

ARTÍCULO ORIGINAL

Ensayo de validación de un concentrador urinario para la realización de uroproteínogama

Validation test of a urinary concentrator used for urinary protein electrophoresis

Giani Miriam, Patricia^{1*}; Villagran, Daniela¹; Bovone, Nora Silvia¹

¹Laboratorio de Proteínas y Autoinmunidad, Servicio de Bioquímica, Departamento de Diagnóstico y Tratamiento, Hospital Nacional, Prof. A. Posadas. El Palomar, Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Giani Miriam, Patricia. Hospital Nacional Prof. A. Posadas, Barabino 2351, San Antonio de Padua, CP1718, Buenos Aires, Argentina; inmunidadhumoral@gmail.com.

Resumen

Introducción: El uroproteínogama se emplea en el laboratorio clínico para definir el perfil de excreción proteica como indicador de daño renal en pacientes con proteinuria y también, en la detección de componentes monoclonales, complementando el diagnóstico de patologías como mieloma múltiple y amiloidosis. Con anterioridad a la electroforesis, la orina debe ser concentrada. Para ello se usan dispositivos concentradores comercialmente disponibles cuyo desempeño debe ser validado según los requisitos de cada laboratorio. **Objetivo:** Validar un concentrador de tipo centrífugo marca Vivaspin 6 de Sartorius, con peso molecular de corte de 10 kDa. **Materiales y métodos:** En una primera etapa, se seleccionaron 11 muestras de orina con proteinurias que variaron desde fisiológicas (200 mg/24 h) hasta nefróticas. Se concentraron durante 30 minutos a 3400 rpm, con volumen inicial de 6 ml y de cada concentrado se realizó un uroproteínogama. En una segunda etapa, se prepararon tres mezclas de una orina fisiológica con concentraciones de 25, 50 y 100 mg/dl de cadena liviana kappa, obtenida de un paciente con proteinuria tipo mielomatosa conocida, y se concentraron con idéntico protocolo. El uroproteínogama se realizó con método manual, en acetato de celulosa y tinción con negro amido. **Resultados:** Los concentrados oscilaron entre 10 y 60x y en las electroforesis realizadas en ambas etapas, se visualizaron las fracciones proteicas de interés clínico. **Conclusiones:** Se alcanzó el requisito propuesto. Para estandarizar, se decide trabajar a tiempo variable, llevando a volumen final entre 100 y 200 µl y concentración entre 30 y 60x.

Palabras clave: uroproteínogama, concentrador urinario, ensayo de validación.

Abstract

Introduction: In clinical laboratory, urinary protein electrophoresis is used to define the excretion profile as an indicator of kidney damage in patients with proteinuria and to detect monoclonal components present in urine in patients with myeloma and amyloidosis. Prior to electrophoresis, urine must be concentrated by means of commercially available devices, whose performance must be validated according to the requirements of each laboratory. **Objective:** To validate a Sartorius Vivaspin6 centrifugal-type concentrator with a cut-off molecular weight of 10 kDa. **Materials and methods:** Eleven urine samples with protein content that ranged from physiological (200 mg / 24 h) to nephrotic were selected. Samples were concentrated for 30 minutes at 3500 RPM with an initial volume of 6 ml and then each concentrate was electrophoresed. In a second stage, three mixtures were prepared with concentrations of 25, 50 and 100 mg/dl of the kappa light chain obtained from a patient with known myelomatous-type proteinuria. These were concentrated with the same protocol. Electrophoresis was performed by manual method in cellulose acetate, staining with amido black. **Results:** The concentrates ranged between 10 and 60x and the protein fractions of clinical interest were visualized in the electrophoresis. **Conclusions:** The proposed requirement was met. To standardize it, it was decided to work at variable times, leading to a final volume between 100 and 200 µl and concentration between 30 and 60x.

Key words: urine protein electrophoresis, urinary concentrator, validation test.

