

ARTÍCULO ORIGINAL

Estado de situación del estudio electroforético de proteínas en orina. Evaluación del resultado de la encuesta realizada por el Foro de Proteínas

Bovone, Nora Silvia^{1*}; Fuente, María Cristina¹; Desimone, Isabel²; Santoro, Silvina³; De Marco, Beatriz³; Baquío, María Isabel⁴; Crispiani, Isabel⁵; Ríos, Marilu⁶; Factorovich, Adriana⁷; Madalena, Leticia⁸; García, Mónica⁹; Lunazzi, Graciela⁹; Osatinsky, Raquel¹⁰; Fainberg, Gabriela¹⁰; Pérez Colman, Florencia¹¹

¹ Servicio de Bioquímica, Hospital Nacional Posadas. Morón, Buenos Aires, Argentina.

² Hospital General de Agudos Evita. Lanús, Buenos Aires, Argentina.

³ Hospital General de Agudos Gral. San Martín. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

⁴ Instituto de Bioquímica Clínica. Rosario, Santa Fé, Argentina.

⁵ Laboratorio Pérez Crispiani. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

⁶ Hospital Carlos G. Durand. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

⁷ Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

⁸ Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires (UBA). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

⁹ Hospital General de Agudos Diego Paroissen. Casanova, Buenos Aires, Argentina.

⁹ Mannlab. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

¹⁰ Diagnóstico Médico y Genómico. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

¹¹ Hospital San Juan de Dios. Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: Nora Bovone. E-mail: norasilbovone@gmail.com

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el estado de situación de los sistemas analíticos empleados, de la ejecución y de la interpretación del uroproteinograma entre once laboratorios participantes, todos integrantes del Foro de Proteínas. Los laboratorios procesaron alícuotas de las mismas once orinas que se distribuyeron entre los participantes. El acuerdo interlaboratorio se estimó a través del coeficiente Kappa de Cohen. Se encontró alta diversidad de metodologías empleadas y diferentes niveles de concentración urinaria final en la etapa pre-analítica. El coeficiente Kappa de Cohen resultó: 0,1650; IC 95%: {0,083-0,5638} indicando un acuerdo pobre. Sobre la base de estos hallazgos, se destaca la necesidad de una estandarización por consenso de esta prueba, que permita mejorar su robustez y reproducibilidad.

Palabras clave: acuerdo interlaboratorio, uroproteinograma, estandarización.

Abstract

The aim of this study was to assess the status of analytical systems, execution and interpretation of urinary protein electrophoresis in eleven participating laboratories, all members of the Protein Forum. Laboratories processed aliquots of the same eleven urines. The interlaboratory agreement was estimated using Cohen's Kappa coefficient. It was found high diversity of methodologies and different levels of urinary concentration in the pre-analytical stage. The Cohen's Kappa coefficient was 0.1650, IC 95%: {0.083-0.5638} indicated poor agreement. These findings indicate the need for standardization by consensus of this test to improve robustness and reproducibility.

Key words: interlaboratory agreement, urinary electrophoresis, standardization.

ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM
Código Bibliográfico: RByPC
Fecha de Recepción:
11/12/2015
Fecha de Aceptación:
16/04/2016

Introducción

La electroforesis de proteínas urinarias es una prueba efectuada por numerosos laboratorios clínicos^{1, 2, 3}. Existe una variedad de metodologías disponibles para su ejecución que difieren en el tratamiento inicial de la orina: concentrada frente a sin concentrar; en el soporte empleado para la electroforesis: agarosa, acetato de celulosa o po-

liacrilamida; en el medio de corrida: desnaturizante (con SDS) contra no desnaturizante; en el colorante: negro amido, violeta ácido, sales de plata.

Cada laboratorio selecciona el procedimiento que más se ajusta a sus condiciones operativas. A esta circunstancia se suma la falta de un programa de aseguramiento externo de calidad y la inexistencia de un material de referencia con el

fin de concertar el procedimiento usado.

Por otra parte, la interpretación de la corrida electroforética es subjetiva, es por eso que queda librada a la experiencia y al criterio del bioquímico que debe informar.

Finalmente, tampoco existe un consenso con respecto al tipo de informe, ya que, en la práctica es posible observar básicamente dos tipos; uno *descriptivo*, en el cual se enumeran las diferentes fracciones presentes en la electroforesis, con o sin referencia de su intensidad y otro *interpretativo*, en el que, según el criterio del profesional, se define el tipo de perfil de excreción de acuerdo con la clasificación ya conocida⁴.

