

Efecto del uso de conservador antes o después de la colección urinaria de 24 horas sobre la cuantificación de diferentes analitos

Lilia Llamazares-Azuara,* M. Rodríguez-Martínez,** C. González-Castillo,*
M.L. Blanco-Varela*

RESUMEN

Introducción: Dentro de los métodos existentes para preservar la orina de 24 h están el coleccionar la orina en recipientes que contienen ácidos o álcalis según el analito de interés. Ello hace necesario realizar varias colecciones aumentando los riesgos para el paciente. **Objetivo:** Evaluar el efecto de añadir el conservador antes o después de coleccionar la orina de 24 h sobre la concentración de creatinina, calcio, fósforo, ácido úrico, oxalato y citrato. **Metodología:** Veinticinco voluntarios coleccionaron orina de 24 h alicuotando isovolumétricamente cada micción en recipientes que contenían (A = HCl, B = NaOH) o sin conservador (C = SC), que se entregaron en el laboratorio en un lapso de 2 h luego de la última micción. Las alicuotas A, B y C fueron realicuotadas (10 mL). Las alicuotas del recipiente C se acidificaron (+HCl), o alcalinizaron (+ NaOH), o se les agregó EDTA (+EDTA) o no se les agregó conservador (SC). Todas las alicuotas fueron diluidas excepto en las que se determinó citrato y luego congeladas. Las determinaciones se realizaron dentro de 5-15 días. **Resultados:** La concentración de creatinina sólo fue subestimada con el método +NaOH. Las concentraciones de calcio, fósforo, oxalatos y ácido úrico fueron semejantes independientemente del método. La concentración de citrato fue significativamente menor con el método +NaOH. **Conclusiones:** El medir la concentración de analitos en orina de 24 h preservada desde un inicio con ácidos o álcalis es innecesaria, ya que la adición de los mismos en el laboratorio da los mismos resultados, sin detrimento en su confiabilidad.

Palabras clave: Orina, cuantificación, preservación, creatinina, calcio, fósforo, ácido úrico, oxalato, citrato.

ABSTRACT

Introduction: Amongst the 24 h urine preservation methods are those that consist in performing the urine collection in containers containing acids or alkalis as the analyt of interest. That make necessary to perform several collections increasing the patient's risks. **Objective:** To evaluate the effect of adding conservative before or after the 24 h urine collection on the concentration of creatinine, calcium, phosphorus, uric acid, oxalate and citrate. **Methods:** 25 voluntaries collected urine for 24 h. They isovolumetrically aliquoted each micturition into containers which contain (A = HCl, B = NaOH) or not conservator (C = SC). These containers were delivered in the lab before 2 h of the last micturition. The aliquotes A,B, and C were realiquoted (10 mL). The C container aliquotes were acidified (+HCl) or alcalinized (+NaOH), or added EDTA (+EDTA) or nor added any conservative (SC). All aliquotes were diluted, except in those in which citrate was measured, and then freed. The determinations were done within 5-15 days. **Results:** The creatinine concentration was only subestimated with +NaOH method. Calcium, phosphorus, oxalate and uric acid were similar independently of the method. Citrate concentration was significantly lower with +NaOH method. **Conclusions:** To measure the concentration of analytes in previously acidified or alcalinized 24 h urine collections is unnecessary, since that the in situ addition of acid or alkali in the lab gives the same results without detriment in its reliability.

Key words: Urine, urinary preservation, quantification, creatinine, calcium, phosphorus, oxalate, citrate.

* Laboratorio Renal.

** Laboratorio Fisiología Integrativa, Dpto. de Fisiología y Farmacología.

Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Correspondencia:

Lilia Llamazares Azuara. Laboratorio Renal, Facultad de Medicina, UASLP. Av. Venustiano Carranza Núm. 2405, 78210 San Luis Potosí, SLP.
E-mail: lilianall@uaslp.mx

Recibido: 11-09-2006

Aceptado: 14-03-2007

INTRODUCCIÓN

Algunas pruebas de laboratorio se realizan en muestras de orina colectada durante 24 horas, de manera que para obtener resultados confiables se ha considerado necesario que la orina se colecte de manera completa y correcta, así como también el que se preserve de manera adecuada.^{1,2} Para ello, el laboratorio debe proveer el recipiente apropiado e instruir al paciente sobre cómo realizar la colección.

