

COMPARACIÓN DE MÉTODOS EN LA DETERMINACIÓN DE ALBUMINURIA

Molina, Sofía Ines¹

Aguirre, Fernando Ramon²

Sarapura Sonia Susana³

¹ Laboratorio LACMII, laboratorio privado de análisis clínicos, Oran, Salta

² Laboratorio Hospital "Luis Adolfo Güemes", ministerio de salud pública, Aguaray, Salta

³ Laboratorio Hospital San Francisco Solano, El Galpón, Salta

Correspondencia: Fernando Aguirre. Laboratorio del Hospital aguaray. Av. Sarmiento s/n – Aguaray- pcia.
de salta. Tel: +543873541802 – atpfernando@yahoo.com.ar

Resumen

Introducción La albuminuria (AU) se define como la tasa de excreción de albumina en orina entre 30 a 300 mg/24hs. Es uno de los primeros indicadores de nefropatía diabética en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2. La albuminuria es un marcador de daño renal, de progresión de enfermedad renal y de riesgo cardiovascular. La medición exacta y precisa de albuminuria es crítica, para la pesquisa, pronóstico y seguimiento de la enfermedad renal. La albumina en orina se mide generalmente en los laboratorios clínicos mediante inmunoensayos (IE). El objetivo del presente trabajo fue comparar dos métodos para medir albuminuria: el método inmunoturbidimétrico (IT) y un método *Point of Care* (POC), un IE en fase sólida (Nycocard). **Materiales y Método:** Se midieron 40 muestras de pacientes (basándonos en la guía CLSI EP9 A3) por ambos métodos. El método IT (Biotécnica) fue calibrado y controlado con material provisto por el fabricante y las medidas fueron realizadas en un autoanalizador (Myndray BS480). Las determinaciones realizadas por el método de POC fueron medidas en el equipo Nycocard Reader II. La toma de muestras; conservación y preparación de las mismas se realizaron siguiendo las indicaciones de los fabricantes para ambos métodos. **Resultados:** Mediante el análisis de regresión no paramétrico de Passing Bablok se obtuvo la ecuación de la recta $y = -0,0080 + 1,0320x$. El intervalo de confianza del 95% para la pendiente es 1,0132 a 1,0500 y para la ordenada al origen es -0,8500 a 0,8882. Mediante el grafico de dispersión de Bland-Altman se estima un sesgo de 2,3 % en todo el rango de concentración, el cual es menor al error sistemático permitido por variabilidad biológica (7%). **Conclusión:** el método Nycocard es un método comparable al IT para medir AU. Los resultados son intercambiables entre ambos métodos.

Palabras claves: Albuminuria, método inmunoturbidimétrico (IT), método inmunológico en fase sólida (Nycocard).

Introducción

La albuminuria (albumina en orina) es actualmente, junto con el índice de filtración glomerular, la base para el diagnóstico, evaluación y estadificación de la enfermedad renal crónica (ERC) ¹⁻².

La enfermedad renal ha adquirido en los últimos años las proporciones de una verdadera epidemia. Habitualmente es asintomática en sus estadios iniciales, es por ello que se propone su búsqueda, particularmente en las poblaciones que están en mayor riesgo de padecerla, como son los pacientes con Diabetes Mellitus (DM); con hipertensión Arterial (HTA); individuos mayores de 60 años; pacientes con antecedentes familiares de ERC y aquellos con enfermedad cardiovascular ³⁻⁵.