Esta habilidad en la ejecución, interpretación y realización del informe del uroproteínograma, llevó a los integrantes del Foro a plantearse la necesidad de efectuar un diagnóstico de situación, que permita relevar qué metodologías emplean los laboratorios participantes, conocer el grado de acuerdo en la interpretación de los perfiles y describir el tipo de informe final que elabora cada laboratorio.

Con esta prueba piloto se propusieron tres objetivos básicos:

- Describir cuáles son los métodos empleados por los laboratorios participantes para la ejecución del uroproteínograma.
- Evaluar la concordancia entre laboratorios para la interpretación de los perfiles de excreción proteicos, obtenidos por electroforesis en muestras orina de 24 hs de recolección.
- Efectuar un relevamiento de los diferentes tipos de informe final existentes para este estudio entre los laboratorios participantes.

Es de destacar, que este protocolo fue multicéntrico y contó con la participación de once laboratorios pertenecientes al foro de proteínas de AB.

Materiales y métodos

Se procesaron 11 orinas de 24 hs de recolección, aportadas por diferentes laboratorios participantes. Cada orina fue alícuotada en 11 muestras que se conservaron a -70 °C hasta el día de su distribución y fueron procesadas dentro de las 24-48 hs de acuerdo con la propia metodología, para evitar el deterioro de la muestra y lograr así una mayor estandarización en esta etapa de la prueba.

Aquellas orinas que presentaron perfiles por sobrecarga, cuyo prototipo es la proteinuria de Bence Jones, fueron excluidas del estudio⁵. Este tipo de perfiles requiere consideraciones analíticas y criterios de interpretación diferentes al procedimiento general de evaluación de un uroproteínograma. Por esta razón, se considera que el acuerdo entre laboratorios de esta clase perfiles urinarios requieren de un diseño distinto y no serán contemplados en este estudio.

El dato de proteinuria en g/l y la diuresis acompañó a cada alícuota. Se acordó el empleo de las categorías clásicas de perfiles de excreción.

Se efectuó una enumeración de los sistemas analíticos empleados: comercial contra *in house*, agarosa frente a acetato de celulosa, orina concentrada versus sin concentrar y coloración a los efectos de mostrar y describir diferencias y similitudes metodológicas entre laboratorios.

Análisis estadístico

Para evaluar el acuerdo entre laboratorios de los perfiles observados, se determinó el coeficiente de concordancia Kappa, generalizado mediante el empleo de Epidat 3.1.

Se estimó la prevalencia (en %) del tipo de informe usado, teniendo en cuenta las categorías descriptiva e interpretativa ya referidas.

Resultados

Los métodos empleados por cada laboratorio se enumeran en la tabla I.

Se analizaron por peso molecular (SDS-PAGE), sin concentración y coloración con violeta ácido en dos laboratorios. Entre los participantes que realizaron el análisis mediante separación por relación carga/masa, tres laboratorios utilizaron agarosa de alta resolución y el mismo colorante, concentrando la orina. Dos participantes utilizaron agarosa comercial, concentración previa y colorante de sensibilidad baja, como negro amido y azul ácido; mientras que otro laboratorio lo realizó sin concentrar. Tres trabaja-

Tabla I. Métodos usados para uroproteínograma por los laboratorios participantes.

Laboratorio	Metodología
1	SDS-PAGE de Sebia / sin concentrar / violeta ácido
2	Agarosa <i>in house</i> / sin concentrar / violeta ácido
3	Acetato de celulosa <i>in house</i> / 50-100X / negro amido
4	Alta resolución de Interlab / hasta 4gr / l / violeta ácido
5	Agarosa de Sebia / 25X / negro amido
6	Alta resolución de Sebia / hasta 2 gr / l / violeta ácido
7	Acetato de celulosa <i>in house</i> / sin concentrar / tinción argéntica
8	SDS-PAGE de Sebia / sin concentrar / violeta ácido
9	Agarosa Quik gel de Helena / 10X / azul ácido
10	Alta resolución de Interlab / hasta 0.2 gr / l / violeta ácido
11	Alta resolución de Sebia / sin concentrar / violeta ácido

► En la columna de métodos se menciona el sistema analítico en el siguiente orden: Medio soporte / concentración de la orina / tinción o revelado.

Tabla II. Lectura de los perfiles informados para cada orina.

