

Comunicación breve

Validación de dos métodos para la determinación de ion amonio y sulfato inorgánico como indicadores de riesgo de litiasis renal en orina

RECIBIDO: 30/04/16

REVISION: 05/09/16

ACEPTADO: 11/10/16

Fernández, V. G.* • Sobrero, M. S.* • Marsili, N.** • Bonifacino Belzarena, R.* • Brissón, C.* • Pedro, A.* • Denner S.***

*Dpto. Bioquímica Clínica y Cuantitativa, **Química Analítica II. ***Dpto. de Química General e Inorgánica, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, Santa Fe, Argentina. Tel: (342) 4575215, Fax: (342) 4575221.

E-mail: vfernand43@hotmail.com

RESUMEN: La evaluación metabólica del paciente litiasico implica la determinación de inhibidores y promotores de la litogénesis. Entre los últimos están el ion sulfato inorgánico y el ion amonio. El incremento en la excreción urinaria de sulfato contribuye a la formación de cálculos cálcicos, mientras que el incremento en la excreción urinaria de amonio a la formación de cálculos de estruvita y urato ácido de amonio. El objetivo del trabajo fue modificar y validar dos métodos analíticos tradicionales para su cuantificación. Para el primero se modificó el método turbidimétrico de Lundquist y para el segundo se utilizó el método colorimétrico de Berthelot. Los parámetros de validación fueron: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, sensibilidad analítica, efecto matriz, reproducibilidad intermedia, precisión, exactitud y error total.

Ambos métodos son rápidos, sencillos y económicos. El amonio se adapta a criterios de calidad clínicos y el sulfato a criterios químicos.

PALABRAS CLAVES: sulfato- amonio- cuantificación- orina

SUMMARY: *Validation of two methods for the determination of ammonium ion and inorganic sulphate as risk of nephrolithiasis in urine.* The metabolic evaluation of lithiasic patients involves the determination of lithiasic genesis inhibitors and promoters. Among the latter, there are inorganic sulphate and ammonium ions. An increase in the urinary excretion of sulphate contributes to the formation of calcium renal calculi. In the case of ammonium, it promotes the formation of ammonium struvite and ammonium urate acid.

The aim of this study was to modify and validate traditional analytical methods for their quantification. The turbidimetric method of Lundquist was adjusted in order to determine inorganic sulphate ion, and the Berthelot colorimetric method was applied to quantify the ammonium ion.

The validation parameters evaluated were: linearity, limit of detection, limit of quantification, sensitivity, analytical sensitivity,

matrix effect, intermediate reproducibility, precision, accuracy and total error.

Both methods are fast, simple and inexpensive. The range of concentration under study is consistent with the values found in real samples. Moreover, stability was checked and no matrix effect was found. Ammonium fits clinical quality criteria and sulphate, the chemical criteria.

KEY WORDS: sulphate- ammonium- determination- urine

Introducción

Los factores de riesgo responsables de la formación de cálculos renales se dividen en:

factores metabólicos: incluyen las concentraciones urinarias de calcio, oxalato, ácido úrico, citrato y pH;

factores dietarios: la escasa ingesta de líquidos, el consumo excesivo de sal, carnes rojas, entre otros, contribuyen a incrementar el riesgo de urolitiasis;

factores fisicoquímicos: representados por la saturación de la orina en diversas sales que originan la matriz de los cálculos, entre otros, oxalato de calcio, brushita (CaHPO_4), urato ácido de sodio, estruvita (MgNH_4PO_4) y ácido úrico (1, 2 y 3).

La evaluación metabólica del paciente litiásico implica la determinación de inhibidores y promotores de la litogénesis. Se realizan en la orina y en la sangre, entre otras, las siguientes determinaciones bioquímicas: ácido úrico, sulfato, fosfato, amonio, calcio, magnesio, citrato, oxalato, creatinina, pH, sodio, potasio, cloruros. Esto permite realizar un diagnóstico de la magnitud de sus alteraciones, así como también evaluar la función renal. Los programas informáticos que calculan el riesgo litogé-

nico urinario requieren de la cuantificación de estos analitos.

