



# Desarrollo y validación de un biosensor biparamétrico de urea y creatinina para la monitorización de la sesión de hemodiálisis

J. Almirall, M. Jurkiewicz\*, S. Alegret\*, E. Fábregas-Martínez\* y M. García

Unitat de Nefrologia. Corporació Sanitària Parc Taulí. Sabadell. \*Departamento de Química. Grupo Sensores y Biosensores. Universidad Autónoma de Barcelona.

## RESUMEN

Conseguir adecuar la dosis de hemodiálisis (HD) ha suscitado un creciente interés dadas las repercusiones clínicas y económicas que ello comporta. Las aproximaciones clásicas al Kt/V están sujetas a importantes imprecisiones y errores. La reciente disponibilidad de los biosensores (BS) ha facilitado esta cuantificación, permitiendo monitorizar «on-line» la eliminación de la urea a lo largo de la sesión de diálisis. Sin embargo, la urea no es «per se» ni el único ni el más importante de los metabolitos responsable de las manifestaciones clínicas de los pacientes. La tendencia actual es la de utilizar técnicas de diálisis cada vez más eficaces y membranas de mayor superficie y permeabilidad. Es por este motivo que en el futuro, la monitorización simultánea de otros solutos de distinto peso molecular pueda aportar información relevante. En el presente trabajo describimos el desarrollo y validación analítica de un nuevo BS biparamétrico para monitorizar simultáneamente la eliminación de urea y creatinina a lo largo de la sesión de HD.

Se ha utilizado un prototipo de BS biparamétrico desarrollado íntegramente en la Universidad Autónoma de Barcelona (Departamento de Química, grupo Biosensores). Está basado en un sistema de análisis por inyección de flujo (Sistema FIA) que incorpora dos reactores. En uno se ha inmovilizado la encima ureasa y en el otro la encima creatinina deiminasa. Conectado a la salida del dializador realiza de forma automática las determinaciones de la concentración de urea y creatinina, permitiendo calcular la cantidad eliminada de ambos solutos a lo largo de la sesión de HD. Estos resultados se han correlacionado con los métodos clásicos de transferencia de masa de urea y creatinina mediante la recolección en bañera de todo el dializado.

Tras validar el método analítico «off line» mediante determinaciones secuenciales en muestras de líquido de diálisis, se ha procedido a la validación del cálculo de la transferencia de masa de urea y creatinina «on line» a lo largo de 10 sesiones de HD.

Los resultados de las experiencias «off line» mostraron una excelente correlación entre el BS y el laboratorio del hospital, con una R de 0,99 para la urea y 0,98 para la creatinina. En cuanto a las experiencias «on line», el grado de correlación en la transferencia de masa fue de 0,91 para la urea y de 0,97 para la creatinina. Concluimos que este modelo de BS es un instrumento de gran precisión que per-

Recibido: 4-XII-98.

En versión definitiva: 22-III-99.

Aceptado: 23-III-99.

**Correspondencia:** Dr. Jaume Almirall

Unitat de Nefrologia

Corporació Sanitària Parc Taulí

AC 916

08208 Sabadell

mite controlar simultáneamente de forma cómoda y en tiempo real la eliminación de dos solutos (en este caso urea y creatinina) a lo largo de la sesión de HD.

Palabras clave: **Biosensor de creatinina. Biosensor de urea. Diálisis adecuada. Hemodiálisis.**

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A BIPARAMETRIC SENSOR FOR UREA AND CREATININE IN HEMODIALYSIS MONITORING

### SUMMARY

*The optimal dose of dialysis to be delivered is a subject of great interest because of its clinical and economic consequences. The classic Kt/V calculations have important errors, especially in high efficiency dialysis. The development of a urea biosensor has made this monitoring easy. However urea is not the only or the most important metabolite responsible for the symptoms of patients. There is a tendency to improve the dialysis technique, especially by using more biocompatible membranes with greater permeability and larger surface area. Consequently, in the future, monitoring of different molecular weight solutes can offer relevant information. In this article we describe the development and validation of a new biparametric sensor for urea and creatinine in hemodialysis monitoring.*