Existen diversos métodos para preservar la orina: acidificación, alcalinización, dilución previa, refrigeración, congelación o una combinación de ellos.^{3,4} El uso de cualquiera de estos métodos dependerá fundamentalmente de la técnica que se utilice para la cuantificación del analito. En ocasiones se vuelve necesario añadir, previo a la colección, un conservador urinario que permita la mayor recuperación y estabilidad del analito.^{5,6} Sin embargo, existe controversia respecto a este último proceder, ya que la salpicadura de ácidos o álcalis concentrados o diluidos usados como conservadores puede provocar quemaduras, irritación cutánea u oftálmica, poniendo en riesgo la seguridad y salud del paciente, además de que puede expedir olores desagradables. Por esta razón, muchos laboratorios han optado por aplicar dichas medidas de preservación hasta que la muestra llega al laboratorio,^{1,2} sin embargo, no se ha evaluado qué tanto este proceder modifica o no la medición precisa y exacta del analito urinario. El propósito del presente trabajo fue el evaluar el efecto que tiene el añadir el preservador antes o después de colectar la orina de 24 h sobre la cuantificación urinaria de creatinina, calcio, fósforo, ácido úrico, oxalatos y citratos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo con la participación voluntaria y el consentimiento informado de 25 personas sanas de ambos sexos. A todos se les instruyó para que desde una semana previa a la colección urinaria no ingirieran antiácidos, analgésicos, vitamina C, multivitamínicos, suplementos de calcio, cereales multivitaminados o bebidas alcohólicas, ya que se sabe que ellos pueden interferir en la cuantificación de los analitos estudiados. A todos los voluntarios se les proporcionaron tres recipientes de plástico, limpios, de medio galón de capacidad etiquetados como A, B y C, así como dos probetas de plástico (Nalgene, 100 y 1,000 mL, respectivamente). El recipiente A contenía 3.5 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado, el B 3.5 mL de hidróxido de sodio

(NaOH) al 5% y el recipiente C no contenía conservador. Se instruyó al voluntario para que la colección urinaria se realizara apegándose a las siguientes indicaciones: 1) El día de la colección la primera orina al levantarse se desecharía y se registraría la hora, 2) la segunda micción se colectaría en la probeta de 1,000 mL, se mezclaría, se mediría su volumen y se dividiría en tres partes iguales (con la probeta de 100 mL), las cuales se dispondrían en los recipientes A, B y C para después refrigerarlas, 3) se realizaría el mismo procedimiento en cada una de las micciones subsiguientes durante el día y la noche, incluyendo la primera orina de la mañana del siguiente día y se registraría la hora (tiempo aproximado para completar las 24 horas), 4) los recipientes serían trasladados al laboratorio lo más pronto posible. Una vez en el laboratorio, los volúmenes de orina en cada uno de los botes fue medido por separado. Si dichos volúmenes no resultaron iguales se descartaron y se solicitó una nueva colección, de lo contrario, el volumen total de 24 horas se tomó como la suma de los tres volúmenes medidos. A continuación, se obtuvieron 4 alícuotas de 10 mL del recipiente A para determinar creatinina, calcio, fósforo y oxalatos e identificadas como (HCl); del recipiente B se obtuvieron 3 alícuotas de 10 mL para determinar creatinina, ácido úrico y citrato que fueron identificadas como (NaOH). Del recipiente C, se obtuvieron 11 alícuotas de 10 mL. A las primeras 4 alícuotas se le agregó HCl concentrado (100 μ L) y en ella se determinó creatinina, calcio, fósforo y oxalatos y fue identificada como (+ HCl); en las siguientes 3 alícuotas se agregó NaOH al 5% (100 μ L) y en ellas se determinó creatinina, ácido úrico y citrato, siendo identificadas como (+ NaOH); en otras 2 alícuotas se agregó EDTA 5% (100 μ L) para determinar creatinina y citrato, y se identificó como (+ EDTA). Finalmente en las últimas 2 alícuotas no se agregó preservador alguno y en ellas se determinó creatinina y citrato, identificándolas como (SC).

