

ORGANIZACIÓN DE LA SECCIÓN ORINA–NEFROLOGÍA

Autoras

Lic. Dania Consuegra Silverio

Departamento

Laboratorio Clínico

CONTENIDO

- Instrucciones para la recogida de muestras por los pacientes
- Citoria
- Conteo de Addis
- Determinación cuantitativa de las proteínas urinarias
- Determinación de proteínas de Bence Jones
- Filtrado glomerular

DESARROLLO

Las pruebas que se realizan en este departamento son:

- Uroanálisis.
- Pruebas funcionales renales.

En el departamento se realizan análisis de urgencia hasta las 3 p.m.

El primer paso del trabajo en la sección es la organización de las muestras, el registro de ellas en las hojas de trabajo y luego la realización del trabajo de la observación del sedimento por el microscopio. En el caso de los análisis minutados y de los de 24 horas como primer paso se homogeniza las muestras y se les toma el volumen para luego realizarle los análisis químicos como de las diluciones de las muestras para que sean mandadas a realizarse en los equipos automatizados del laboratorio.

Los resultados son reportados a la base de datos del Laboratorio en el día.

La sección apoya fundamentalmente los servicios de Nefrología, Reumatología, Medicina Interna, Cardiología, Endocrinología, Gastroenterología y Hematología. Además, presta apoyo a otros hospitales, incluyendo Pediátricos.

Instrucciones para la recogida de muestras por los pacientes

- ***Para recoger orina de 2 horas***
 - ✧ Orinar a las 6 AM en el baño y desechar esa orina; recoger la orina de las 2 horas siguientes en una vasija ancha y verterlo con cuidado en el frasco. Traerlo al laboratorio antes de las 10 AM.
- ***Para recoger orina de 8 horas***

- ✧ Orinar a las 10 PM en el baño y desechar esa orina; recoger toda la orina de las 8 horas siguientes (hasta las 6 AM inclusive) en una vasija ancha y verterlo con cuidado en el frasco.
- ***Para recoger orina de 24 horas***
 - ✧ Orinar en el baño a las 6 AM; recoger todas las micciones posteriores de ese día en una vasija ancha y luego verterla con cuidado en los frascos, recoger también las orinas de la madrugada y la de las 6 AM del siguiente día inclusive. Mantener en el refrigerador.
- ***Puesto de trabajo: cituria***
 - ✧ Se organizan de forma consecutiva las muestras de cituria por orden de llegada, cada una con su identificación.
 - ✧ Las órdenes organizadas en el mismo orden que las muestras se pasarán a las listas de trabajo que llevarán los siguientes datos: nombre, número, y los resultados de leucocitos, hematíes, cilindros y albúmina así como las observaciones de cada caso.
- ***Puesto de trabajo: Conteo de Addis***
 - ✧ Se organizan de forma consecutiva las muestras por orden de llegada cada una con su identificación.
 - ✧ Se mide el volumen de cada muestra y se centrifuga 10 mL de orina en tubos plásticos graduados.
 - ✧ Las órdenes organizadas se pasarán a las listas de trabajo que llevarán los siguientes datos: nombre, número, volumen, tiempo y los resultados de leucocitos, hematíes, cilindros y albúmina así como las observaciones de cada caso.
- ***Puesto de trabajo: Nefrología***
 - ✧ Las orinas de 24 horas se mezclan, se miden y se le separa una alícuota en un tubo de ensayo rotulado.
 - ✧ Las muestras se separan de acuerdo a la determinación que se le va a realizar.

Procedimientos normalizados de operación

Para estudio cuantitativo del sedimento urinario: cituria

Fundamento del método

- La cuantificación de los elementos que componen el sedimento urinario (eritrocitos, leucocitos y cilindros) combinado con la determinación de proteínas en orina nos permite una valoración completa del funcionamiento renal.

Reactivos químicos y bioquímicos

- Ácido sulfosalicílico 0.786 mol/L (20 %)
- Se pesan 20 gramos de ácido sulfosalicílico y se disuelven en 100 mL de agua. Esta solución es estable a temperatura ambiente y envasada en frascos de color ámbar que garantice un correcto cierre.