*This device has been developed entirely at the department of Chemistry of the Autonomous University of Barcelona. The analyser is based on a flow-injection analytical biosystem with two reactors. The enzymes used are creatinine deiminase and urease, which are covalently immobilized on controlled-pore glass beads and on a nylon open tubular reactor respectively. Once connected in the effluent dialysate, it automatically displays the cumulative urea and creatinine removal during the dialysis session.*

*The analytical method was validated off-line by measuring urea and creatinine from discrete effluent samples, after that the system was validated on-line during ten hemodialysis sessions by comparing it with the classical method of collecting all the effluent.*

*The results agree with concurrent analyses using hospital laboratory methods. In the off-line experiments the correlation obtained was 0.99 for urea and 0.98 for creatinine. In the on-line studies, the correlation was 0.91 for urea and 0.97 for creatinine.*

*We conclude that this biparametric sensor is accurate and reliable for the continuous monitoring of urea and creatinine removal during the dialysis session.*

Key words: **Urea sensor. Creatinine sensor. Hemodialysis. Dialysis adequacy.**

### INTRODUCCION

La adecuación de la dosis de HD sigue siendo un tema de gran interés tanto por sus repercusiones clínicas como económicas. Han pasado ya varios años desde que Gotch y Sargent<sup>1</sup> a partir de los resultados del National Cooperative Dialysis Study<sup>2</sup> establecieron por primera vez los límites de la relación existente entre morbilidad y dosis de HD, valorada a través del aclaramiento de urea. Las fórmulas empleadas para estos cálculos son complejas, haciéndolas poco

prácticas para la prescripción habitual. Para ello se han desarrollado diversas fórmulas simplificadas<sup>3-6</sup> que si bien facilitan la dosificación, están sujetas a importantes imprecisiones y errores, en especial cuando utilizamos sistemas de diálisis de alta eficacia<sup>7-9</sup>.

La determinación directa de los solutos eliminados durante la sesión de HD es uno de los métodos más precisos para cuantificar la dosis de HD, sin embargo, recolectar todo el efluente del líquido de diálisis en una bañera (unos 120 litros por sesión aproximadamente) tiene importantes inconvenientes.

Por este motivo se están desarrollando recientemente diversos instrumentos de cuantificación automática de la eliminación de urea mediante la utilización de los biosensores<sup>10-16</sup>.

Sin embargo, aunque la urea ha sido el parámetro bioquímico más utilizado para el seguimiento clínico de los pacientes (fue el primero y el de más fácil determinación), en realidad su correlación con el estado «urémico» de los pacientes no es intensa. Estas discordancias son especialmente evidentes cuando comparamos el estado clínico y los Kt/V obtenidos mediante dos técnicas dialíticas distintas como son la hemodiálisis y la diálisis peritoneal. Lógicamente otros productos del catabolismo, todavía mal definidos, juegan un papel mucho más importante para explicar la sintomatología de los pacientes.

Si hace unos años se hizo evidente que el modelo monocompartmental de distribución de la urea no se ajustaba a la realidad, siendo tanto más evidente cuando más eficaz era la HD, en la medida que la HD progresa tecnológicamente introduciendo mejoras que aumentan significativamente el aclaramiento de solutos de distintos tamaños moleculares, especialmente con la incorporación de nuevas membranas de gran superficie y permeabilidad, es posible que los aclaramientos de urea aislados tampoco expliquen totalmente la realidad clínica de los pacientes. Es por tanto probable que en el futuro debamos considerar el desarrollo de herramientas de control capaces de monitorizar simultáneamente más de un parámetro dialítico.

En el presente trabajo describimos el desarrollo y validación de un prototipo de BS biparamétrico capaz de monitorizar simultáneamente la eliminación de dos solutos (urea y creatinina) a lo largo de la sesión de HD. Confirmamos su correcto funcionamiento y validamos su exactitud analítica. El desarrollo de sistemas analíticos automáticos capaces de monitorizar solutos de mayor peso molecular nos pueden ayudar a conseguir «adecuar» de forma óptima tratamientos dialíticos cada vez más eficaces.