El incremento en la excreción de sulfato por vía renal podría contribuir a la formación de cálculos de CaSO_4 (muy poco frecuentes), pero indirectamente también favorece la formación de otros cálculos cálcicos. Elevados contenidos de sulfato urinario sugieren dietas con una alta carga ácida, que ocasionan hipocitraturia compensadora. Al disminuir el citrato urinario, el calcio no podrá unirse a este anión con el cuál forma sales solubles aumentando el riesgo de litiasis cálcica (4 y 5).

Por otro lado, el amonio forma parte de la matriz de cálculos como la estruvita y urato ácido de amonio. Los primeros se forman cuando la orina está sobresaturada de fosfato amónico magnésico, para lo cual se requieren altos niveles de amonio y además orinas muy alcalinas. La urea se desdobra en amoníaco y dióxido de carbono, a su vez el amoníaco es hidrolizado produciendo amonio e hidróxido lo que lleva a la combinación patológica de una orina alcalina con altas concentraciones de amonio, que, si está sobresaturada con respecto a fosfato amónico magnésico, contribuye a la rápida formación y crecimiento de cálculos de

estruvita. Si bien la hiperuricosuria y el pH urinario ácido (pH=5) promueven la nucleación de cristales de ácido úrico insoluble, es necesario destacar que a pH por encima de 6 el ácido úrico se encuentra disociado y la presencia de otros cationes como el sodio y más aún el amonio disminuyen la solubilidad del urato, propiciando la formación de cálculos de urato ácido de sodio y amonio.

Para la cuantificación de sulfato inorgánico y amonio urinarios no se disponen de equipos comerciales específicos, lo que llevó a investigar en la bibliografía las metodologías que se pudiesen aplicar.

En el presente trabajo se modificaron y validaron dos métodos analíticos tradicionales para la cuantificación de sulfato inorgánico y de ion amonio en orina. Para el primero se utilizó el método publicado en 1980 por Lundquist, P. (6) en el que se modificó el agente estabilizante. Para la cuantificación del ion amonio se utilizó parte de los reactivos provistos en el kit comercial de determinación de urea basada en el método de M. Berthelot (7 y 8). Ambos métodos fueron validados según normas IUPAC (9).

Materiales y métodos

Reactivos: Cloruro de bario dihidratado, ácido tricloroacético y ácido clorhídrico concentrado marca Cicarelli, Argentina. Gelatina y Timol marca Merck, Alemania. Sulfato de amonio marca Biopack, Argentina y kit comercial "Uremia" código 1810055, marca Wiener, Argentina.

Soluciones de trabajo: Solución patrón de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1000 mM) preparado a partir de droga sólida en agua miliQ.

Solución de ácido tricloroacético (TCA) al 8% m/v en agua miliQ.

Reactivo de gelatina+bario (RG): se disolvió 1 g de gelatina y 0,1 g de timol en

200 mL de agua miliQ a 60°C. Se agitó y se filtró. Se añadió 2,34 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y se agitó.

Reactivo A: fenol (concentración final: 532 mM) y nitroferricianuro de sodio (concentración final: 0,85 mM).

Reactivo B: hipoclorito de sodio (concentración final: 36,6 mM) e hidróxido de sodio (concentración final: 0,625 mM).

Muestras: Se tomaron muestras de orina de pacientes sanos, con sedimentos urinarios normales. Se centrifugaron 10 mL de cada una a 1500 rpm en tubos de centrifuga con tapa a rosca durante 5 minutos.

Determinación de sulfato inorgánico: con los sobrenadantes se prepararon dos mezclas diferentes (rotuladas como: **M1 y M2**). Se acidificaron con HCl hasta pH=2. Se conservaron en tubos con tapa a rosca en el freezer (-18° C).

Determinación de ion amonio: con los sobrenadantes se prepararon dos mezclas diferentes (rotuladas como: **M3 y M4**). Se conservaron en tubos con tapa a rosca en el freezer (-18° C).

Para el estudio de precisión, se fraccionó cada mezcla en volúmenes pequeños, se conservaron a -18° C, descongelando diariamente uno y procesando durante 20 días.