Aparatos, utensilios y medios de medición

- Tubos para ensayo de 13 x 100 o 15 x 125 mL
- Gradillas para los tubos de ensayos
- Pipeta graduada de 5 mL; vD 0,1 mL
- Microscopio con lente objetivo 40 y poca luz
- Cámara de Neubauer
- Pipeta Pasteur
- Cubreobjetos

Muestra

- La muestra debe estar constituida por el chorro intermedio de la orina emitida inmediatamente después de levantarse. En los análisis de urgencias puede utilizarse la orina emitida en cualquier momento del día o de la noche.

Procedimiento

- Consta de dos partes: una para la determinación de proteína o albúmina y otra para el examen microscópico del sedimento urinario.
- ✧ **Proteinuria** (albuminuria): se determina cualitativamente el contenido de proteína en la muestra añadiendo en un tubo de ensayo a 3 mL de orina 3 gotas de ácido sulfosalicílico al 20 %.

Se informa de acuerdo a la turbiedad que aparezca como:

- No contiene: Si se mantiene transparente.
- Ligeras trazas: Si aparece una ligera opalescencia.
- Trazas: Si la turbiedad es mayor.
- Contiene: Cuando forma precipitado blanco (proteinuria >1 g/L)

- ✧ **Examen microscópico del sedimento urinario:** el examen microscópico del sedimento urinario se realiza en una cámara de Neubauer, la cual tiene 9 cuadrados de 1 mm de lado y 0,1 mm de altura.

La muestra se mezcla por rotación o se invierte suavemente para resuspender los elementos sedimentados y con una pipeta Pasteur se carga la cámara de Neubauer (Se cubre la cámara con un cubreobjeto y la orina debe cubrir la zona cuadrículada de forma homogénea o sea el

volumen completo de la cámara), para que los elementos se sedimenten se coloca en la platina del microscópico y se cuentan con el lente objetivo 40 y poca luz los eritrocitos y leucocitos en 4 de los 16 cuadrados de los que esta dividido cada mm² de las esquinas de la cámara (los 4 cuadrados superiores) o sea en un área total de 1 mm². Los cilindros se cuentan en el área total ocupada por los 4 mm² de las esquinas.

Método para los cálculos

- ✧ La cantidad de leucocitos y eritrocitos comprendidos en un mL de orina se calcula de la siguiente manera:

$$N = Ne. (1 \text{ mL} / Vc) \times \text{dil.}$$

Donde:

Ne: Es la cantidad de eritrocitos y leucocitos contados en la cámara

Vc: Es el volumen de la cámara en que se contaron las células.

$$Vc = 1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.0001 \text{ cm}^3 = 0.0001 \text{ mL}$$

$$\text{dil} = 1$$

Entonces:

$$N = Ne \times 1 \text{ mL} / 0.0001 \text{ mL} \times 1 = Ne \times 10\,000$$

$$N = Ne \times 10\,000$$

- ✧ La cantidad de cilindros por mL de orina se calcula de la siguiente manera:

$$C = Ce (1 \text{ mL} / Vc) \times \text{dil.}$$

Donde:

Ce: Es la cantidad de cilindros contados en la cámara

Vc: Es el volumen de la cámara en que se contaron los cilindros

$$Vc: 4 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 0.4 \text{ mm}^3 = 0.0004 \text{ cm}^3 = 0.0004 \text{ mL}$$

dil: Es 1 la muestra no se diluye

Entonces:

$$C = Ce \times 1 \text{ mL} / 0.0004 \text{ mL} \times 1 = Ce \times 2500$$

$$C = Ce \times 2\,500$$

Se informa los resultados de la siguiente manera:

Albúmina: ----- No contiene

[-----] x 10 000 leucocitos/mL

[-----] x 10 000 eritrocitos/mL

[-----] x 2 500 cilindros/mL

Control de la calidad

- ✧ Se hacen duplicados algunas muestras al azar. El resultado debe ser similar al de la muestra original.

Intervalo de referencia

-Albúmina.....	No contiene
-Leucocitos/mL...	0 a 10 000
-Eritrocitos/mL....	0 a 10 000
-Cilindros/mL.....	0

Conteo minutado de Addis

Fundamento del método

- Esta prueba se basa en la cuantificación minutada, tanto de los elementos que componen el sedimento urinario (eritrocitos, leucocitos y cilindros). Como de las proteínas excretadas y se valora en orinas recogidas en 2 horas o en 8 horas; el incremento de estos valores varia de acuerdo al tipo y la extensión de la lesión renal correspondiente.