## MATERIAL Y METODOS

### Tecnología

Se ha desarrollado un BS capaz de cuantificar simultáneamente la eliminación de urea y creatinina a lo largo de la sesión de HD. El sistema realiza todas las etapas del proceso: desde la toma de muestras, transporte y tratamiento de las mismas, medición y procesamiento de la señal analítica y obtención e interpretación de la información de forma totalmente automática. Como características técnicas, el sistema

permite realizar un gran número de determinaciones, obteniéndose la información en tiempo cuasi real.

Se han optimizado los reactivos, consiguiendo que su coste no sea limitante. Todo el procedimiento está controlado por un ordenador personal que mediante un programa específico regula el sistema de inyección de flujo, recibe y procesa las señales y analiza y muestra los resultados. El sistema analítico está constituido por dos reactores que incorporan ureasa y creatinina deiminasa respectivamente. Dichos encimas se encuentran inmovilizados covalentemente, el primero en un tubo de nylon y el segundo en microesferas de cristal. La utilización de encimas inmovilizados en fase sólida permite el uso repetido de dicho encima y la automatización analítica de todo el proceso. Dichos reactores han sido optimizados para obtener el máximo rendimiento sin alterar su exactitud analítica. Dado que el diseño está en fase de prototipo no existe un estudio económico preciso sobre el coste que representa su implementación a la práctica diaria. De forma aproximada se consumen unas 60 pesetas por diálisis del reactor de ureasa, siendo el consumo del reactor de creatinina deiminasa unas 8 veces más caro.

Mediante dos bombas peristálticas de tres canales de alta precisión y dos válvulas, el equipo impele de forma alternativa las muestras a través de los reactores. En el reactor encimático de ureasa la urea se hidroliza en bicarbonato e ión amonio; en el caso de la creatinina, ésta se hidroliza en el reactor que contiene el encima creatinina deiminasa en N-met-hildidantoina e ión amonio, por tanto en el analizador se forman dos segmentos separados de ión amonio cuya concentración es proporcional a la concentración de urea y creatinina de las muestras. Estas muestras son transportadas a una cámara que contiene una membrana de difusión de gases para eliminar posibles contaminantes. Finalmente la solución es conducida a un sensor potenciométrico selectivo a ión amonio cuya señal será procesada para obtener las determinaciones.

### Validación del sistema

En la figura 1 se producen las gráficas de calibración para la urea y la creatinina. En el eje X se representa en escala logarítmica la concentración del analito en estudio (urea y creatinina). En el eje Y se representa el potencial eléctrico proporcionado por el sensor en unidades de milivoltio. Para el desarrollo de estas curvas de calibración se han utilizado estándares de urea y creatinina de concentración perfectamente conocida. Observamos el patrón perfectamente lineal obtenido en los rangos estudiados. La reproductibilidad del sistema fue muy buena con una desviación estándar

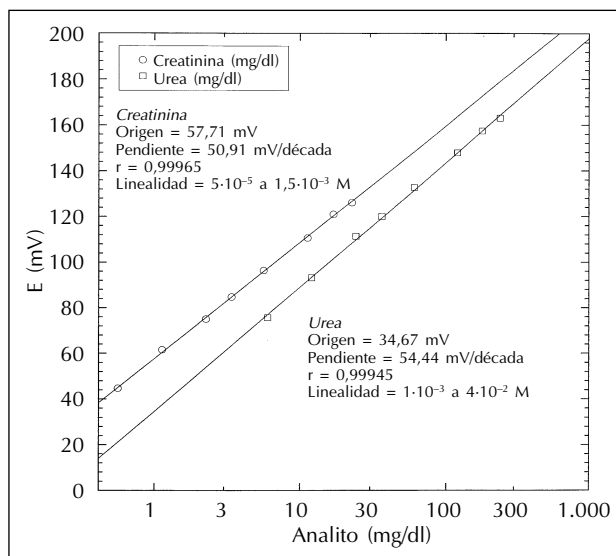


Fig. 1.—Gráficas de calibración obtenidas para la urea y la creatinina. En el eje X se representa en escala logarítmica la concentración del analito en estudio (urea y creatinina). En el eje Y se representa el potencial eléctrico proporcionado por el sensor en unidades de milivoltio. Para el desarrollo de estas curvas de calibración se han utilizado estándares de urea y creatinina de concentración perfectamente conocida.

