

Valores Normales de Nitrógeno Ureico Sérico

DR. EDUARDO VINOCOUR GRANADOS*

INTRODUCCION

La urea es el principal producto de desecho del metabolismo nitrogenado, y por otra parte, siendo su determinación uno de los análisis que con mayor frecuencia se solicita a los laboratorios clínicos, y en ciertos casos con carácter de urgencia, se hace necesario contar con un método rápido, exacto y reproducible.

Los métodos más usados para determinar urea pueden incluirse en dos grupos: los que se basan en la reacción de la diacetil monoxima o reactivos similares, y aquellos que emplean la acción de la ureasa.

Fearon, en 1939 (8), descubrió que la reacción de la diacetil monoxima con radicales del tipo $R_1-NH-CO-NH-R_2$ (R_1 como H o radical alifático simple, y R_2 que no sea un radical acílico), seguida de oxidación, originaba el desarrollo de un color, el cual pudo comprobarse que se producía con urea, metilurea y otros derivados de la misma, alantoína, citrulina y proteínas en general (10). Los colores obtenidos con estos compuestos son variables pero las sustancias con un radical ureido producen un color amarillo. Ormsby en 1942 (15), utilizó esta reacción para determinar específicamente urea sanguínea, calentando la muestra con diacetil monoxima en solución ácida intensificándose por oxidación con persulfato potásico, (9, 11) el color amarillo resultante de la hidroxilamina formada en la reacción. Han sido propuestas modificaciones a este método original (12, 13, 17, 78), que consisten en términos generales en una oxidación de la hidroxilamina conforme ésta se va formando. Natelson et al. (citado en (10)) en vez de diacetil monoxima usan diacetilo, evitando así la formación de hidroxilamina, y prescindiéndose por lo tanto del persulfato de potasio. Se ha comprobado (10), que los resultados obtenidos con esta modificación son altamente variables, lo que indica en dicha reacción la presencia de factores desconocidos hasta el momento. Otros autores han propuesto la reacción de la urea con diacetilo o con diacetil-monoxima en combinación con el ácido N-fenilntranílico, así como con, la alfa-isonitro-propiofenona, la monoxima del acetilo de benzoilo y la heptoxima (1, 2-cicloheptanodiona dioxima) (10).

En relación a los métodos basados en la acción de la ureasa sobre la urea, la principal ventaja que presentan es su alta especificidad. Las pruebas de que se disponen parecen fortalecer la hipótesis de que la ureasa desdobla la urea a ácido carbámico el cual produce directamente CO_2 y NH_3 , sin pasar por la fase de ácido carbónico. La cantidad de urea presente en la muestra puede medirse, ya sea por la determinación gasométrica del CO_2 o bien por la cantidad de

* Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

amoniaco formado, tras la acción de la ureasa. Aquella última sustancia es la que miden la mayoría de las técnicas a base de ureasa.

Existen dos formas para efectuar el procedimiento analítico que nos permite determinar la uremia: Se puede agregar la ureasa a un filtrado desproteinizado a base de ácido tungstico, o bien se agrega a la sangre total o suero, con o sin la adición de un tampón, y una vez que la urea ha sido convertida en amonio, se efectúa la desproteinización (10).

En la reacción entre el amonio y el fenol en presencia de hipoclorito, originando un color azul, se cumplen las siguientes etapas: El NH_3 y el hipoclorito reaccionan, produciendo cloramina; la cloramina reacciona con el fenol para dar quinonacloramina, ésta reacciona con otra molécula de fenol para producir el color amarillo típico del indofenol; finalmente éste en medio alcalino se disocia dando lugar a la aparición del color azul característico. Se ha usado esta reacción para determinar el amonio generado de la urea que está presente en suero, plasma sangre total y orina, utilizando en todos los casos ureasa para hidrolizar la urea (10). De las principales ventajas de esta reacción es la de ser unas 10 veces más sensible al amonio que la nesslerización. También este método ha sido adaptado para su uso en el autoanalizador.

Existe un método semicuantitativo, llamado urograph, de la casa Warner-Chilcott. Se trata de un procedimiento, que es útil solamente como prueba de orientación. Lo mismo podemos decir de las tiras reactivas Azostix de la casa Ames.

El presente trabajo, se ha hecho con el deseo de contribuir a la obtención de valores normales del nitrógeno ureico en nuestro medio, empleándose el método de la diacetil-monoxima, de acuerdo con la reacción de Fearon (8) y las recomendaciones técnicas de Coulombe y Favreau (4), el cual, por otra parte, ha sido adaptado al autoanalizador (14, 15).