La albuminuria (AU) es la manifestación más común de la patología renal y también es considerada como un factor pronóstico independiente en la progresión de la enfermedad renal ⁶. Por consiguiente, se considera a la misma como un marcador sensible para la disfunción renal progresiva y también como factor de riesgo independiente para la morbilidad y mortalidad cardiovascular ⁷⁻⁹. Además, la proteinuria se asocia a resultados adversos en pacientes con ERC, con o sin DM ¹⁰⁻¹⁴. En consecuencia existe un gran interés en la detección de albuminuria, por lo que es necesario conocer las metodologías que existen para medirla. Actualmente se encuentran disponibles varios métodos de rutina para medir AU: Tiras reactivas con determinación visual semicuantitativa. Los IE que incluyen procedimientos inmunométricos: Turbidimétricos y nefelométricos son los empleados más frecuentemente, presentan límites de detección entre 2 a 10 mg/L³. Estos métodos de rutina (IE) utilizan anticuerpos (Ac) policlonales y monoclonales con diferentes sensibilidades para la detección de formas alteradas o fragmentos de albumina presentes en las muestras de orina ¹⁵. La detección por HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) produce valores más altos con respecto a los inmunoanálisis ya que detecta formas de albumina no reactivas ¹⁵⁻¹⁷. El método de LC-MS/ID (cromatografía líquida con espectrometría de masas por dilución isotópica) podría servir como método de referencia candidato para la detección y cuantificación de AU ¹⁸. La detección de AU está justificada desde el punto de vista costo-beneficio en aquellos pacientes que presentan riesgo de desarrollar una lesión renal, en una etapa en la cual el proceso es aún reversible.

Objetivo

Comparar dos métodos para medir albuminuria: el método inmunoturbidimétrico (IT) y un método de POC, un IE en fase sólida (Nycocard). De esta manera determinar si Nycocard puede ser usado en los hospitales, en el interior de la provincia de Salta, donde no se cuenta con una plataforma automatizada para medir AU.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio observacional y prospectivo que incluyó 40 muestras de pacientes que acudieron al laboratorio LACMII de la ciudad de Orán, Salta, desde el 1 de marzo al 31 de agosto de 2018. La muestra en cuestión estuvo constituida por pacientes adultos de 30 a 64 años residentes en la ciudad de Orán, de ambos sexos (55% mujeres y 45 % hombres) como se muestra en la figura 1, diabéticos (43%) y no diabéticos (57%), y cumplían las siguientes condiciones: no habían tenido fiebre los últimos tres días, ni habían realizado ejercicio intenso, ni estaban menstruando, ni tuvieron infección urinaria sintomática. Se recolectaron muestras de orina de 24 hs y muestras al azar (primera orina de la mañana) y fueron medidas por dos metodologías diferentes: IT utilizando un autoanalizador Mindray BS 480 e IE en fase solida por el sistema POC Nycocard Reader II. Las muestras fueron recolectadas y conservadas de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes (IT: Biotécnica; NYCOCARD: Alere) para ambos métodos.

El método automatizado (IT) se basa en el principio de inmunoturbidimetría donde partículas de látex recubiertas con anticuerpos IgG de cabra anti albúmina humana reaccionan con la albúmina en la muestra, provocando un aumento de absorbancia proporcional a la concentración de albumina presente en la muestra. La calibración del método se realizó con el calibrador provisto por el fabricante, trazable al material de referencia ERM-DA470 (IRMN) preparado a partir albumina sérica humana. Se tomó este método como referencia, porque tiene un CV de 4.61% y es el método de rutina utilizado hace varios años en este laboratorio. El rango de medida del método es de 4 a 150 mg/L. Las muestras que superaron el rango de medida fueron diluidas de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

El equipo de POC Nycocard Reader II es un IE en fase sólida. La muestra se deposita sobre una placa recubierta de Ac monoclonales específicos para albumina. Cuando la muestra se deposita sobre la placa se produce una reacción tipo sándwich si está presente la albumina al agregarse el conjugado. El exceso de conjugado es eliminado de la membrana con una solución de lavado. El filtro de papel situado sobre la membrana absorbe el exceso de líquido. Las partículas de oro unidas provocan una coloración de la membrana, la intensidad de coloración es proporcional a la concentración de albumina en la muestra. Esta intensidad es medida cuantitativamente con la ayuda de un densitómetro colorimétrico Nycocard Reader II. La curva de calibración viene ya programada en el equipo cuyo calibrador es trazable al material de referencia ERM-DA470. El método presenta un CV menor al 10% y el rango de medida es de 5 a 200 mg/L.