dar observada del 0,9% para la urea y del 1,2% para la creatinina tras inyectar 25 veces la misma muestra.

Se han realizado dos tipos de experiencias. En primer lugar se ha comprobado la exactitud analítica mediante el análisis «off-line» de muestras aisladas. En segundo lugar se valida «on-line» el funcionamiento del BS tras conectarlo al equipo de hemodiálisis.

a) Validación «off-line»: se tomaron muestras del líquido de diálisis cada 15 minutos (total 13 muestras) a lo largo de una sesión de diálisis, que se repartieron en 2 alícuotas destinando una para determinación de urea y creatinina mediante el BS y la otra analizada en el laboratorio del hospital (método espectrofotométrico ureasa-GIDH para la determinación de urea y mediante el método de la reacción de Jaffe para la creatinina).

b) Validación «on-line»: tras conectar el BS a la salida del líquido de HD mediante un tubo con «t» se ha procedido a realizar el estudio en 10 sesiones de diálisis. Se ha utilizado un monitor de la casa Fresenius modelo 4008-E. Dicho monitor funciona con flujo continuo a 500 cc x minuto (dicho flujo se confirmó mediante la utilización de un caudalímetro).

Las 10 sesiones se han practicado en 4 pacientes que realizaban 3 horas por sesión de diálisis. El BS se ha programado para realizar las determinaciones cada 7 minutos. Tras confirmar que las determinaciones obtenidas a lo largo de la sesión de HD se ajustan a una

función exponencial, el cálculo de la transferencia de masa de urea y creatinina mediante el BS se realiza mediante la integral de esta función. Los valores obtenidos se han correlacionado con el método clásico del cálculo de la transferencia de masa para la urea y la creatinina mediante la recolección en bañera de todo el líquido de diálisis según la siguiente fórmula:

$$\text{Gr U} = [(U \text{ mg/dl} \times \text{Volumen líquido diálisis (dl)})/1.000]$$

### Estudio estadístico

Los resultados vienen expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. En la comparación de resultados se ha utilizado la *t* de Student, estableciéndose como significativa una  $p < 0,05$ . Asimismo se han calculado los coeficientes de correlación y se han estimado los coeficientes de las rectas de regresión aportando información sobre la ordenada, pendiente y coeficiente de regresión.

## RESULTADOS

### Experiencias «off-line»

En las figuras 2 y 3 vienen representadas las curvas de correlación de las concentraciones de urea y creatinina determinadas mediante el BS y el laboratorio del hospital. Se obtiene una R de 0,99 para la

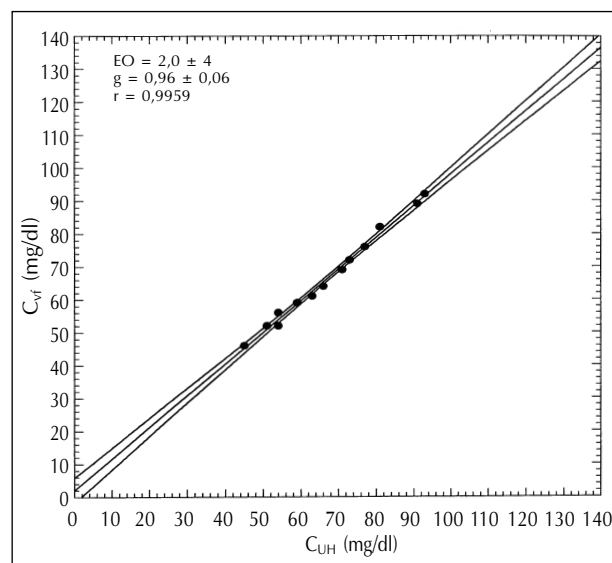


Fig. 2.—Curva de correlación de las concentraciones de urea determinadas en líquidos de hemodiálisis con el biosensor ( $C_v$ ) frente a las obtenidas en el laboratorio del hospital ( $C_U$ ).