Equipos: Espectrofotómetro marca Metrolab, modelo: 1600 plus, balanza OHAIUS, modelo: Pioneer™.

Software: Planilla de cálculo Excel y programa estadístico Statgraphic Plus 5.1.

Métodos:

Ion sulfato inorgánico: se utilizó el método manual de Lundquist, P. y col. modificado. Se agrega a la solución de testigo o muestra ácido tricloroacético. En caso de observar precipitado en la muestra (debido a la reacción de las proteínas en este ácido),

se centrifuga y se continúa con el sobrenadante. Las condiciones ácidas de la reacción permiten evitar la interferencia del fosfato. Se agrega RG con lo cual el sulfato precipita unido al bario, actuando la gelatina como estabilizante de la suspensión. Se agita con vortex. Se incubaba a temperatura ambiente 10 a 20 minutos y se lee la turbidez a 600 nm.

Ion amonio: se hace reaccionar el ion amonio con fenol e hipoclorito de sodio en medio alcalino produciendo azul de indofenol que se determina colorimétricamente a 540 nm.

Resultados y discusión

Cuando se modifica o adapta un método analítico, su validación es un paso fundamental para asegurar que los resultados obtenidos sean confiables. Los parámetros de validación en este trabajo fueron: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, sensibilidad analí-

tica, reproducibilidad intermedia, precisión, exactitud y error total.

Linealidad:

Para determinar el rango lineal de concentraciones para el ion sulfato inorgánico, se prepararon soluciones patrón de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en un rango de concentraciones entre: 0,0 y 100 mM. Todas las soluciones se procesaron según el método descrito, por triplicado y se midieron las respuestas instrumentales (Turbidez). Con los datos obtenidos se construyó un gráfico de respuesta instrumental versus concentración (Figura 1.A).

En el caso del ion amonio se prepararon soluciones patrón de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en un rango de concentraciones entre 0,0 y 85,0 expresados como $\text{mgN}_2\cdot\text{dL}^{-1}$, todas procesadas según el método descrito, por triplicado. Se registraron las absorbancias de estas soluciones y con estos valores se construyó la gráfica absorbancia versus concentración (Figura 1.B).

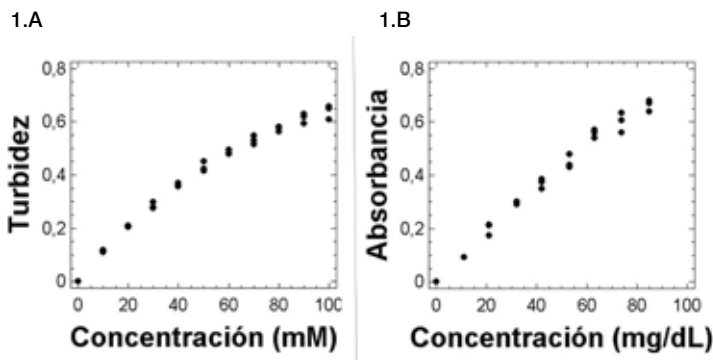


Figura 1. 1.A: Gráfica de turbidez versus concentración de ion sulfato inorgánico (mM). 1.B Gráfica de absorbancia vs concentración de ion amonio ($\text{mgN}_2\cdot\text{dL}^{-1}$).

Estas curvas se estudiaron en primera instancia visualmente y luego estadísticamente mediante un test ANOVA de la regresión. Se encontró que el rango lineal para

el ion sulfato inorgánico está entre 0,0 y 50,0 mM y entre 0,0 y 50,0 $\text{mgN}_2\cdot\text{dL}^{-1}$ para el ion amonio, los estadísticos del ANOVA se muestran en Tabla 1.

Tabla 1. Falta de ajuste de la regresión (ANOVA)

Fuente		Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F _{cal} *	F _{Tab}	P
Ion Sulfato	Falta de ajuste	0,00051	4	0,00017	1,48	2,62	0,279
	Error puro	0,00114	12	0,00011			
Ion Amonio	Falta de ajuste	0,00731	4	0,00122	2,00	2,62	0,125
	Error puro	0,00974	12	0,00061			

* $F_{cal} = (S_{fit})^2 / (S_y)^2$. Para que el modelo sea lineal debe cumplirse: $F_{cal} < F_{Tab(m-2, m-p, \alpha)}$

Dado que el valor de p en la tabla ANOVA es mayor o igual a 0,10, en ambos casos, los modelos se ajustan mediante ecuaciones lineales en los rangos de concentración estudiados.