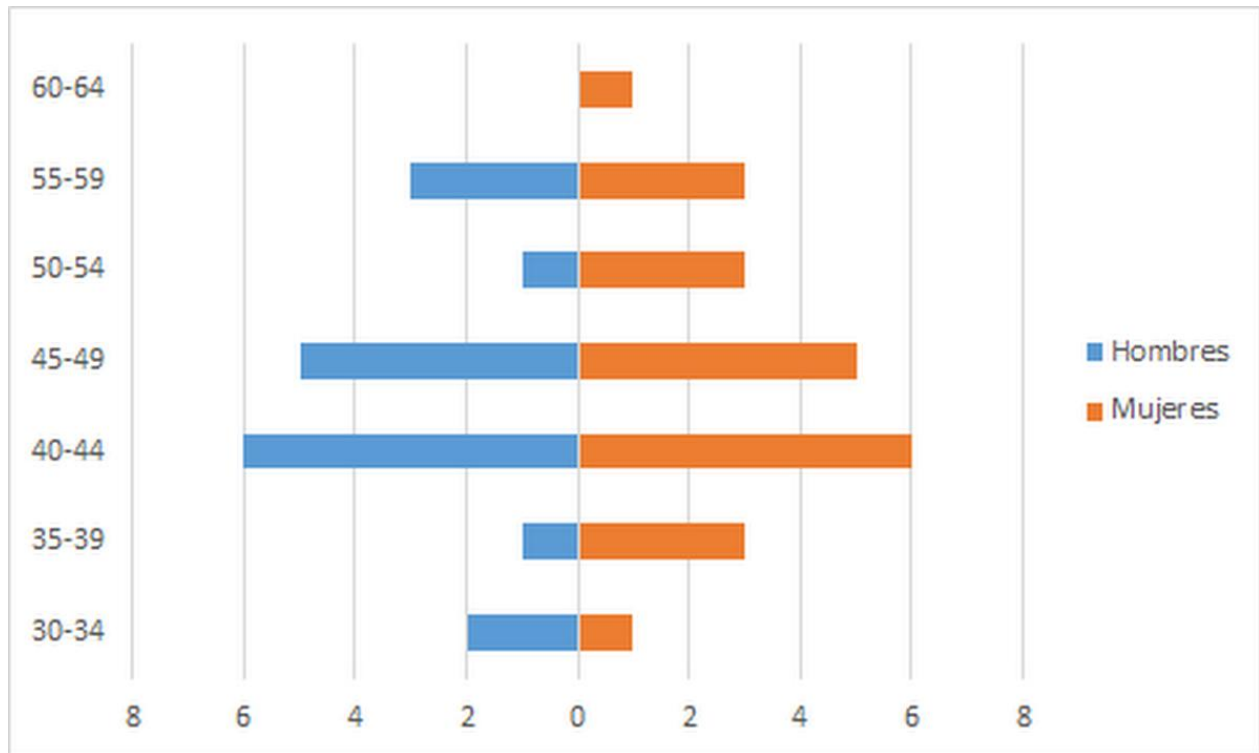


FIGURA 1. PIRAMIDE POBLACIONAL

Distribución poblacional de los pacientes por rango de edad (años)

Análisis de datos

Se llevó a cabo un análisis comparativo de los métodos a partir del análisis estadístico con asistencia del programa MedCalc versión demo. Se aplicó la medida de regresión no paramétrica de Passing- Bablok y el gráfico de dispersión de Bland- Altman. Los valores de pendiente y ordenada al origen se expresan junto al intervalo de confianza del 95% (IC95%). Se estimó el promedio del error sistemático en todo el rango de concentración evaluado y en el punto de decisión médica (30 mg/L) y se los comparo con el error sistemático permitido por variabilidad biológica deseable (VB), de acuerdo a la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC).