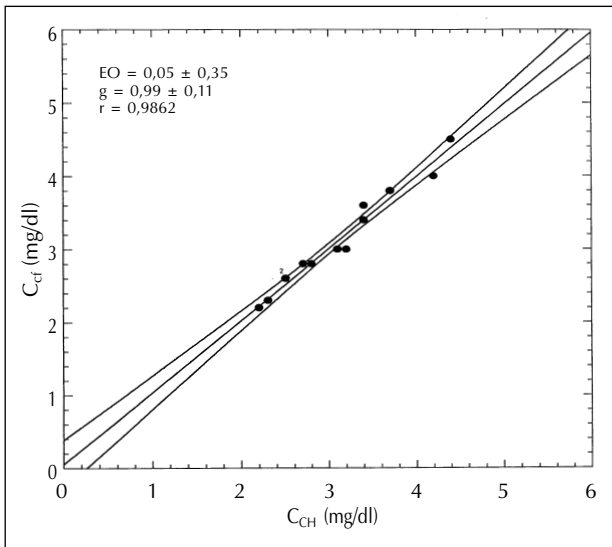


Fig. 3.—Curva de correlación de las concentraciones de creatinina determinadas en líquidos de hemodiálisis con el biosensor (CCF) frente a las obtenidas en el laboratorio del hospital (CCH).

urea y 0,98 para la creatinina. Los resultados de estas experiencias indican que no se encuentran diferencias significativas al 95% de confianza entre los resultados del BS y el laboratorio del hospital. La correlación es excelente ya que el valor 0 está incluido en el intervalo de incertidumbre de la ordenada en el origen de las curvas de correlación lineal y el valor uno está incluido en el intervalo de incertidumbre de la pendiente de las curvas de correlación.

**Validación «on-line»**

En la tabla I vienen referenciados los resultados obtenidos del cálculo de la transferencia de masa de urea y creatinina mediante el BS y la recolección de todo el efluente analizado en el laboratorio del hospital. Observamos que no existen diferencias entre los dos métodos con unos valores de  $35,8 \pm 4$  vs  $35,7 \pm 3,1$  g para la urea y  $1,4 \pm 0,27$  vs  $1,37 \pm 0,28$  g para la creatinina (p NS) con una R de 0,91 y 0,97 para la urea y creatinina respectivamente. En las figuras 4 y 5 viene representada gráficamente una

**Tabla I.** Resultados obtenidos en las experiencias on-line

|       | gUF  | gUH  | gCF  | gCH  |
|-------|------|------|------|------|
| 1     | 37,7 | 36,0 | 1,4  | 1,5  |
| 2     | 33,1 | 35,3 | 1,9  | 1,9  |
| 3     | 37,9 | 38,0 | 1,7  | 1,7  |
| 4     | 36,8 | 37,0 | 1,1  | 1,1  |
| 5     | 28,4 | 30,6 | 1,4  | 1,3  |
| 6     | 39,9 | 39,0 | 1,4  | 1,5  |
| 7     | 42,6 | 40,9 | 1,2  | 1,2  |
| 8     | 33,9 | 32,0 | 1,4  | 1,4  |
| 9     | 32,3 | 34,4 | 0,9  | 1,0  |
| 10    | 35,7 | 34,2 | 1,3  | 1,3  |
| media | 35,8 | 35,7 | 1,4  | 1,37 |
| DE    | 4,08 | 3,14 | 0,27 | 0,28 |

gUF: gramos de urea determinados con el biosensor; gUH: gramos de urea determinados en el laboratorio del hospital; gCF: gramos de creatinina determinados con el biosensor; gCH gramos de creatinina determinados en el laboratorio del hospital; DE: desviación estándar.