ORINA N°	PF	PGS	PGMS	PGnoS	PT	PMixto	Nueva muestra
1					10	1	
2		1	8	2			
3			6			5	
4	10	1					
5		1	3	1	2	1	3
6		1	2	5	1	2	
7			3		1	7	
8		4	3	3		1	
9		2	3	5		1	
10		9				2	
11		6	4	1			

► PF: perfil fisiológico; PGS: perfil glomerular selectivo; PGMS: Perfil glomerular de mediana selectividad; PGnoS: perfil glomerular no selectivo; PT: perfil tubular; PMixto: perfil glomérulo-tubular.

Los números dentro de cada casillero representa la cantidad de laboratorios que optaron por la correspondiente categoría.

ron con técnicas *in house*, dos de ellos con concentración y coloración de baja sensibilidad y uno con coloración de alta sensibilidad y sin concentrar.

En la tabla II se muestran los perfiles informados para cada orina, por los once laboratorios participantes. En la misma se estimó el coeficiente de concordancia K de Cohen: $K = 0,1650$; IC95%: [0,083-0,5638], cuya interpretación acerca de la fuerza de la concordancia se efectuó según la tabla III. El Kappa obtenido del acuerdo interlaboratorio resultó entre **pobre y débil**.

Con respecto al tipo de informe utilizado, la totalidad de los laboratorios (100%) usaron el tipo interpretativo. Se debe destacar, que algunos laboratorios aportaron en sus protocolos información adicional, como por ejemplo el porcentaje de la fracción albúmina, con base en la densitometría de la corrida.

Discusión

El primer objetivo propuesto fue indagar las metodologías usadas para hacer uroproteinograma. La observación de la tabla I pone de manifiesto que la mayoría de los laboratorios hacen una adaptación de las técnicas existentes según criterios propios. Es altamente variable, en la fase pre-analítica, el nivel de concentración urinario empleado. Aún los laboratorios que usan las mismas marcas comerciales, llevan la orina a una concentración final diferente. Entre los once laboratorios participantes, se observó que sólo 2 comparten estrictamente el mismo método y marca comercial.

El segundo objetivo fue evaluar el grado de acuerdo de los perfiles informados. Se estimó el coeficiente Kappa de Cohen que arrojó diferencias interlaboratorio. La variedad de condiciones pre analíticas y analíticas son factores, que sin duda afectan este resultado. Se suma a ellos, la subjetividad en la interpretación de las corridas electroforéticas.

Una observación frecuente en este tipo de estudios es

que en general el grado de acuerdo es mayor en las categorías extremas, de hecho, resulta más sencillo clasificar una orina como fisiológica, que hacerlo entre subclases de glomerulares.

En la tabla II, se puede observar que el grado de acuerdo fue bueno para PF y PT. Se estimó el coeficiente K para dichas categorías. En el caso de perfil fisiológico se reagruparon los resultados en: fisiológico y no fisiológico, arrojando un coeficiente Kappa de 0,8910, o sea el acuerdo no asociado al azar resultó ser del 89,1% de las observaciones, considerado como muy bueno. Para perfiles tubulares se reagruparon también en dos categorías: tubular y no tubular, dando un K: 0,6123, considerado como moderado.

Hay que tener en cuenta que este argumento, en realidad, reduce la complejidad del problema con respecto a lo que sucede en la práctica, en la que el bioquímico no sólo debe informar si un perfil es o no fisiológico o tubular, aunque permite exponer que éstas son categorías que no ofrecen dificultad de interpretación.

La discriminación entre los subtipos de glomerulares produjo mucha dispersión de los resultados. Si se excluyera la categoría intermedia y se utilizara sólo selectivo y no selectivo se podría mejorar el acuerdo interlaboratorio para estos perfiles, sin un impacto clínico importante. Así pues, reagrupando los resultados en tres categorías: glomerular selectivo, glomerular no selectivo (la categoría mediana-

Tabla III. Fuerza de la concordancia.

< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

mente selectivo se incluyó aquí) y no glomerulares, el K: 0,3645 es considerado un acuerdo débil. Otro factor que puede afectar estos resultados es el bajo número de muestras procesadas.

El tercer objetivo fue describir el tipo de informe, discriminando principalmente los relatos de tipo descriptivo de los interpretativos. En ese aspecto se encontró que todos los laboratorios participantes optan por informar el uroproteinograma con un relato interpretativo. Esto es, informar el tipo de perfil de excreción, glomerular y sus subtipos, tubular o mixto, facilitando la interpretación al médico solicitante.