MATERIAL Y METODOS

Para realizar el presente trabajo, fueron obtenidos especímenes de suero de estudiantes universitarios del primer ingreso, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 18 y 25 años.

Para la determinación cuantitativa de nitrógeno ureico se empleó el método de la diacetil monoxima que utiliza básicamente la reacción de Fearon (8), con la modificación señalada por Coulombe y Favreau (4) que incluye el uso de la tiosemicarbazida, y también de acuerdo a la preconización técnica introducida por la casa Hycel (3), y algunas ideas analíticas de Ormsby (15), Crocker (6) y Marsh et al. (14), detallándose a continuación el método utilizado.

REACTIVOS:

1. — *Reactivo de Diacetil:*

diacetil-monoxima $\text{CH}_3\text{CNOHCOCH}_3$ al 0.062% y
tiosmicarbazida $\text{NH}_2\text{CSNHNH}_2$ al 0.025% en agua destilada

2. — *Reactivo ácido:*

FeCl_3 al 0.015% en H_3PO_4 al 58%

3. — *Soluciones standard:*

Cinco concentraciones de urea en albúmina al 6%, equivalente a: 0-15-30-45 y 60 mg. de nitrógeno ureico por 100 ml.

Estabilidad de los reactivos:

Set. de estándares: Un año en refrigeración protegidos de contaminación bacteriana.

R. de Diacetil: 1 año en refrigeración.

R. ácido: dos años a temperatura ambiente.

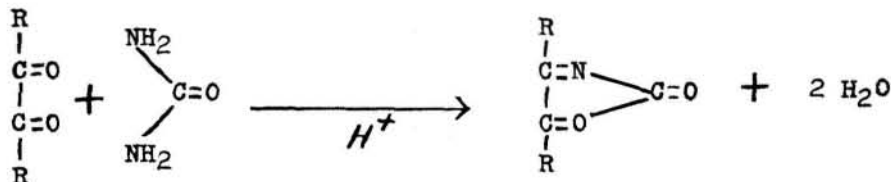
Especificidad de la reacción:

La reacción es específica para urea en fluidos orgánicos en los cuales la citrulina no está presente. La citrulina (que normalmente no se halla en suero o plasma) produce valores falsamente elevados.

La reacción no es afectada por la presencia de alantoína, asparagina, bilirrubina, colesterol, creatinina, creatina, glucosa, vitaminas o electrolitos.

Reacción química:

La determinación está basada sobre la Reacción de Faeron (8):



METODOLOGIA:

A. NITROGENO UREICO SERICO

1. — *Preparación de la curva estandar y del blanco:*

Los estándares comprenden 5 concentraciones equivalentes a: Blanco (0), 15, 30, 45 y 60 mg. por 100 ml. de nitrógeno ureico.

Una curva standard deberá hacerse con cada nuevo lote de reactivos, y deberá repetirse para el chequeo de standard y controles.

Características espectrales:

La curva presenta su pico de máxima absorción a 525 m μ .

Este longitud de onda es aplicable al Coleman Jr., Bauch and Lomb, Spectronic "20" y al Beckman "B".

Características de absorción:

Al graficar absorción contra concentración, no se sigue la ley de Beer y Lambert, presentándose una curva entre 0 y 60 mg%.

Estabilidad de la reacción:

Rutinariamente las lecturas se hacen a los 15 minutos después de enfriar.

Reproducibilidad de la reacción:

Variación diaria durante 10 días:

<i>Standard</i>	<i>Valor promedio</i>	<i>D. S.</i>	<i>% de variación</i>
7.5 mg%	7.9 mg%	± 0.46 mg%	± 6.3%
15 mg%	14.8 mg%	± 0.67 mg%	± 6.7%
45 mg%	44 mg%	± 2.36 mg%	± 8.5%

Porcentaje de recuperación:

<i>Cant. agregada</i>	<i>% recuperado</i>
7.5 mg%	87-93%
15 mg%	85-92%
22.5 mg%	88-91%

Reacción de color:

- En tubos 19 x 150 mm. pipetear 0.1 ml. de suero, estándares y controles directamente en el fondo de los mismos. Usar pipetas de 0.1 ml. calibradas para entregar.
- Agregar 1 ml. reactivo de Diacetyl, directamente en el fondo de cada tubo. Inmediatamente después de cada adición, mezclar por agitación o con un mezclador mecánico.
- Agregar 5 ml. del reactivo ácido directamente en el fondo de cada tubo. Inmediatamente después de cada adición mezclar por agitación fuerte.
- Transferir todos los tubos simultáneamente al baño de agua hirviendo. Asegurarse de que el nivel del agua sobrepase el de los reactivos en los tubos.
Dejar en el baño a ebullición por 12 minutos exactos. El agua deberá hervir de nuevo dentro de 2 minutos después de sumergir los tubos.
- Sacar los tubos del baño a ebullición y sumergirlos en un baño de agua fría por 3 minutos.

Lecturas espectrofotométricas:

- Mezcle el contenido en las cubetas por rotación.
- Lea estándares y desconocidos contra el blanco a 525 mμ.
- Plotée D.O. de los estándares contra concentración sobre un papel para gráficos.
Plotear concentración en las abscisas y D.O. en las ordenadas.
- Obtenga el valor de los controles y desconocidos directamente en la curva.

INSTRUMENTACION

El espectro de la curva muestra su máxima absorción (pico) a 525 mμ. Esta posición es aplicable a la mayoría de los espectrofotómetros. Por lo general los espectrofotómetros dan lecturas de D.O. más altas que los fotómetros de filtros. Los siguientes valores típicos de D.O. indican el efecto de resolución en varios instrumentos. Bajo ninguna circunstancia deberán tomarse estos valores para ser interpretados como correspondientes a una "curva de precalibración de instrumentos". Los instrumentos deberán ser calibrados en cada laboratorio, preferiblemente por la persona o personas que harán las determinaciones.

Instrumentos:	15	30	45	60	mg%
Coleman Jr., 6C (525 mu)	0.155	0.278	0.398	0.480	D.O.
Coleman Jr., II 6/35 (525 mu)	0.188	0.335	0.472	0.570	D.O.
B. & L. Spectronic 20 (525 mu)	0.180	0.320	0.455	0.540	D.O.
Beckman B (525 mu)	0.210	0.370	0.509	0.594	D.O.
Leitz (Nº 520)	0.122	0.204	0.272	0.319	D.O.
Klett (Nº 52)	49	80	108	122	U.K.

Los valores de Leitz pueden ser convertidos de % de transmisión a D.O.

Los valores del Klett son reportados en unidades Klett (éstas pueden ser convertidas en D.O. multiplicando su valor por 2 y dividiendo entre 1.000 por ejemplo $122=0.244$).

3. — *Discusión de la metodología:*

Las condiciones sobre las cuales el color es desarrollado pueden ser controladas evitando variaciones de determinación a determinación. El baño de agua hirviendo deberá estar en ebullición fuerte antes de introducir los tubos. El baño deberá ser de tamaño adecuado para lograr que la temperatura se recupere dentro de dos minutos después de la introducción de los tubos. Si el baño no retorna pronto a la temperatura original, el número de determinaciones en cada grupo deberá ser reducido. El nivel de agua en el baño en ebullición deberá estar a un nivel superior del que presenten los reactivos en los tubos durante la ebullición. Posteriormente al calentamiento, los tubos de reacción deberán de sumergirse en un baño de agua fría por 3 minutos para lograr un enfriamiento completo de la mezcla reactiva, lo que es necesario para la estabilización del color.

Causas de error:

El analista deberá observar las siguientes precauciones básicas: Aunque el reactivo de Diacetyl soporta una exposición prolongada a temperatura ambiente, para un almacenaje máximo es conveniente mantenerlo en refrigeración. La pipeteada de los 0.1 ml. de suero es de suma importancia. Este factor puede ocasionar grandes variaciones en los resultados obtenidos. Se recomienda emplear para el caso, una pipeta de 100 lambdas o bien una de 0.1 ml.

Deben correrse estándares o controles con cada grupo de muestras. Se recomienda para control de los estándares el uso de 15 mg%. Los valores determinados de los controles deberían estar dentro de 15% del valor consignado.

La muestra de suero debe ser depositada en el fondo del tubo. Los reactivos deben ser agregados en el fondo de los tubos y la mezcla de suero y reactivos debe agitarse vigorosamente.