Reactivos químicos y bioquímicos

- ***Para la proteinuria cualitativa***
 - ✧ Ácido sulfosalicílico 0.786 mol/L (20 %): descrito en la cituria.
- ***Para la cuantificación de las proteínas urinarias***
 - ✧ Reactivo de azul de Comassie (reactivo colorante de proteínas)
 - ✧ En un matraz aforado de 1 000 mL disolver 40 mg de azul de Comassie Serva G en 40 mL de metanol; añadirle 100 mL de ácido fosfórico 85 % y aproximadamente 800 mL de agua destilada; añadir 30 mg de dodecil sulfato de sodio y enrasar. Guardar en frasco de polietileno protegido de la luz y a temperatura ambiente. Rotular *reactivo de proteína*
 - ✧ Patrón de proteínas (solución de proteínas)
 - ✦ En un matraz de 100 mL disolver 1 mL de boseral de 300 g/L con solución salina hasta el enrase.
 - ✦ Se obtiene una solución de 3 g/L. Alicuotar y congelar (solución matriz)
 - ✦ Solución de referencia: disolver 50 µL con 250 µL de solución salina. Concentración de 0.5 g/L.

Aparatos, utensilios y medios de medición

- Tubos plásticos de 10 mL graduados de centrifuga
- Tubo para ensayo de 13 x 100 ó 15 x 125 mm
- Gradilla para los tubos de ensayos

- Pipetas graduadas de 10 mL; vd 0.1:
- Pipeta automática de 50 μ L
- Cámara de Neubauer
- Cubre objeto
- Pipeta de Pasteur
- Microscopio con lente de objetivo 40 X y poca luz
- Foto colorímetro o espectrofotómetro para leer a una longitud de onda entre 560 y 620 nm (preferiblemente de 580 nm)
- Cubeta de 1 mL de volumen y 1 cm de paso de luz.

Muestra

- **Addis de 2 horas**

La muestra debe estar constituida por la orina de las dos primeras horas del día preferentemente de reposo.

Método de recolección: Descrito más arriba.

- **Addis de 8 horas**

La muestra debe estar constituida por la orina de las 8 últimas horas del reposo nocturno.

Método de recolección: Descrito más arriba.

Procedimiento

- Medir diuresis y anotar el volumen.
- Homogenizar la orina.
- Verter en un tubo de centrifuga graduado 10 mL de la muestra, centrifugar durante 5 minutos a 2 000 rpm.
- Decantar a un tubo de ensayo previamente rotulado 9 mL del sobrenadante.
- Resuspender el sedimento en el mL restante.
- Examen microscópico del sedimento urinario:
 - ✧ Se realiza en una cámara de Neubawer.
 - ✧ Se agita el contenido del tubo para que sea homogéneo el sedimento resuspendido.
 - ✧ La cámara, cubierta con un cubreobjetos que debe cubrir la zona cuadrículada, se carga con una pipeta Pasteur de forma homogénea, o sea, el volumen completo de la cámara.
 - ✧ Se deja en repos 3 minutos, para que los elementos se sedimenten.

- ✧ Se coloca en la platina del microscopio y se cuentan con el lente objetivo 40 y poca luz, los eritrocitos y leucocitos en 4 de los 16 cuadrantes de los que esta dividido cada mm² de las esquinas de la cámara (los 4 cuadrados superiores de cada mm² de las esquinas o sea en un área total de 1 mm²)
- ✧ Los cilindros se cuentan en el área total ocupada por los 4 mm² de las esquinas.
- ✧ Determinación de las proteínas urinarias:
 - Se realiza en la forma descrita para cituria. Si la turbiedad es de trazas o mayor, se dosifican las proteínas por el método de azul de Comassie:
 - En un tubo de ensayo se vierten:

	Blanco	Control	Muestra
Solución de referencia			50 mμL
Orina		50 mμL	
Reactivo de proteínas	1 mL	1 mL	1 mL
Mezclar y esperar 5 minutos. Leer contra blanco reactivo a 580 nm, con cubeta de 1 mL de volumen y 1 cm de paso de luz			

- Gráfico de calibración
 - ✦ Se prepara distintas diluciones de la solución matriz para obtener 0.2; 0.5, 0.7 y g/L. Este método es lineal solo hasta 1 g/L, que generalmente nos corresponde con 0.4 de extinción; por eso a valores mayores de extinción debemos diluir la orina y repetir la determinación con orina diluida y luego multiplicar el resultado por la dilución.