Al descartar los valores de concentración superiores a 50,0 mM para ion sulfato inorgánico y superiores a 50,0 mgN₂·dL⁻¹ para el ion amonio y aplicar regresión lineal nuevamente en ambos casos, se obtuvieron los siguientes parámetros (Tabla 2):

Tabla 2. Parámetros del Modelo Lineal

Analito	Parámetro	Estimación	SD	R ² (%)	Sfit
Ion sulfato inorgánico	Ordenada (B)	0,02	0,005	99,12	0,01
	Pendiente (A)	0,01	0,001		
Ion Amonio	Ordenada (B)	0,00	0,000	99,85	0,005
	Pendiente (A)	0,01	0,000		

Los gráficos de estas curvas se muestran en la Figura 2 (2.A curva de calibrado del sulfato inorgánico. 2.B curva de calibrado del ion amonio).

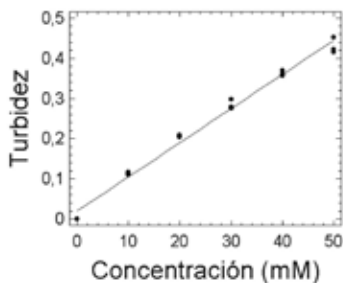


Figura 2.A
Ecuación: $T = 0,02 + 0,01 C_{sulfato}$
Rango lineal: 0,0 a 50,0 mM

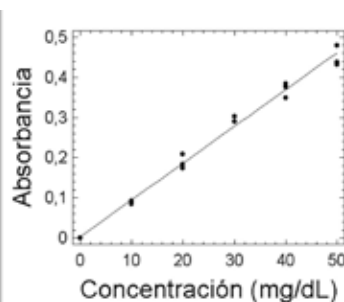


Figura 2.B
Ecuación: $A = 0,00 + 0,01 C_{amonio}$
Rango lineal: 0,0 a 50,0 m/dL

Figura 2. Gráfico de las curvas de calibrado del ion sulfato inorgánico (2.A) y del ion amonio (2.B), ecuaciones y rango lineal correspondientes.

En los gráficos de ambas curvas de calibrado se observa diferente dispersión en los grupos de puntos. Por esta razón primeramente se estudió la normalidad de cada grupo de datos (valores de absorbancias y/o turbidez para cada valor de concentración) tanto para la curva de sulfato como para la del ion amonio. Se calcularon los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados. Todos los valores de estos coeficientes resultaron comprendidos en un rango entre 2 y -2, valores esperados para datos de distribuciones normales. De esta manera se probó la normalidad de los datos.

A continuación se realizaron los siguientes test para Contraste de Varianzas:

Para Sulfato:

Contraste C de Cochran: 0,638079
valor-p = 0,0372581

Contraste de Bartlett: 2,88732 valor-p = 0,0587197

Test de Levene: 0,795183 valor-p = 0,57347

El test de Levene, comprueba la hipótesis nula de que la desviación típica dentro de cada grupo de datos es la misma. Dado que el menor de los p-valores es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones típicas para un nivel de confianza del 95,0%. Esto infringe una de las asunciones importantes que subyacen en el análisis de la varianza e invalidará los tests estadísticos estándar. Por esta razón se estudió grupo por grupo, tomando como referencia la varianza de los datos para la menor concentración. Se aplico: contrastes para el cociente de

varianzas de muestras normales. Se calculó $F = S_1^2 / S_2^2$ y se planteó:

$$H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

Si $F_{calculada}$ es mayor que $F_{tabulada}$ se rechaza la hipótesis nula, en favor de la hipótesis alternativa. En nuestro caso resultado que la varianza del último grupo de datos (50 mM) es diferente a las demás varianzas. Este punto de la curva no debe considerarse al momento de predecir las muestras.