Para el caso de creatinina, se realizaron diluciones con agua desionizada (1:20), se refrigeraron y se corrieron en un lapso de 5 días; para el caso de calcio y fósforo las alícuotas fueron diluidas (calcio = 1:50 con cloruro de lantano; fósforo = 1:10 con agua desionizada), almacenadas a -4 °C y procesadas en el lapso de cinco días; para el caso de ácido úrico, una vez hechas las diluciones con agua desionizada (1:10), se almacenaron a -4 °C y se corrieron en el lapso de 15 días; para el caso de oxalato la dilución fue hecha con un volumen igual del diluyente proveído por el fabricante, almacenada a -70 °C y co-

rrida en el lapso de 15 días. Finalmente, para el caso de citrato no se realizó dilución, almacenándose la alícuota a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su ensayo dentro de un lapso de 15 días. Para la cuantificación de los analitos se utilizaron las siguientes técnicas químico-analíticas: creatinina, por reacción de Jaffé (analizador de creatinina 2 Beckman);⁷ calcio, por espectrofotometría de absorción atómica (espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer, Mod. 2380);⁸ fósforo, por técnica colorimétrica Fiske-Subarrow modificada;⁹ ácido úrico, por técnica enzimática de uricasa (Sigma Diagnostics 292-UV);¹⁰ oxalatos, por técnica enzimática (Sigma Diagnostics 591);¹¹ citratos, por técnica enzimática de citrato liasa (Boehringer Mannheim, UV 139076).¹²

Diseño del estudio y análisis de datos

El estudio tuvo una estructura de tratamiento de una vía y una estructura de diseño de bloques completos al azar. El análisis de los datos para cada analito se llevó a cabo a través de un ANDEVA de una vía (métodos de preservación) considerando al sujeto como bloque. Para cada uno de los analitos, se evaluó si los residuales del modelo mixto ajustaron a la normal (prueba de Shapiro Wilk) y si existía homogeneidad de varianzas entre los métodos de preservación (prueba de Brown- Forsythe) de lo contrario los datos sufrieron transformación de Box-Cox y los criterios paramétricos fueron reevaluados. Si el ANDEVA de una vía resultó significativo se procedió a comparar las medias utilizando las pruebas de Tukey-Kramer HSD (más de dos medias) o la t-Student (dos medias) para identificar entre qué métodos de preservación existía diferencia.¹³ El nivel de α impuesto fue de 0.05 y el análisis se llevó a cabo con el programa JMP profesional V. 5.01. Todos los datos son el promedio \pm error estándar (EE).

RESULTADOS

Como se puede observar en el *cuadro I*, la concentración urinaria de creatinina fue semejante entre los diversos métodos de preservación (rango de 1,296 a 1,326 mg/L), excepto en la orina + NaOH, la cual mostró una concentración más baja con respecto a las orinas acidificadas ($1,283 \pm 107$ mg/L, $p < 0.05$). En cuanto a las concentraciones urinarias de calcio, fósforo y oxalatos, se encontró que el método de preservación HCl o + HCl no hace diferencia en las concentraciones obtenidas. Para el caso de la concentración urinaria de ácido úrico se encontró que el método de preservación NaOH o + NaOH tampoco hace diferencia en las concentraciones obtenidas. Finalmente, la concentración urinaria de citrato fue semejante entre los métodos de preservación NaOH, SC y + EDTA, sin embargo, la concentración de citrato fue significativamente menor con respecto a los tres métodos anteriores cuando el método de preservación fue + NaOH (292 ± 33 mg/L, $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

El uso de preservadores urinarios reduce el crecimiento y la acción bacteriana,¹⁴ y en algunos casos es necesaria su adición para lograr la completa recuperación del analito de interés.^{5,15} En vista de que en ocasiones se solicita al laboratorio clínico la cuantificación de múltiples analitos urinarios, y de que la determinación de éstos requiere de condiciones físico-químicas particulares, es que es común solicitar al paciente que realice más de una colección urinaria en función del tipo de analito solicitado y su correspondiente conservador. El presente trabajo tuvo como propósito el evaluar los efectos que tiene el añadir el preservador antes o después de coleccionar la orina de 24 h sobre la cuantificación urinaria de creatinina,

Cuadro 1. Concentraciones urinarias con los diferentes métodos de preservación.

Preservador	Creatinina mg/L	Calcio mg/L	Fósforo mg/L	Oxalato mg/L	Ac. úrico mg/L	Citrato mg/L
HCl	1,318 \pm 108	111 \pm 14.0	704 \pm 66	28.5 \pm 2.4		
+ HCl	1,326 \pm 109	109 \pm 14.6	753 \pm 74	28.2 \pm 2.3		
NaOH	1,296 \pm 107				458 \pm 42.4	335 \pm 33
+ NaOH	1,283 \pm 107*				464 \pm 44.0	292 \pm 33†
SC	1,319 \pm 110					336 \pm 34
+ EDTA	1,308 \pm 110					310 \pm 33