Método para los cálculos

- **Proteinuria**

La concentración (C) de proteínas en la orina calcularla de siguiente manera

$$C = \frac{\text{D.O (orina)}}{\text{D.O (sol. referencia)}} \times C (\text{sol. referencia}) \times \text{dil.}$$

La concentración puede obtenerse también del gráfico de calibración. Los resultados se expresan en g/L.

En el conteo de Addis se informa las proteínas en mg/min y se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Proteínas excretadas/min} = \frac{\text{Diuresis (mL)}}{\text{Nº de horas x 60 min}} \times C \text{ (sol. referencia)}$$

$$\frac{\text{Diuresis (mL)}}{\text{Nº de horas x 60 min}} \times C \frac{\text{g}}{1000} = \text{como g/1000} = \text{mg}$$

∴ entonces

$$\frac{\text{Diuresis (mL)}}{\text{Nº de horas x 60 min}} \times C \text{ (mg/mL)} = \text{Proteínas (mg/min)}$$

- *Cálculos del conteo del examen microscópico del sedimento*

$$N = Ne \text{ (1 mL/Vc) dil}$$

Donde:

Ne: Es la cantidad de eritrocitos y leucocitos contados en la cámara

Vc: Es el volumen de la cámara en que se contaron las células

Vc= 0.0001 mL

dil: Dilución la orina en este caso es 1/10 (resuspendimos en 1 mL el sedimento de los 10 mL)

$$N = Ne \times 1 \text{ mL} / 0.0001 \text{ mL} \times 1 / 10 \quad N = Ne \times 10\,000 \times 1 / 10$$

$$N = Ne \times 1\,000$$

N: Expresa # de células por mL.

En el conteo de Addis se informa la cantidad de células que se excretan por minuto (Nm) y se calcula así:

$$\frac{\text{Diuresis (mL)}}{\text{Nº de horas x 60 min}} \times N \text{ (Nº células/mL)} = Nm$$

$$\frac{\text{Diuresis (mL)}}{\text{Nº de horas x 60 min}} \times N \text{ (Nº células/mL)} = Nm \text{ (Nº cel./min)}$$

Entonces:

$$Nm \text{ (Nº cel./min)} = Ne \times 1000 \times \frac{\text{Diuresis (mL)}}{\text{Nº horas x 60 min}}$$

- *Cálculo de la cantidad de cilindros excretada/mL de orina*

$$C = Ce \text{ (LMT/Vc) x dil}$$

Donde:

Ce: Es la cantidad de cilindros contados en la cámara

Vc: Volumen de la cámara en que se contaron los cilindros (Fig 2)

$$Vc = 4 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 0.4 \text{ mm}^3 = 0.0004 \text{ cm}^3 = 0.0004 \text{ mL}$$

Dil: Es 1 / 10

$$C = Ce \times 2500 \times 1 / 10 \quad C = Ce \times 250 \text{ (Cilindros / mL)}$$

En el conteo de Addis se informa la cantidad de cilindros que se excretan por minuto (Cm) y se calcula así:

$$\frac{\text{Diuresis (mL)}}{\text{Nº de horas x 60 min}} \times C \text{ (Nº cilindros/mL)} \quad \text{Entonces:}$$

$$\frac{\text{Diuresis (mL)}}{\text{Nº de horas x 60 min}} \times 250 \times Ce = Cm \text{ (Nº cilindros/mL)}$$

Los resultados de Addis se informan de la siguiente manera:

<i>Parámetros</i>	<i>Resultados</i>
Volumen	[-----] mL
Leucocitos	[-----] / min
Hematíes	[-----] / min
Cilindros	[-----] / min
Proteínas	[-----] mg/ min

Control de la calidad:

✧ Una muestra al azar se hace por duplicado.

El resultado debe ser similar al de la muestra original.