Para el ion amonio se aplicaron las mismas pruebas estadísticas para el contraste de varianzas:

Contraste C de Cochran: 0,603077
valor-p = 0,124107

Contraste de Bartlett: 2,0842 valor-p = 0,190374

Test de Levene: 0,862275 valor-p = 0,518684

Los tres valores de p resultaron superiores a 0,05 por lo que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones típicas para un nivel de confianza del 95,0%. Todas estas pruebas se realizaron aplicando el programa estadístico Statgraphic Plus 5.1 (10).

Cifras de mérito:

Se calcularon: Límite de detección (LOD), Límite de cuantificación (LOQ), Sensibilidad (SEN) y Sensibilidad analítica (Υ) según normas IUPAC (9), los resultados de ambos métodos se muestran en Tabla 3.

Tabla 3. Cifras de mérito de ambos métodos

Métodos	LOD	LOQ	SEN	γ
Ion sulfato	2,0 mM	6,1 mM	0,01 mM ⁻¹	9,0 mM ⁻¹
Ion amonio	1,8 mg.dL ⁻¹	5,4 mg.dL ⁻¹	0,01 dL.mg ⁻¹	1,1 dL.mg ⁻¹

Efecto matriz

Se estudió el efecto matriz para comprobar que no existen sustancias en la muestra (orina) que produzcan modificaciones en la señal analítica, se aplicó el método estadístico de comparación de pendientes entre una curva de calibrado y una de adición estándar (11).

Para ion sulfato inorgánico: se prepararon: a) una curva de calibrado con solución patrón de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y b) una curva de adición estándar de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con el agregado de cantidades iguales del sobrenadante de orina acidificada M1 a cada solución. Las concentraciones de los patrones fueron: 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 y 25,0 mM. Todas las soluciones se prepararon por triplicado. Las curvas se graficaron juntas y se muestran en la Figura 3.A.

Para el ion amonio: también se preparó una curva de calibrado y una de adición estándar, agregando cantidades iguales del sobrenadante de orina M3 a cada solución. Las concentraciones de los patrones fueron: 5,0; 10,0 y 20,0 mgN₂.dL⁻¹. Todas las soluciones se prepararon por triplicado. Las curvas se muestran en la Figura 3.B.

Se aplicó un test estadístico F para comparación de pendientes, obteniéndose los siguientes valores: para ion sulfato inorgánico: $F = 0,07$ y $p = 0,7884$ y para ion amonio inorgánico: $F = 0,01$ y $p = 0,9314$. Dado que en ambos casos el valor-p es mayor o igual a 0,10, no hay diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes con un nivel de confianza del 90% o superior; lo que implica que no hay efecto matriz.

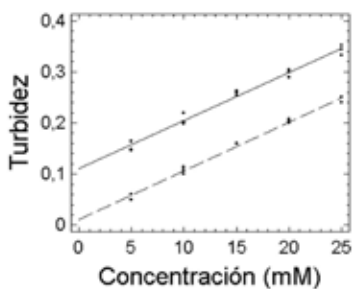


Figura 3.A

Línea cortada: curva de calibrado
Línea llena: curva de adición estándar

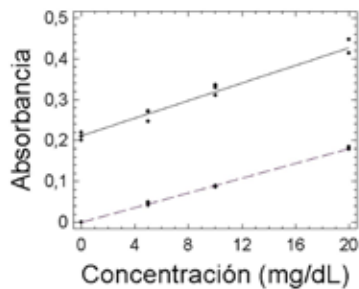


Figura 3.B

Línea cortada: curva de calibrado
Línea llena: curva de adición estándar

Figura 3. 3.A Curvas de calibrado y adición estándar para el ion sulfato inorgánico, 3.B Curvas de calibrado y adición estándar para el ion amonio inorgánico.

Reproducibilidad intermedia

Para el estudio de la reproducibilidad intermedia se tomó una solución testigo de 10,0 mM de ion sulfato inorgánico y otra de 30,6 mgN₂.dL⁻¹ de ion amonio. El mismo operador, en las mismas condiciones, procesó por triplicado cada 7 días, durante

cuatro semanas las mismas muestras. Estas fueron conservadas en refrigeración tapadas herméticamente, y, en el caso del amonio, sin espacio de cabeza. Los resultados de las predicciones se muestran en Tabla 4.