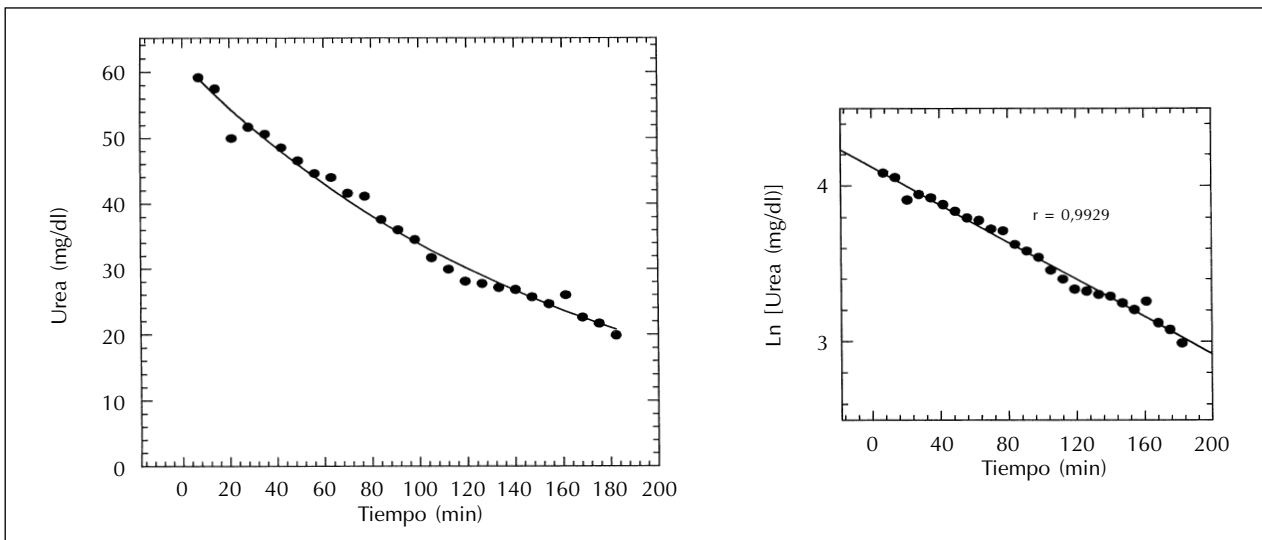


Fig. 4.—Resultados de la monitorización «on line» de urea durante una sesión de hemodiálisis mediante el biosensor biparamétrico desarrollado. Ajuste a una función exponencial decreciente. Ajuste del logaritmo neperiano a una función lineal.