Intervalo de referencia

Addis de 2 horas		
Parámetros	Resultados	Valores referencia
Volumen	[]	mL
Leucocitos	[]	0 hasta 1 000 x min
Hematíes	[]	0 hasta 1 000 x min
Cilindros	[]	0 hasta 1 000 x min
Proteínas	[]	No contiene

Determinación cuantitativa de las proteínas urinarias

Método de Marcart y Gerbaut (1984). Método de azul de Comassie-SDS o método Marcart

Fundamento del método

- Se basa en la reacción del azul de Comassie con los grupos que componen el enlace peptídico de las proteínas formando un color azul con un máximo de absorbancia en 580 nm

Reactivos químicos y bioquímicos

- Para la proteinuria cualitativa:
- Ácido sulfosalicílico 20 %

Para la cuantificación de las proteínas urinarias

- Reactivo de azul de Comassie (reactivo de proteínas)
 - ✧ En un matraz aforado de 1 000 mL disolver 40 mg de azul de Comassie Serva G en 40 mL de metanol
 - ✧ Añadirle 100 mL de ácido fosfórico 85 % y aproximadamente 800 mL de agua destilada
 - ✧ Añadir 30 mg de duodecil sulfato de sodio y enrasar
 - ✧ Guardar en frasco de polietileno. protegido de la luz y a temperatura ambiente
 - ✧ Rotular: reactivo de proteína
 - Patrón de proteínas (solución matriz)
 - ✦ Aparatos, utensilios y medios de medición (igual que el anterior)

Muestra

- Una alícuota de orina homogenizada de 24 horas

Procedimiento

- Homogenizar la orina y medir diuresis
- Guardar una alícuota de la orina rotulada
- Determinar cualitativamente el contenido de las proteínas de la alícuota añadiendo en otro tubo 3 mL de orina con 3 gotas de ácido sulfosalicílico
- Se compara con el tubo enumerado y se informa de acuerdo a la turbiedad que aparezca.
- Si la turbiedad es de trazas, o mayor, se cuantifican las proteínas por el método de Azul de Comassie.
- Si el precipitado nos indica que la concentración de proteínas es mayor que 1 g/L se diluye la orina antes de cuantificarla porque el método solo es lineal hasta 1 g/L
- En un tubo de ensayo se vierten:

Gráfico

	Blanco	Control	Muestra
Solución de referencia			50 µL
Orina		50 µL	
Reactivo de proteínas	1 mL	1 mL	1 mL
Mezclar y esperar 5 min. Leer contra blanco reactivo a 580 nm, con cubeta de 1 mL de volumen y 1 cm de paso de luz			

de

calibración

- La solución matriz de 3 g/L se diluye con solución salina a 1 g/L. Se enumeran tubos del 1 al 11 y se le añaden las siguientes cantidades de solución de calibración para 2 mL del reactivo de Azul de Comassie.

Nº	Cantidad de sol. (mL)	Concentración (g/L)	D.O
1	0	0	0
2	0.01	0.1	
3	0.02	0.2	
4	0.03	0.3	
5	0.04	0.4	
6	0.05	0.5	
7	0.06	0.6	
8	0.07	0.7	
9	0.08	0.8	
10	0.09	0.9	
11	0.10	1.0	

- Se leen los tubos contra el 1 que es el blanco reactivo en un espectrofotómetro a 580 nm. Plotear las concentraciones vs. las D.O. Es lineal hasta 1 g/L.

Método para los cálculos

- La concentración C de proteína en orina se calcula mediante la formula:

$$C = \frac{A_m}{A_r} \times C_r = \text{factor} \times A_m$$

Donde:

Factor = C_r/A_r o cotangente o pendiente

Am: Absorción de la muestra

Ar: Absorción de la solución de referencia

Cr: Concentración de a solución de referencia en g/L

- La concentración también se puede obtener del gráfico de calibración.
- ✧ Los resultados se expresan en g/L y se aproximan hasta las décimas.
- ✧ Como esta prueba se realiza con orina de 24 horas los resultados se expresan en g/ 24 horas y se calculan así:

$$C \times \text{Vol. 24 h} / 1000 = \text{Conc. proteínas (g)} / 24 \text{ h}$$

Control de Calidad

- ✧ Se controla la variación de los resultados con un material de control adecuado (orina control).