Valores promedio \pm error estándar (EE). SC: sin conservador; * $p < 0.05$ vs HCl o + HCl; † $p < 0.05$ vs NaOH o SC.

calcio, fósforo, ácido úrico, oxalatos y citratos. Los resultados muestran que es posible obtener esencialmente los mismos resultados en concentración urinaria de creatinina, calcio, fósforo y oxalato si la orina se acidifica desde el inicio de la colección (HCl) o si se acidifica hasta que llega al laboratorio (+ HCl), cuando no han pasado más de 2 horas de la última colección. Por lo que toca a la concentración urinaria de creatinina, ésta fue semejante a la obtenida bajo acidificación temprana o tardía, si el método de preservación fue NaOH, + EDTA o si no se usó preservación alguna. En contraste, el único método de preservación que redujo significativamente la concentración urinaria de creatinina fue el de la alcalinización tardía (+ NaOH). Entonces, los presentes resultados indican que cuando se mide la concentración urinaria de creatinina por el método de picrato alcalino (Jaffé) y se ha colectado la orina por 24 h el uso o no de conservadores es irrelevante, confirmando lo reportado por otros.^{3,16,17}

Está ampliamente documentado^{3,4,18,19} el papel que juega el HCl como preservador urinario para evitar la precipitación de calcio y garantizar la disolución total del fosfato. También está documentado que la acidificación de la orina evita la interferencia del ascorbato en la determinación de oxalato, ya que la condición alcalina de la orina transforma al ascorbato en oxalato,^{3,4,11,18,20-24} de nueva cuenta, nuestros resultados indican que el preservar la orina durante toda la colección con HCl tiene el mismo efecto que si se acidifica al recibir la muestra en el laboratorio.

Por otro lado, se sabe que NaOH evita la precipitación del ácido úrico⁴ pero además se ha documentado la ventaja que representa el diluir la muestra previo a su almacenamiento para evitar que su cuantificación sea subestimada,^{25,26} los resultados del estudio señalan que el preservar la orina durante toda la colección con NaOH tiene el mismo efecto que si se alcaliniza al recibir la muestra en el laboratorio.

Se ha sugerido que el calcio presente en la orina tiende a subestimar la concentración de citrato, aumentando con ello la frecuencia de hipocitraturia.¹³ Por ello, algunos laboratorios acostumbra preservar la orina con EDTA para quelar el calcio. Los resultados muestran, sin embargo, que el coleccionar la orina sin preservador alguno (SC) o preservándola con NaOH o con + EDTA no hace diferencia en la concentración de citrato obtenida. Por otro lado, es reconocido que la actividad de la citrato liasa es más estable cuando la reacción se lleva a cabo en orinas con pHs alrededor de 8;²⁷ en los casos anteriores de preservación el pH urinario se encontró abajo de 7,

mientras que el procedimiento + NaOH dio lugar a que la orina alcanzara un pH alrededor de 8 y que la concentración de citrato fuera significativamente menor que con los otros métodos de preservación. Así, consideramos que este último método de preservación (+ NaOH) debería ser el de elección para la cuantificación de citrato en la orina.

En resumen, los resultados del presente estudio indican que para medir la concentración urinaria de creatinina, calcio, fósforo, oxalato, ácido úrico o citrato no es necesario preservar la orina de 24 h con conservador alguno (HCl, NaOH), siempre y cuando esta colección circádica sea recibida prontamente en el laboratorio (dentro de las dos horas de la última colección) ya que una vez en él se puede: 1) diluir, almacenar y proceder a cuantificar la concentración urinaria de creatinina; 2) acidificar, diluir y proceder a cuantificar la concentración urinaria de calcio, fósforo y oxalato, 3) alcalinizar, diluir y proceder a cuantificar ácido úrico y 4) alcalinizar y proceder a cuantificar citrato, sin detrimento en la confiabilidad de la determinación. Esto aparte de ahorrar costos de manejo de muestra y de evitar la producción de olores que pueden resultar desagradables para el paciente, aumenta la comodidad y seguridad para el mismo.