Resultados

Los resultados de las medidas de tendencia central, media y mediana, así como el desvío estándar se representan en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de albuminuria obtenidos con ambas metodología

REGRESIÓN DE PASSING AND BABLOK		
Variable x	TURBIDIMETRIA	
Variable y	NYCOCARD	
Tamaño de muestra	40	
	variable X	variable Y
Valor más bajo	5mg/L	7 mg/L
Valor más alto	190 mg/L	195 mg/L
Media aritmética	63mg/L	65mg/L
mediana	38mg/L	39 mg/L
Desviación estándar	59 mg/L	61 mg/L
Ecuación de la regresión	$Y = -0,008 + 1,032 X$	

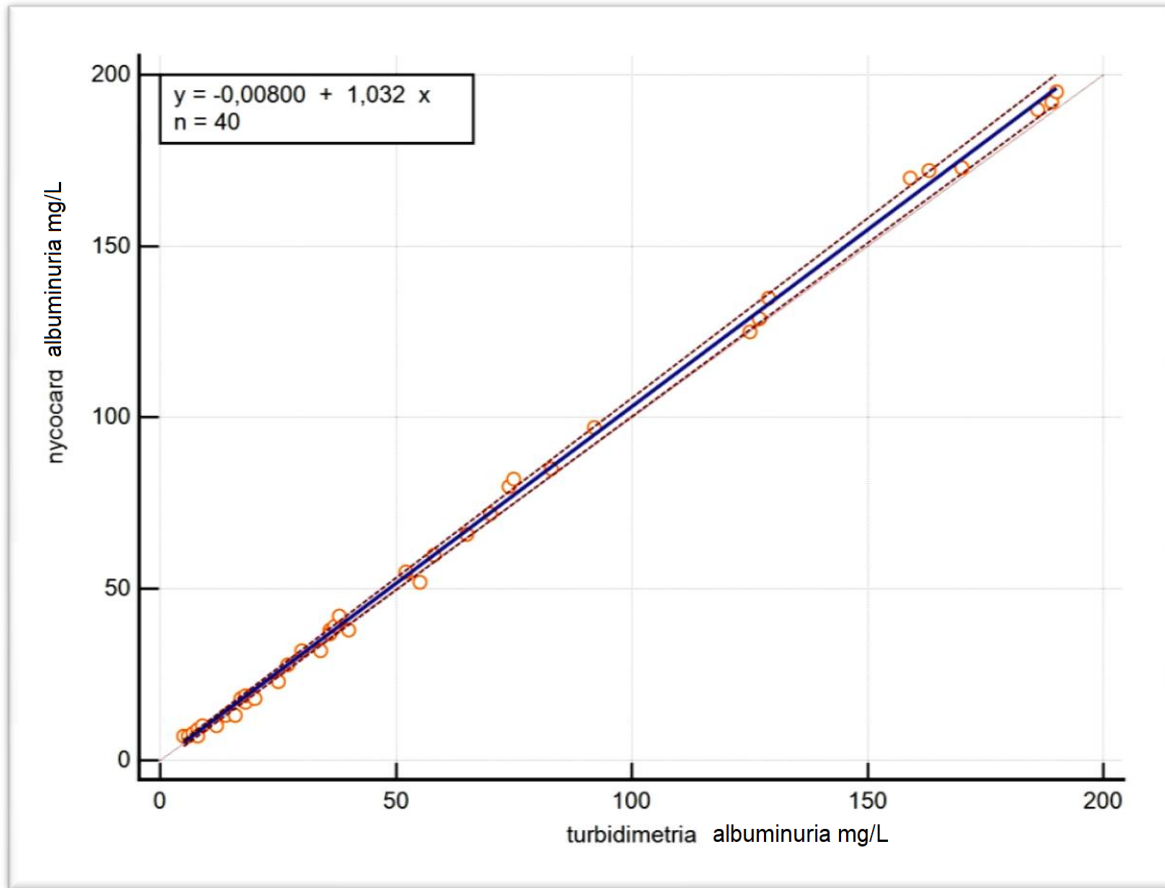


Figura 2: Recta de regresión obtenida por Passing- Bablok

En el eje de la x se representan las determinaciones de albuminuria medidas por IT y en el eje de la Y las determinaciones de albuminuria medidas por el método Nycocard. Se puede ver la recta de regresión (línea recta) e IC 95% (líneas de punto alrededor de la recta) la recta punteada central corresponde a la recta con ordenada 0 y pendiente 1.