Trás la adición de reactivo ácido, es necesario agitar fuerte y mezclar por completo, para evitar estratificación y, en consecuencia, resultados erróneos. Si se emplea un mezclador mecánico (vortex), el tubo deberá retirarse del mismo a intervalos frecuentes para prevenir formación de capas y mezclas incompletas.

Los sueros hiperlipémicos pueden causar turbiedad en la reacción de color y valores erróneos. Por otra parte (6), se ha señalado que los niveles séricos

de hemoglobina de 50 mg/100 ml. y de bilirrubina de 20 mg/100 ml., no interfieren con esta prueba directa.

En relación a la adición y manipuleo de los reactivos, se recomienda el uso de dispensadores volumétricos, que aseguran un máximo de reproductibilidad.

Recomendaciones sobre muestras controles:

El control de muestras deberá ser de origen humano. Después de agregar agua destilada a los sueros liofilizados, estos se deben dejar en reposo por espacio de 30 minutos, y deberán inspeccionarse con cuidado antes de usarlos evitando la presencia de partículas. Se recomienda que los controles reconstituidos no deben ser empleados por más de 72 horas después de reconstituidos y deben ser guardados en refrigeración de 4 a 10° C durante este tiempo. Las muestras o sueros no deberán ser recongeladas, y la porción descongelada sobrante debe ser descartada.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se indica la distribución de clases y frecuencias de las 409 muestras de suero utilizadas para obtener, en ambos sexos, valores "normales" de nitrógeno ureico.

CUADRO 1

DISTRIBUCION DEL NITROGENO UREICO DE 409 ESTUDIANTES DE PRIMER INGRESO UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Nitrógeno ureico (mg%)	HOMBRES		MUJERES		Distribución porcentual para ambos sexos
	Frecuencia	porcentaje	Frecuencia	porcentaje	
3	—		2	1.1	0.6
4	3	1.3	2	1.1	1.2
5	13	5.7	14	7.7	6.7
6	18	7.9	20	11.1	9.5
7	23	10.1	21	11.6	10.8
8	16	7.0	22	12.1	9.6
9	32	14.0	23	12.7	13.3
10	22	9.7	21	11.6	10.7
11	32	14.0	17	9.4	11.7
12	25	11.0	15	8.3	9.6
13	17	7.5	11	6.1	6.8
14	8	3.5	6	3.3	3.4
15	6	2.6	4	2.2	2.4
16	4	1.8	3	1.7	1.8
17	1	0.4			0.2
18	3	1.3			0.6
20	1	0.4			0.2
21	2	0.9			0.5
29	1	0.4			0.2
34	1	0.4			0.2
	228	100.0	181	100.0	100.0

Nota: En la distribución porcentual para ambos sexos se le dio igual ponderación a cada sexo.

En el cuadro 2 se señalan los valores promedio, las desviaciones estándar y los valores margen del nitrógeno ureico en la población estudiada.

CUADRO 2

VALORES ESTADISTICOS DE LAS 409 MUESTRAS ANALIZADAS
PARA NITROGENO UREICO

	VALORES EN MG. (%)		
	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>	<i>Ambos sexos</i>
Promedio (X)	10.2	9.1	9.6
Desviación estándar (S)	3.8	2.9	3.4
Valores margen (*)	5 a 18	5 a 15	5 a 16

* Los valores margen incluyen el 95% de los datos aproximadamente; excluyen un 2.5% de datos que son extremadamente bajos y un 2.5% de datos que son extremadamente altos.

DISCUSION

Se considera el suero sanguíneo como la muestra biológica ideal para la determinación de las diversas sustancias en química clínica, ya que con su uso se evitan posibles interferencias y variables que pueden sucederse en diversas reacciones químicas por parte de sustancias presentes en los eritrocitos, cuando se utiliza sangre total y, por otra parte, se eluden los posibles problemas derivados del uso de los diferentes anticoagulantes al hacerse uso de plasma.

Para el caso, se ha comprobado que las concentraciones de urea en el plasma y suero y en los eritrocitos son prácticamente iguales (10). Por lo tanto, podrían emplearse plasma, o sangre total, para la determinación de urea sin que por ello se produzcan cambios en los resultados. Estudios (9) acerca de la composición química de la sangre humana indican que los constituyentes del nitrógeno total, el N.N.P. y la glicemia, varían en el mismo individuo de semana a semana, siendo característicamente individual, y a que la suma de las desviaciones promedio de los constituyentes para cada individuo está dado quizá sobre un índice de la estabilidad metabólica del mismo. Asimismo, los valores ligeramente bajos obtenidos en estado de ayuno para el N.N.P., urea y ácido úrico son tomados como expresión de un metabolismo disminuido (9). Por otra parte, la concentración de urea sanguínea de individuos normales sufre una fluctuación en sus valores durante el día y la noche. En general, la concentración de urea sanguínea tiene una tendencia a descender durante la noche y sólo asciende de nuevo durante el siguiente día (13).