Algunas alternativas para lograr armonizar resultados podría ser incorporar estimaciones cuantitativas de proteínas marcadoras. Sobre el tema existen numerosas propuestas en la literatura, por ejemplo albúmina e IgG ajustados por creatinina para perfil glomerular; beta 2 microglobulina, RBP, alfa 1 microglobulina ajustadas por creatinina para perfil tubular^{6,7}. Algunas sociedades de nefrología ya tienen valores de corte para estos cocientes y representan parámetros objetivos de evaluación, pero que sin duda, incrementan el costo del estudio, por lo que es necesario hacer realmente una evaluación costo/beneficio antes de pensar en su implementación.

Una alternativa atractiva es emplear SDS-PAGE como *gold estándar*, puesto que de los métodos comerciales es el que ofrece mayor sensibilidad y facilidad de interpretación de perfiles. También existe suficiente evidencia en la literatura de la utilidad que tendría el empleo sistemático del sistema SDS PAGE, el cual esté probablemente sub-utilizado en nuestro medio^{8,9,10}.

No obstante, ajustado el sistema analítico, existen otros componentes que contribuyen a la variabilidad. De entre estos, sin duda la interpretación del bioquímico que observa las corridas puede ser un factor crucial, así como la concentración urinaria pre-analítica, altamente variable en este estudio.

En conclusión, esta prueba piloto puso en evidencia la imperiosa necesidad de una estandarización por consenso de la misma. Las variantes descriptas en las condiciones pre-analíticas y analíticas, la falta de método de referencia y de material de referencia, que permita concertar las técnicas, redundan en una alta variabilidad interlaboratorio.

Esta prueba ocupa un lugar relevante en la detección de cadenas livianas libres monoclonales (proteína de Bence Jones), que es su principal uso clínico. Sin embargo, su falta de robustez pone en duda su utilidad en la valoración del paciente enfermo renal y explica su ausencia en la mayoría de los consensos efectuados por expertos sobre proteinuria y valoración de enfermedad renal crónica. No obstante, como complemento del informe de proteinuria cuantitativa u otros marcadores de lesión renal, como los cocientes albúmina/creatinina y proteína/creatinina, la electroforesis urinaria puede ser una herramienta valiosa.

Sin duda la estandarización deberá abarcar no sólo los

aspectos metodológicos y su control de calidad, sino también la unificación de criterios de interpretación y el entrenamiento de los profesionales que informan este estudio. En esta instancia, es fundamental el aporte de expertos pertenecientes a universidades, sociedades científicas y proveedores de equipos, que tienen contacto directo con los fabricantes, para aunar necesidades y encontrar un camino común hacia la optimización de este *test*.

Mientras tanto, es conveniente considerar al uroproteinograma como una prueba que tiene validez interna en su aplicación, o sea es útil cuando se hace dentro del mismo laboratorio, a los efectos de seguimiento del paciente con enfermedad renal crónica, empleando el mismo sistema analítico y los mismos criterios de lectura de perfiles.

Referencias bibliográficas

1. Madalena L, Pandolfo M, Facio ML, Garlatti C, Alejandre M, Bresciani PD, Angerosa M, Pizzolato M. Proteinuria: lesión estructural renal y comparación de métodos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2013;47(1):85-93
2. Factorovich A., Comparación entre los tipos de proteinuria en una población pediátrica. *Bioquímica y Patología Clínica*. 2015;79(1):16-20.
3. De Marco B. Valoración de la proteinuria en la enfermedad renal: evaluación metodológica. *Bioquímica y Patología Clínica* 2015;79(1):26-30.
4. Baquío M, Solai M, Puglessi H. Importancia del informe del uroproteinograma. *Bioquímica y Patología Clínica* 2015;1:41-43.
5. Maisnar V, Hernychova L, Spacilova J, Tichy M, Stulik J, Friedecky B. *et al.* The problems of proteinuria measurement in urine with presence of Bence Jones protein. *Clin Biochem* 2011;44:403-5.
6. Lambers Heerspink H, Gansevoort R, Brenner B, Cooper M, Henrik Parving H. *et al.* Comparison of different measures of urinary protein excretion for prediction of renal events. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1355-60.
7. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int*. <http://www.kidney-international.org>
8. Suhail SM, Woo KT, Tan HK, Wong KS. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of urinary protein in acute kidney injury. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2011;22:739-45.
9. Lau K, Woo K. SDS-PAGE is underutilised as a tool for investigating renal patients. *Nephron* 2002;90:227-29.
10. Facio ML, Madalena L, Bresciani P, Pandolfo M, Kairúz A, Alejandre M. *et al.* Evaluación del perfil tubular renal mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida). *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2006; 2006;40(3):383-90.