En este análisis los parámetros de regresión y su IC 95% fueron:

Pendiente: 1,03 (1,01 a 1,05)

Ordenada al origen: - 0,008 (-0,850 a 0,888)

Los IC de 95% para la pendiente y ordenada al origen muestran que el valor 1 y 0 se encuentran contenidos respectivamente en cada intervalo, mostrando una desviación de la linealidad no significativa ($p= 0,800$). Si se tiene en cuenta la ecuación de la recta obtenida por Passing- Bablok se puede estimar la discrepancia entre el sistema Nycocard e IT en la concentración crítica (30 mg/L), esta diferencia fue de 3,33 % valor menor al establecido por VB (7%).

El gráfico de Bland-Altman (Figura 3) muestra las diferencias entre las medidas realizadas por ambos métodos. Este método muestra una distribución aleatoria alrededor del valor medio y estima un sesgo de 2,3 % entre el método Nycocard e IT, menor al permitido por VB (7%).

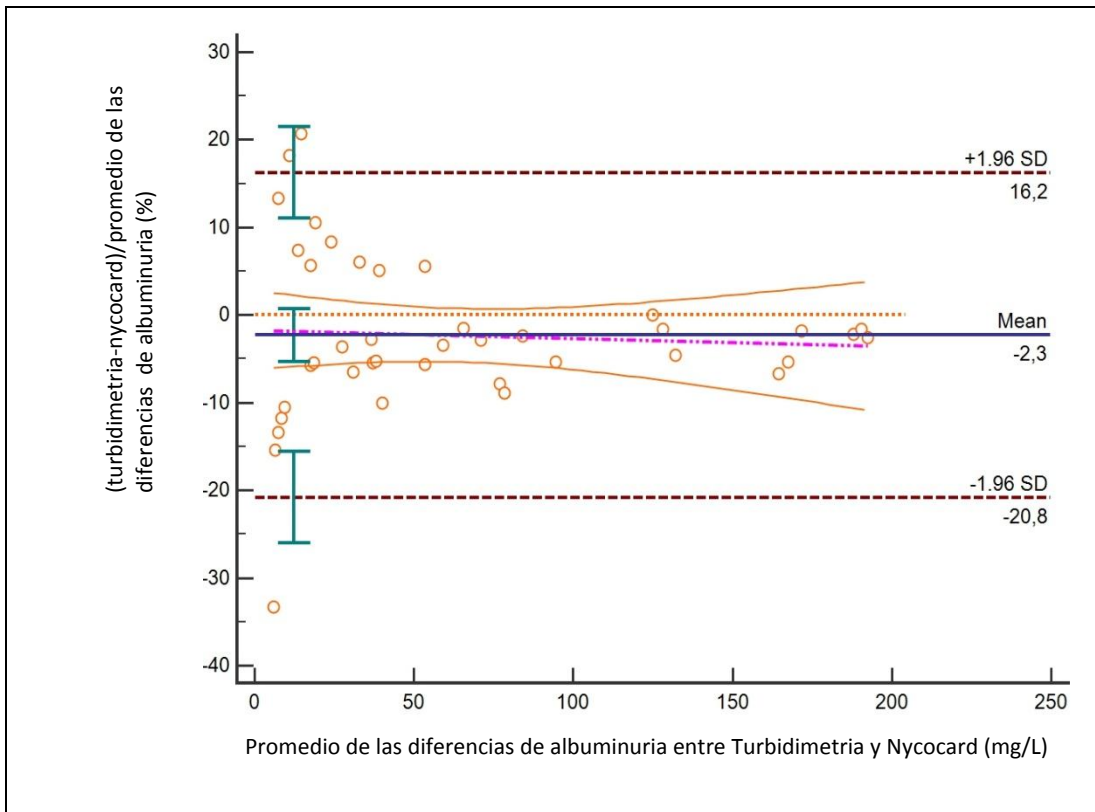


Figura 3: Gráfico de las diferencias de Bland-Altman

Las diferencias relativas (%) entre el método IT y el método Nycocard para albuminuria se muestran en el eje Y. En el eje X se muestran las medias de las diferencias entre ambos métodos. La línea recta (Azul) representa la media de las diferencias, las líneas de punto horizontales la diferencia $\pm 1,96$ desvío estándar.