En personas normales el N.U. constituye en forma aproximada el 45% del N.N.P., por lo que puede establecerse una proporción constante, dentro de los límites de los valores normales, entre el N.U. y el N.N.P. (7). Cuando patológicamente existe un incremento de N.U., aproximadamente el 86% del aumento del N.N.P. se lleva a cabo a expensas del N.U. a cualquier nivel de la retención nitrogenada. Un incremento de 100 mg. de N.U., corresponde, como promedio, a un incremento de 16 mg. de los compuestos del N.N.P. no urea. Estas simples relaciones indican que en la relación nitrogenada, el N.U. se halla en equilibrio con los otros componentes del N.N.P. (7).

Los valores margen y promedios obtenidos por nosotros en el presente trabajo, de 5 a 18 mg% (10.2 mg%) y de 5 a 15 mg% (9.1 mg%) en hombres y mujeres, respectivamente, nos demuestran que las cifras de N.U. son moderadamente más altas en hombres que en mujeres. Los valores límites o margen considerados como normales, en estado de ayuno, para el N.U. en sangre, varían en forma considerable (1, 5, 9, 11, 13, 17, 18), siendo las cifras límites más generalmente aceptadas, las de 5 a 25 mg/100 ml. (10). Esta amplitud notable para los valores límites, obedece a la acción conjunta de diversas variables, las cuales han de tomarse en consideración cuando se desee decidir si un valor en particular se encuentra dentro de los límites "normales". Las variables que deben tomarse en cuenta son:

1) Sexo. Los valores de N.U. son aproximadamente un 25% mayores en los hombres que en las mujeres (10). 2) Edad. Los niveles de N.U. tienden a incrementarse con la edad (10), principalmente después de los 40 años (12); en los recién nacidos el valor normal parece ser un poco inferior al de los adultos (16). 3) Variaciones diarias. Se observa una disminución de los valores durante la noche y un aumento a través del día (13). 4) Dieta. Ha sido demostrado (1) que el promedio del N.U. oscila desde 9 hasta 21 mg% en condiciones de dieta proteica estandarizada, cuando ésta comprende, de 0.5 hasta 2.5 g. de proteínas por Kg. de peso. Por otra parte, no se observa ningún cambio inmediatamente después de las comidas, ni aún luego de dos horas de la misma (2).

En el presente trabajo se describe y preconiza en detalle un procedimiento directo, manual, para la cuantificación de urea sanguínea, perfectamente adaptable para automatización (14, 15), el cual recientemente ha ido desplazando los métodos tradicionales para estos fines, incluyendo los que utilizan ureasa. El método en cuestión, de la diacetyl monoxima, se basa en la reacción al efecto descrita por Fearon (8). Las modificaciones suscitadas (4, 6, 14, 15), demuestran que cuando la urea es calentada con diacetyl monoxima en solución ácida y cloruro férrico se desarrolla un color amarillo. Muchas sustancias interferentes producen un color "rojo", pero sólo la urea produce un pigmento amarillo, un complejo de alfa-diquetona-urea (4). El método usa tiosemicarbazida como un agente sensibilizante, simplificándose al eliminar la desproteinización. Por otra parte, existe la ventaja que se deriva del incremento de la sensibilidad al combinar el uso del ión férrico y la tiosemicarbazida lo que permite reducir el volumen requerido de suero para cada prueba a 100 microlitros.

Por último, nos proporciona un buen procedimiento para emergencias.

RESUMEN

Se comentan brevemente los diversos procedimientos analíticos que se usan para la determinación del nitrógeno ureico sérico.

Se indican valores normales para el nitrógeno ureico, en población universitaria, de uno y otro sexo, con edades entre 18 y 25 años, empleándose el método de la diacetil-monoxima, basado en la reacción de Fearon con las modificaciones técnicas de Coulombe y Favreau. En 228 hombres los valores de nitrógeno ureico hallados fueron de 5 a 18 mg% con un valor medio de 10.2 mg%.