Tabla 4: Resultados de las concentraciones predichas de una solución testigo de 10,0 mM de ion sulfato inorgánico y otra de 30,6 mgN₂.dL⁻¹ de ion amonio, procesadas durante 4 semanas consecutivas.

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Ion sulfato inorgánico	Concentración predicha (mM)			
Solución patrón de 10,0mM	10,7	10,0	10,0	10,8
	11,9	10,5	10,4	9,9
	11,9	11,2	10,4	10,1
Ion amonio	Concentración predicha (mg.dL⁻¹)			
Solución patrón de 30,6 mgN₂.dL⁻¹	35,8	33,6	37,3	34,9
	34,0	34,6	35,5	35,6
	34,9	34,5	34,7	34,3

Se planteó en cada caso un test de comparación de medias para las diferentes semanas, obteniéndose para los valores de concentración de ion sulfato inorgánico un valor de $p=0,0684$ y para las concentraciones de ion amonio un $p=0,2721$. Puesto que el valor-p del test F, en ambos casos, es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias a un 95,0% de confianza confirmando la reproducibilidad intermedia en ambos métodos.

Precisión (SD, CV)

Se evaluó mediante la medida de la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV). Para ello, se predijo 10 veces la concentración de ion sulfato inorgánico y de ion amonio en M1, M2 y M3, M4 respectivamente (Tabla 6).

Exactitud

Se utilizaron las mezclas de orina M1 y M2 (sulfato inorgánico), M3 y M4 (amonio) realizando 10 determinaciones en cada mezcla. Las mismas se remitieron a laboratorios externos donde fueron procesadas por métodos comparativos (amonio: reacción enzimática-UV, sulfato: turbidimetría). Las mezclas fueron conservadas en las mismas condiciones que aquellas que fueron derivadas (refrigeradas) y se procesaron en el mismo día en ambos laboratorios (el de comparación y el de evaluación).

Luego de comprobar que los valores obtenidos pertenecen a distribuciones normales, se aplicó la prueba t de Student tomando como parámetros los valores remitidos (μ) por el laboratorio de referencia. Para un nivel de confianza del 95% el valor de $t_{\text{crítico}} = 2,262$, los valores de $t_{\text{calculado}}$ se presentan en la Tabla 5.

En todos los casos el $t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$ por lo cual los resultados obtenidos para ambos métodos son comparables.

Tabla 5: Evaluación la exactitud

Analito	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{calculado}}$
Ion Sulfato inorgánico	M_1 0,050	M_2 0,243
Ion Amonio	M_3 0,000	M_4 0,126

Error Total (ET):

El error total de un procedimiento analítico es la suma de un componente de error sistemático (expresado por el sesgo o BIAS) y otro aleatorio (expresado por la desviación estándar o coeficiente de variación). (12)

Se calculó el ET para un grado de confianza del 95%, utilizando la Ecuación 1.

$ET (\%) = BIAS (\%) + 1,65 CV (\%)$
(Ecuación 1)

En la Tabla 6 se muestran los resultados de SD, CV, ET, BIAS obtenidos para ambos analitos.

Tabla 6. Resultados de las muestras analizadas por el laboratorio de la UNL y el laboratorio externo, y parámetros de calidad: SD, CV, ET y BIAS.

Ion sulfato inorgánico						
Muestra	Laboratorio	Media (mM)	SD	CV%	BIAS%	ET (%)
M1	FBCB	37,7	1,9	5,0	0,8	9,1
	Externo	38,0	0,7	1,8		
M2	FBCB	52,0	1,3	2,5	2	6,1
	Externo	51,0	0,9	1,7		
Ion amonio						
Muestra	Laboratorio	Media (mg.dL ⁻¹)	SD	CV%	BIAS%	ET (%)
M3	FBCB	20,0	2,0	10,0	0,0	16,5
	Externo	20,0	0,5	2,5		
M4	FBCB	54,7	3,0	5,5	2,2	11,3
	Externo	53,5	0,8	1,4		

Se consideró "criterio de aceptabilidad" el valor de error total que se admite, sin afectar o limitar el uso e interpretación de un resultado del análisis clínico (13). Para la determinación de amonio en orina se tomó como requerimiento de calidad de error total permitido el basado en "Variación Biológica Nivel deseable" donde se establece Bias= 9,2%, CV= 12,4% y ETp= 29,6%; se encontró que los ET obtenidos para ambos

niveles de concentración de amonio son aceptables para el requerimiento de calidad clínico seleccionado.

