adicionándole sustancias auxiliares que garanticen la estabilidad en el tiempo de esta formulación. Los compuestos orgánicos polihidroxilados³ y la albúmina son sustancias por excelencia para estabilizar algunas enzimas en solución. Así también, la adición de la azida sódica permitió inhibir el crecimiento bacteriano, evitando la degradación de la enzima.

En los sistemas estudiados se pudo apreciar que el resultado satisfactorio para el fin previsto fue la composición de esta formulación con sales de citrato, azida sódica, etilenglicol, ureasa con actividad de 10 U/mL en la reacción y albúmina bovina. El reactivo es estable en un período de hasta 18 meses estudiado, con

sensibilidad analítica satisfactoria para su uso, con un intervalo de especificidad de hasta 30 mmol/L, comparable con métodos validados y reconocidos en el mercado internacional. Se presenta con una técnica de análisis asequible a toda la infraestructura tecnológica de todas las instituciones de salud cubana, que permite el empleo de un reactivo listo para su uso de acuerdo a la necesidad existente en cada laboratorio, con valores repetibles frente a cada muestra de paciente.

Con este estudio se logró el diseño de una formulación líquida estable para la enzima ureasa que permite sustituir en el juego de reactivos para determinar urea en suero, la etapa de liofilización con las complejidades industriales que lleva este proceso disminuyendo el costo del producción del diagnosticador, así como a nivel de laboratorios el uso en un tiempo más prolongado de este componente sin riesgo de su deterioro.

Todo los ensayos que avalan los aspectos de calidad y estabilidad, se realizaron según las regulación 8-2001 "Requisitos para el registro sanitario de un diagnosticador", que permitirá introducir este componente esencial, en el juego de reactivos de urea que oferta la Industria Nacional al Sistema de Salud, para su comercialización.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berg Jeremy M, Tymoczko John L, Stryer L. Biochemistry. 6th ed. London: W.H. Freeman and Company; 2011. p. 205-38.
2. Copeland A, Allen R. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery a guide for medicinal chemists and pharmacologists. Vol 46. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2007.
3. Pazhang MKK, Ranjbar B, Hosseinkhani S. Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. Rev J Biotechnol. 2006;127(1):45-53.
4. Catálogo de Productos de Sistemas Diagnósticos Diasys 2012. Holzheim, Alemania: Grafikdesign; 2012.
5. Regulación D 08-13. Reglamento para la autorización de comercialización de los diagnosticadores. La Habana: CECMED; 2013.
6. Panteghini MBR, Van Solinge WW. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.

Recibido: 2 de julio de 2014.
Aprobado: 6 de agosto de 2014.

Lisandra García Borges. Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay". Infanta No.1162. Centro Habana. La Habana, Cuba. Correo electrónico:
lisygarcia@finlay.biocubafarma.cu