Intervalo de referencia:

De 0 a 0,15 g/24 h

Determinación de proteínas de Bence Jones (Putman y col, 1959)

Fundamento del Método

- La proteína de Bence Jones se caracteriza por la formación de un precipitado cuando la orina es calentada de 50° a 60°C. Este precipitado desaparece total o parcialmente cuando la temperatura se va acercando al punto de ebullición y reaparece al enfriarse. Esta muy influenciada por la acidez y la concentración de las sales.

Reactivo químicos y bioquímicos

- Acetato de sodio (anhidro) PM = 82.2 g/mol; solución 2 molar
- Pesar 16.406 g para 100 mL de agua destilada
- Disolver con un poco de agua y ajustar a pH 4.9 con ácido acético glacial completar a 100 mL con agua.

Aparatos, utensilios y medios de medición

- Tubos de ensayo de 15 – 125 mm
- Gradillas
- Baño de Maria con termómetro

Muestras

- La muestra esta constituida por la primera orina de la mañana o por orina de 24 horas.

Procedimiento

- Colocar 4 mL de orina en un tubo de ensayo
- Añadir 1 mL de buffer acetato 2 M, pH 4.9

- Incubar en baño de agua a 56 °C durante 15 min.

Cualquier precipitación es indicativa de presencia de proteínas de Bence Jones en la orina.

- Colocar en agua hirviendo 3 minutos y observar continuamente cualquier disminución o aumento de precipitado; la aclaración de la opacidad es confirmatoria, pero no todas se redisuelven a temperatura de ebullición.

Método para los cálculos

- Este es un método cualitativo, donde el resultado es positivo si aparece el precipitado a 56°C; negativo si no aparece precipitación a esa temperatura.

Control de calidad

- Se utiliza la orina de un paciente enfermo conocido positivo.

Intervalo de referencia:

Negativo

Determinación del filtrado glomerular (Método de aclaración de la creatinina)

Fundamento del método

- La producción diaria de creatinina es igual a su excreción diaria por ser un producto desechable del metabolismo muscular; la creatinina no se une a las proteínas, no es metabolizada por el riñón, es fisiológicamente inerte, es filtrada libremente a nivel glomerular y no es reabsorbida significativamente por los túbulos renales y por eso el aclaración de la creatinina nos da la medida del filtrado glomerular.

Reactivos químicos y bioquímicos

- Reactivos para la determinación de creatinina (Ver Procedimientos de la Sección de Química)

Aparatos, utensilios y medios de medición

- Tubos de ensayo de 13 x 100 o 15 x 125 mm
- Gradilla
- Microdilutor para diluir las orina (1/20)
- Probetas de 2000 mL
- Autoanalizador discreto Hitachi

Muestra

- La determinación necesita 2 muestras una de suero y otra de orina de 24 horas

Procedimiento

- Se homogeniza la orina de 24 horas, en una probeta y se mide la diuresis, luego se rotula un tubo de ensayo y se conserva una alícuota de la orina.
- En una planilla se enumeran los sueros de los pacientes a los que se les ha indicado filtrado glomerular y, a continuación, las orinas se diluyen 1 en 20 y se envían para ser procesadas en el equipo Hitachi por el método de Jaffé cinético.

Método para los cálculos

- El filtrado glomerular se calcula por la aclaración de la creatinina. La formula para el aclaramiento de la creatinina es la siguiente

$$FG = \frac{U \text{ crea } (\mu\text{mol /L}) \times 20 \times \text{Vol. / min.}}{P \text{ crea } (\mu\text{mol /L})} \times \frac{1.73}{SC} \quad (\text{mL/min})$$

Donde:

Urea: - Concentración de creatinina en orina diluida

Pcrea: - Concentración de creatinina en plasma

Vol/min: - Volumen de orina de 24 horas / 1440 min

SC: - Superficie corporal del paciente.

$$SC = \frac{L^{(0.725)} \times P^{(0.425)} \times 71.84}{10000} \quad \text{m}^2$$

Donde:

L: Longitud del paciente en cm

P: Peso en kg.

Control de calidad

- Se controla la calidad de las determinaciones de creatinina

Intervalo de referencia:

70-160 mL/min.