Discusión y conclusión

Los resultados de este estudio arrojaron que el método POC (Nycocard) puede ser empleado para medir AU ya que mostró ser comparable al método IT en el rango de concentraciones evaluado, por lo tanto, se puede emplear el POC como método alternativo para medir AU. Las ventajas que tiene esta tecnología es su fácil utilización; el equipo es portátil, permitiendo conocer el resultado de forma rápida y confiable. Además, es el único método con que se cuenta en hospitales del interior de la Provincia de Salta para medir AU.

La variabilidad biológica intraindividual para la excreción de albumina en orina varía un 30% o más dependiendo del tipo de muestra utilizado, por lo que se recomienda realizar el diagnóstico con dos resultados positivos de tres muestras analizadas en un lapso de 3 a 6 meses¹⁷⁻²⁰. En los analitos que presentan una gran VB como lo es la albumina en orina se propone que su coeficiente de variación sea igual o menor al 15% (aproximadamente la mitad de la VB) para detectar cambios en la concentración de AU¹⁷. En el presente estudio Nycocard mostró tener un error sistemático clínicamente irrelevante o no significativo en el nivel de decisión médica de acuerdo a la ecuación de la recta de Passing- Bablok. La dispersión de los valores en la gráfica de Bland -Altman mostro ser aleatoria alrededor del valor medio, con una mayor dispersión a bajas concentraciones, el sesgo estimado por este gráfico también mostro no ser superior al establecido por los requerimientos de calidad.

Florvall G, et al. (2008) Compararon tres métodos para AU entre ellos un POC cuantitativo, el cual mostró una imprecisión muy baja (CV 3,9 %) y también buena correlación con el método de comparación, concluyendo que dicho método puede ser usado como método de *screening*, demostrando ser más sensible y específico para medir AU en una población de riesgo en relación al método semicuantitativo²¹. Parsons MP et al. (1999) validaron un estudio de POC para medir la relación albumina / creatinina en orina, este método cumplió con el requisito de imprecisión (CV < 10%) y mostro buena correlación con el método de laboratorio, aunque evidencio un error sistemático atribuibles a las diferencias en los procedimientos de calibración²². Es necesario aprobar un método de referencia para AU, se encuentra en estudio el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa por dilución isotópica (LC-IDMS) como posible candidato y también un material de referencia con un valor asignado que sea trazable al calibrador utilizado en los laboratorios de rutina, con una incertidumbre aceptable mediante un sistema de jerarquías y que sea conmutable con muestras de orina (actualmente los fabricante proveen un calibrador que emplea albumina sérica purificada)¹⁵⁻¹⁷⁻²³. De esta manera podrían establecerse requerimientos de calidad analítica a nivel regional o mundial para AU y permitir la armonización de los resultados en los laboratorios de rutina.

Se concluye que el método POC tiene muy buena correspondencia con el método IT para medir AU y que los resultados son intercambiables entre ambos métodos.

Teniendo en cuenta que el Ministerio De Salud De La Provincia de Salta proveyó de equipos POC Nycocard a los hospitales del interior, estos serían muy útiles para pesquisar pacientes, en la etapa inicial de la enfermedad renal, que no pueden concurrir a hospitales de mayor complejidad con la frecuencia necesaria.