En 181 mujeres, el valor promedio encontrado fue de 9.1 mg% con valores margen de 5 a 15 mg%. Para ambos sexos los valores margen fueron de 5 a 16 mg%, con un valor promedio de 9.6 mg%.

SUMMARY

This study give a short comment about the different methods which are used to determinate urea nitrogen in serum.

The normal values found of urea nitrogen in serum from a university population between the age of 18 and 25 years both female and male by using urea method of direct urea diacetyl test based on the reaction of Fearon the modifications of the technique made by Coulombe and Favreau are the following:

In serum from 228 male the values of urea nitrogen were between 5 and 18 mg% with the medium of 10.2 mg%. The medium values found in serum from 181 female wich a margen of 5 to 15% mg%. For both female and male the values were between 5 to 16 mg% wich a medium of 9.6 mg%.

B I B L I O G R A F I A :

- 1.—ADDIS, T., BARRETT, E., POO, L. J. AND YUEN, D. W.
The relation between the serum urea concentration and the protein consumption of normal individuals. *J. Clin. Invest.*, 26:869-874, 1947.
- 2.—ANNINO, J. S. AND RELMAN, A. S.
The effect of eating on some of the clinically important chemical constituents of the blood. *Am. J. Clin. Pathol.*, 31:155-159, 1959.
- 3.—BOLETÍN TÉCNICO HYCEL.
Direct urea nitrogen determinations. By Hycel, Inc., Houston, Texas, U. S. A., 1968.
- 4.—COULOMBE, J. J. AND FAVREAU, L.
A new simple semimicro method for colorimetric determination of urea. *Clin. Chem.*, 9:102-108, 1963.
- 5.—CRAMER, F. B. JR. AND WINNICK, T.
Aminoacid nitrogen of normal human plasma. *J. Biol. Chem.*, 150:259-260, 1943.
- 6.—CROCKER, C. L.
Rapid determination of urea nitrogen in serum or plasma without deproteinization. *Am. J. Med. Tech.*, 33:361-365, 1967.
- 7.—DOMÍNGUEZ, R., POMMERN, E. AND ZORN, E. M.
Relation of urea nitrogen to nonprotein nitrogen of the blood. *Am. J. Clin. Pathol.*, 16:413-425, 1946.
- 8.—FEARON, W. R.
The carbamido diacetyl reactions: A test for citrulline. *Biochem. J.*, 33:902-907, 1939.
- 9.—HAMMETT, F. S.
Studies of variations in the chemical composition of human blood. *J. Biol. Chem.*, 41:599-615, 1920.
- 10.—HENRY, R. J.
Química Clínica, bases y principios. Tomo I, XXIV, 317-321 pp. Edit. Jims., Barcelona, 1968.
- 11.—JELLINEK, E. M. AND LOONEY, J. M.
Statistics of some biochemical variables on healthy men in the age range of twenty to forty-five years. *J. Biol. Chem.*, 128:621-630, 1939.
- 12.—LEWIS, W. H., JR. AND ALVING, A. S.
Changes with age in the renal function in adult men. *Am. J. Physiol.*, 123:500-515, 1938.

- 13.—MACKAY, E. AND MACKAY, L. L.
The concentration of urea in the blood of normal individuals. *J. Clin. Invest.*, 4:295-306, 1927.
- 14.—MARSH, W. H., FINGERHUT, B. AND MILLER, H.
Automated and manual direct methods for the determination of blood urea. *Clin. Chem.*, 11:624-527, 1965.
- 15.—ORMSBY, A. A.
A direct colorimetric method for the determination of urea in blood and urine. *J. Biol. Chem.*, 14:595-604, 1942.
- 16.—PINCUS, J. B., GITTLEMAN, I. F., SAITO, M. AND SOBEL, A. E.
A study of plasma values of sodium, potassium, chloride, carbon dioxide, carbon dioxide tension, sugar, urea and the protein base-binding power, pH and hematocrit in prematures on the first day of life. *Pediatrics*, 18:39-47, 1956.
- 17.—SEARCY, R. L., GOUGH, G. S., KOROTZER, J. L. AND BERGQUIST, L. M.
Evaluation of a new technique for estimation of urea nitrogen in serum. *Am. J. Med. Technol.*, 27:255-262, 1961.
- 18.—WOOTTON, I. D. P. AND KING, E. J.
Normal values for blood constituents. *Lancet*, 264:470-471, 1953.