REFERENCIAS

1. Cleveland Clinic. General specimen collection, handling & transportation. *Urine specimen collection*. Cleveland Clinic Reference lab; 2003.
2. Laboratory Corporation of America. Specimen, collection, preparation & handling. *Urine Chemistry*. Laboratory Corporation of America Reference lab; 2001.
3. Nicar MJ, Hsu MC, Johnson T, Pak CY. The preservation of urine samples for determination of renal stone risk factors. *Lab Med* 1987; 18: 382-364.
4. Ng RH, Menon M, Landenson JH. Collection and handling of 24-hour urine specimens for measurement of analytes related to renal calculi. *Clin Chem*. 1984; 30: 467-471.
5. Urivetzky M, Kessaris D, Smith AD. Ascorbic acid overdosing: a risk factor for calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol*. 1992; 147: 1215-1218.
6. Blau N, Matasovic A, Lukasiewicz-Wedlechowicz A, Heizmann CW, Leumann E. Simultaneous determination of oxalate, glycolate, citrate, and sulfate from dried urine filter paper spots in a pediatric population. *Clin Chem*. 1998; 44: 1554-1556.
7. Beckman Creatinine Analyzer 2. *Manual de operación del analizador de creatinina Beckman*; 1982.
8. Trudeau DL, Freier EF. Determination of calcium in urine and serum by absorption atomic spectrophotometry (AAS). *Clin Chem*. 1967; 13:101-114.
9. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem*. 1925; 66: 375-400.
10. Sigma Diagnostics. *Inserto Quantitative enzymatic determination of uric acid in serum or urine*; 1995.

11. Sigma Diagnostics. *Inserto Quantitative enzymatic determination of oxalate concentration in urine*; 1990.
12. Boehringer Mannheim. *Inserto Determination of citric acid UV-method*; 1998.
13. Box GEP, Hunter JS, Hunter WG. Comparing a number of entities, randomized blocks and Latin squares. In: Box GEP, Hunter JS, Hunter WG eds. *Statistics for experimenters. Design, innovation and discovery*. Hoboken NJ: John Wiley & Sons Inc.; 2nd ed. 2005. p. 133-172.
14. Panesar NS. *Pre-analytical factors affecting laboratory results*. Dept of Chem Pathol, Chinese University of Hong Kong; 1998. p. 2-10.
15. Asper R, Schmucki O. Critical aspects of urine and stone analysis. Appearance of iatrogenic urinary calculi. *Urol Int* 1986; 41: 334-342.
16. Spierto FW, Hannon WH, Gunter EW, Smith SJ. Stability of urine creatinine. *Clin Chem Acta*. 1997; 264: 227-232.
17. Sweid HA, Bagga A, Vaswani M, Vasudev V, Ahuja RK, Srivastava R. Urinary excretion of minerals, oxalate, and uric acid in north Indian children. *Pediatr Nephrol*. 1997; 11: 189-192.
18. Laerum E, Palmer H. Methodological aspects of examination of 24 hour urinary excretions in outpatients with recurrent urolithiasis. *Scand J Urol Nephrol*. 1983; 17: 321-324.
19. Sonntag J, Schaub J. The identification of hyperoxaluria in very low-birthweight infants- which urine sampling method? *Pediatr Nephrol*. 1997; 11: 205-207.
20. Wilson DM, Liedtke RR. Modified enzyme-based colorimetric assay of urinary and plasma oxalate with improved sensitivity and no ascorbate interference: reference values and sample handling procedures. *Clin Chem*. 1991; 37: 1229-1235.
21. Parkinson IS, Sheldon WL, Laker MF, Smith PA. Critical evaluation of a commercial enzyme kit (Sigma) for determining oxalate concentrations in urine. *Clin Chem* 1987; 33: 1203-1207.
22. Mazzachi BC, Teubner JK, Ryall RL. Factors affecting measurement of urinary oxalate. *Clin Chem*. 1984; 30: 1339-1343.
23. Chalmers AH, Cowley DM, McWhinney BC. Stability of ascorbate in urine: relevance to analyses for ascorbate and oxalate. *Clin Chem*. 1985; 31: 1703-1705.
24. Kasidas GP. Plasma and urine measurements for monitoring of treatment in the primary hyperoxaluric patient. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10(Suppl 8): 8-10.
25. Yamakita J, Yamamoto T, Moriwaki Y, Takahashi S, Tsutsumi Z, Hada T. Effect of urine storage on urinary acid concentrations. *Ann Clin Biochem*. 2000; 37(Pt3): 355-359.
26. Bartges JW, Osborne CA, Felice LJ, Fletcher TF, Lulich JP, Chen M. Effects of various methods of preservation on the stability of uric acid in frozen canine urine. *Am J Vet Res*. 1996; 57: 787-790.
27. Toftegaard NT. A method for enzymatic determination of citrate in serum and urine. *Scand J Clin Lab Invest*. 1976; 36: 513-519.