Bibliografía

- 1-K/DOQI Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. 2002; 39 Suppl 1: S1-266
- 2- Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013; 3: S6-308.
- 3- Alegre Jorge R y colaboradores. Documento de Consenso: Implicancia de la proteinuria en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad renal crónica. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2013; 47 (3): 613-25.
- 4 Alles A, Fraga A, García R, Gómez A, Greloni G, Inserra F, Mazziotta D, Torres ML, Torres A. Detección de Enfermedad renal Crónica Documento Multidisciplinario. Artículo especial. *Nefrología, diálisis y transplante* 2010; 30(3) 110-17
- 5-Robaina Javier y colaboradores. Detección de factores de riesgo e indicadores tempranos de enfermedad renal crónica en población adulta en una campaña de salud renal. *Rev. nefrol. dial. Transpl. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.* 2013; 33 (4)
- 6- Zhang A and Huang S. Progress in Pathogenesis of Proteinuria. *International Journal of Nephrology.* 2012 1-14
- 7- Miettinen H et al. Proteinuria Predicts Stroke and Other Atherosclerotic Vascular Disease Events in Nondiabetic a Non- Insulin-Dependent Diabetic Subjects. *Stroke* 1996; 27:2033-39
- 8-Weis U,Turner B, Gibney J, Watts GF, Burke V, Shaw KM, et al. Long-term predictors of coronary artery disease and mortality in type 1 diabetes. *QJM* 2001; 94:623-30.
- 9- Forman John P, Fisher Naomi D.L, Schopick Emily L. and Curhan Gary C. Higher Levels of Albuminuria within the Normal Range Predict Incident Hypertension. *JASN* 2008 19: 1983-88
- 10- Rodrigues Marcos y Bitencourt Dias Cristiane. Artigo Original. Microalbuminuria em população não diabética como marcador precoce de nefropatía. *J. Bras. Nefrol.* 2016; 38 (2): 203-8.
- 11- Dra Subiza Ana Karina y colaboradores. Artículo original. Riesgo cardiovascular en la enfermedad renal crónica.*Rev Urug Cardiol* 2016; 31:206-2188.
- 12-Chia YC, Lim HM, Ching SM. Use of chronic kidney disease to enhance prediction of cardiovascular risk in those at medium risk. *PLoS One.* 2015.
- 13-Rossing P,Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Predictors of mortality in insulin dependent diabetes: 10 years observational follow up study. *BMJ* 1996; 313:779-84.
- 14-Allen KV,Walker JD. Microalbuminuria and mortality in long-duration type 1diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26:2389-91.

- 15- Miller WG, Bruns DE, Hortin GL, Sandberg S, Aakre KM et al. National Kidney Disease Education Program-IFCC Working Group on Standardization of Albumin in Urine. Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clin Chem* 2009; 55: 24-38
- 16-Aisha Shaikh. Comparison between Immunoturbidimetry, Size-Exclusion Chromatography, and LC-MS to Quantify Urinary Albumin. *Clinical Chem* 2008 54:1504-10
- 17- Seegmiller JC, Sviridov D, Larson TS et col. Comparison of urinary albumin quantification by immunoturbidimetry, Competitive immunoassay, and protein-cleavage Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem* 2009; 55.
- 18- Bachmann LM, Nilsson G, Bruns DE, McQueen MJ, Lieske JC, Zakowski JJ, Miller WG State of the Art for Measurement of Urine Albumin: Comparison of Routine Measurement Procedures to Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem* 2014; 60: 471-80.
- 19 – Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus Diabetes. *Care* 2011 jun; 34 (6) e61-e99.
- 20-Benozzi SF, Pennacchiotti GL. Albuminuria: consideraciones pre analíticas y analíticas. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam* 2017 Vol 51 (1).
- 21-Florvall G, Basu S, Helmersson J, Larsson A. Microalbuminuria Measured by three Different Methods, Blood Pressure and Cardiovascular Risk Factors in Elderly Swedish Males. *Analytical Chemistry Insights*.2008; 3:69-74.
- 22-Parsons MP et al. Validation of an Point of Care Assay for the Urinary Albumin: Creatine Ratio. *Clin Chem* 1999; 45 (3) 414-17.
- 23- Singh R. et al. A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of urinary albumin usin a novel ¹⁵N- isotopically labeled albumin internal standard. *Clin Chem* 2007; 53: 540-42.