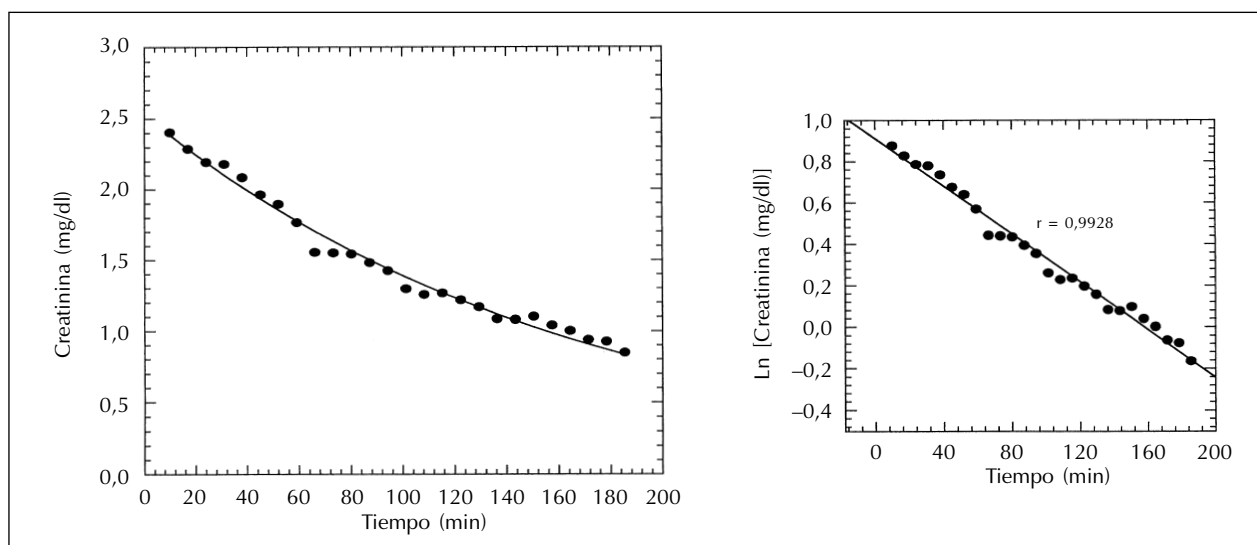


Fig. 5.—Resultados de la monitorización «on line» de creatinina durante una sesión de hemodiálisis mediante el biosensor bioparamétrico desarrollado. Ajuste a una función exponencial decreciente. Ajuste del logaritmo neperiano a una función lineal.

de las experiencias comprobándose el ajuste a una función exponencial decreciente y su función lineal en el logaritmo neperiano.

## DISCUSIÓN

El creciente interés en obtener unos tratamientos dialíticos óptimos (mayores capacidades de aclaramiento de solutos) y una mayor confortabilidad para el paciente (mejor tolerancia clínica y mínimo tiempo en diálisis) nos obligará a disponer de sistemas de control del tratamiento administrado cada vez más sofisticados. Fueron Gotch y Sargent<sup>1</sup> a partir de los resultados del National Cooperative Dialysis Study<sup>2</sup> quienes establecieron por primera vez los límites de la relación existente entre morbilidad y dosis de HD, valorada a través del aclaramiento de urea. Las fórmulas empleadas para estos cálculos son complejas, haciéndolas poco prácticas para la prescripción habitual. Para ello se han desarrollado diversas fórmulas simplificadas<sup>3-6</sup> que si bien facilitan la dosificación, están sujetas a importantes imprecisiones y errores. Estos errores son especialmente notables cuando utilizamos sistemas de diálisis de alta eficacia<sup>7-9</sup> debido en general a problemas de recirculación sanguínea por fístulas arteriovenosas insuficientes o por el fenómeno del «rebote».

La determinación directa de los solutos eliminados durante la sesión de HD es uno de los métodos más precisos para cuantificar la dosis de HD, sin embargo, recolectar todo el efluente del líquido de

diálisis tiene serios inconvenientes. Recientemente se han desarrollado instrumentos que de forma automática cuantifican la urea eliminada a lo largo de la sesión de HD. Dichos sistemas, denominados biosensores, facilitan de forma considerable la cuantificación de la dosis de diálisis<sup>10-16</sup>.

Sin embargo, aunque la urea ha sido tradicionalmente el parámetro bioquímico más utilizado para el seguimiento clínico de los pacientes, la insuficiencia renal comporta la acumulación de otros productos derivados del catabolismo, responsables en gran medida de la clínica urémica. Estas discordancias son especialmente evidentes cuando comparamos el estado clínico y los Kt/V obtenidos mediante dos técnicas dialíticas distintas como son la hemodiálisis y la diálisis peritoneal. Lógicamente otros productos del catabolismo (todavía mal definidos) juegan un papel mucho más importante para explicar la sintomatología de los pacientes.

La utilización de técnicas de diálisis más eficaces, con capacidad de mejorar el aclaramiento de sustancias de mayor peso molecular, puede hacer todavía más notable estas discrepancias. Es posible que en el futuro debamos considerar el desarrollo de herramientas de control capaces de monitorizar simultáneamente más de un parámetro dialítico.