Para sulfato en cambio, no se han publicado criterios clínicos de calidad, pero al ser el ET menor al 10% (para un intervalo de confianza del 95%) también se puede considerar aceptable desde el punto de vista químico (IUPAC).

Conclusiones

Se pudieron validar los métodos propuestos. El rango de trabajo se adapta a las concentraciones de muestras reales. Las curvas de adición muestran que la matriz orina no produce interferencias y que es posible usar sulfato de amonio en solución acuosa como patrón. Ambos métodos se adaptan a criterios de calidad clínicos para amonio y químicos (IUPAC) para sulfato inorgánico.

Los dos permiten la rápida, sencilla y económica determinación de sulfato y amonio en muestras de orina. En el caso de ion amonio inorgánico, se demostró que se puede emplear un kit comercial y para el ion sulfato inorgánico, la modificación introducida (agregado de reactivo de gelatina) permitió estabilizar la suspensión de sulfato de bario, mejorando la reproducibilidad de los resultados.

Proyecto financiado por la Universidad Nacional del Litoral, CAI+D 2011: "Aplicación de la electroforesis capilar zonal (ECZ) a la determinación de marcadores bioquímicos de urolitiasis. Determinación de valores de referencia para la población de Santa Fe." Código de aprobación: 501 201101 00332 LI .

Congresos: El presente trabajo fue parcialmente presentado en forma de poster en el "III Congreso Bioquímico del Litoral. 2015", títulos: "Determinación de amonio en orina. Validación del método" y "Validación de un método turbidimétrico para la determinación de sulfato en orina".

Bibliografía

1. Pack, Ch.; Skuela, C.; Harvey, J., 1985. Graphic display of urinary risk factors for renal stone formation. *The Journal Urology*. **134** (1): 72-78.
2. Tobilli, Jorge E.; Ghirlanda, Juan M.; Gigler Carlos, 1996. "Litiasis Renal". 1º Edición, Ed. El Ateneo (Buenos Aires).132-154.
3. Millán-Rodríguez, F.; Gracia-García, S.; Sánchez-Martín, F. M.; Angerri-Feu, O.; Rosaud-Barón, F.; Villavicencio-Mavrich, H., 2011. Un nuevo enfoque en el análisis de la litiasis urinaria en función de la combinación de sus componentes: experiencia con 7.949 casos. *Actas Urológicas Españolas*. **35** (3): 138-143.
4. Orozco, R.; Camaggi, C., 2010. Evaluación Metabólica y Nutrición en Litiasis Renal. *Rev. Med. Clin. Condes*. **21**(4): 567-577.
5. Salha Villanueva, J.; Medina Escobedo, M.; Arcos Díaz, A.; Martín Soberanis, G., 2007. Excreción de oxalatos y citratos en pacientes adultos con litiasis urinaria. *Bioq., Asoc. MexicanadeBioq. Clínica A.C.* **32** (004): 134-140.
6. Lundquist, P.; Martensson, J.; Sorbo, B.; Ohman, S., 1980. Turbidimetry of inorganic sulfate, ester sulfate, and total sulfur in urine. *Clin. Chem.* **26**(8): 1178-1181.
7. Searcy, R.L.; Gough, G.S.;Korotzer, J.L.; Bergquist, L.M., 1961. Evaluation of a new technique for estimation of urea nitrogen in serum. *The American Journal of Medical Technology*, **27**:255-262.
8. Fawcett, J. K.; Scott, J. E., 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Path.* **13**: 156-157.
9. Thompson, Michael; Stephen, L. R.; Wood, Ellison; Wood Roger, 2002. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, **74**(5), 835-855. © 2002 IUPAC. <http://www.iupac.org/publications/pac/74/5/0835/>.