En el presente trabajo se describe el primer desarrollo de un prototipo de biosensor de estas características. Una vez conectado a la salida del dializador es capaz de determinar simultáneamente y de forma totalmente automática la transferencia de masa de urea y creatinina. Demostramos su correc-

to funcionamiento y validamos su exactitud analítica, obteniendo unas correlaciones excelentes con los resultados obtenidos mediante los sistemas convencionales. Es posible que en el futuro, el desarrollo de sistemas analíticos automáticos capaces de monitorizar solutos de mayor peso molecular nos ayuden a conseguir «adecuar» de forma óptima tratamientos dialíticos cada vez más eficaces.

### Bibliografía

1. Gotch F, Sargent JA: A mechanistic analysis of the National Cooperative Dialysis Study (NCDS). *Kidney Int* 28: 526-534, 1985.
2. Lowrie EG, Laird NM, Parker TF, Sargent JA: Effect of the hemodialysis prescription on patient morbidity: report from the National Cooperative Dialysis Study. *N Engl J Med* 305: 1176-1181, 1981.
3. Jindal KK, Manuel A, Goldstein MB: Percent reduction in blood urea concentration during hemodialysis (PRU). A simple and accurate method to estimate Kt/V urea. *ASAIO Trans* 33: 286-288, 1987.
4. Barth RH: Direct calculation of Kt/V: a simplified approach to monitoring of hemodialysis. *Nephron* 50: 191-155, 1988.
5. Basile C, Casino F, López T: Percent reduction in blood urea concentration during dialysis estimates Kt/V in a simple and accurate way. *Am J Kidney Dis* 15: 40-45, 1990.
6. Daugirdas JT: Linear estimates of variable-volume, single-pool Kt/V: an analysis of error. *Am J Kidney Dis* 122: 267-270, 1993.
7. Pedrini LA, Zareik S, Rasmy S: Causes, kinetics and clinical implications of post-hemodialysis urea rebound. *Kidney Int* 34: 817-824, 1988.
8. Daugirdas JT, Schneditz D: Postdialysis urea rebound: measurement, prediction and effects of regional blood flow. *Dial Transplant* 23: 166-173, 1994.
9. Spiegel DM, Baker PL, Badcock S, Contiguglia R, Klein M: Hemodialysis urea rebound: the effect of increasing dialysis efficiency. *Am J Kidney Dis* 25: 26-29, 1995.
10. Keshaviah P, Satar RA: A new approach to dialysis quantification: an adequacy index based on solute removal. *Sem Dial* 7: 85-90, 1994.
11. Canaud B, Bosch JJ, Leblanc M, Garred LJ, Mion C: Evaluation of high-flux hemodiafiltration efficiency using an on-line urea monitor. *Am J Kidney Dis* 31: 74-80, 1998.
12. Tallón S, Hernández G, Alvarez-Lara MA, Espinosa Pérez R, Martín-Malo A, Aljama P: Monitorización continua de la urea: una nueva alternativa de la prescripción de diálisis. *Nefrología* 14: 678-686, 1994.
13. Jacobs P, Suls J, Sansen W, Hombrouckx R: A disposable urea sensor for continuous monitoring of hemodialysis efficiency. *ASAIO J* 39: 353-358, 1993.
14. Alvarez-Lara MA, Martín-Malo A: Monitorización continua de la dosis de diálisis. *Nefrología* 14: 646-650, 1994.
15. De Francisco ALM, Escallada R, Cobo M, Torrijos J, Rodrigo E, Arias M: Dosis adecuada de diálisis. Aportaciones del control continuo de urea en el ultrafiltrado. *Nefrología* 15: 565-571, 1995.
16. Almirall J, Jurkiewicz M, García M, Solé S, Liesa A, Padilla J, Yuste E, Alegret S, Martínez-Fábregas E: El biosensor de urea: un método útil para la prescripción de la dosis de hemodiálisis. *Nefrología* 16: 524-530, 1996.