Introducción

La electroforesis de proteínas urinarias es un test empleado en el laboratorio clínico para la evaluación cualitativa o semicuantitativa del perfil de excreción de proteínas, que se asocia a numerosas patologías que tienen compromiso renal y están acompañadas de proteinuria. La clasificación de este perfil en *glomerular*, con sus diferentes grados de selectividad, *tubular* o *mixto* es un marcador de daño renal y junto al dato cuantitativo de la proteinuria, representa una valiosa información en la valoración inicial de estos pacientes^{1,2}.

Una de las aplicaciones más importantes es la detección de la llamada *proteinuria por sobrecarga*, que acompaña las discrasias de células plasmáticas³ como mieloma múltiple y amiloidosis en las cuales la búsqueda de cadenas livianas libres monoclonales, clásicamente llamada *proteinuria de Bence Jones* (PBJ), tiene implicancias tanto en el diagnóstico como en la evaluación de la respuesta a la terapia en estos pacientes. *The International Myeloma Working Group*⁴ recomienda que la electroforesis de proteínas urinarias seguida de una inmunofijación (IF) sea hecha en estos pacientes en la etapa diagnóstica. Asimismo, durante el tratamiento, la disminución o desaparición del componente monoclonal en suero y/u orina es empleada como indicador de la respuesta y tiene implicancias en la toma de decisiones médicas.

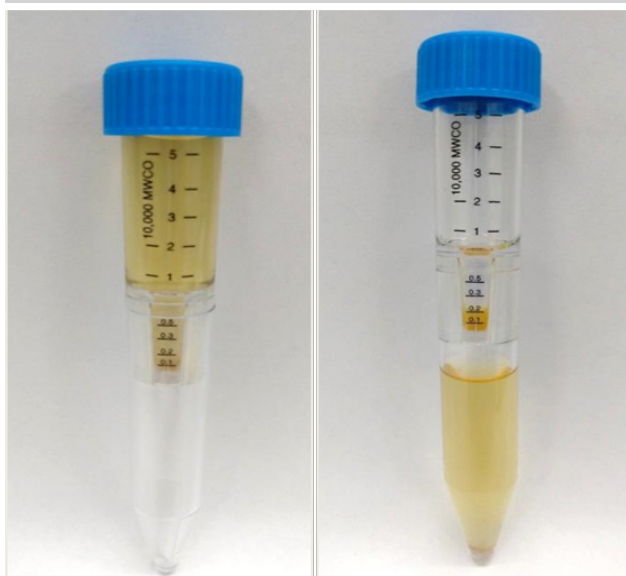
Dado que la excreción proteica es variable a lo largo del día y dependerá de factores poco controlables como la dieta, el ejercicio, la ingesta de líquido o la medicación del paciente, es necesario emplear orina de 24 h para la realización de esta prueba⁵. Con respecto a los métodos, existen varias opciones disponibles a elección de cada laboratorio: manuales o automatizados, en soporte como agarosa y acetato de celulosa o bien, por electroforesis capilar, basada en el principio de la electroforesis libre. Existen métodos que emplean medios desnaturizantes como el dodecilsulfato de sodio⁶, cuyo principio de separación es el tamaño molecular, a diferencia de los medios no desnaturizantes, que separan las proteínas en función de la carga o la relación carga/masa. Salvo en los procedimientos que emplean tinción de alta sensibilidad como la tinción argéntica, en los casos donde la tinción se efectúa por afinidad a colorantes como el negro amido, se requiere concentrar la orina a los efectos de alcanzar la sensibilidad del método electroforético seleccionado. En general, esta información la provee el propio fabricante, no obstante, un requerimiento mínimo de 2-3 g/dl son necesarios para tener la sensibilidad adecuada. Además, si la orina debe ser inmunofijada, también debe emplearse un concentrado de la misma. Así pues, el procedimiento de concentración de la orina previo a la electroforesis o a la inmunofijación requiere el uso de dispositivos que deben ser anteriormente evaluados por el laboratorio a los efectos de conocer su desempeño y estandarizar dicho procedimiento. Los dispositivos de origen comercial emplean membranas de ultrafiltración capaces de impedir el paso de moléculas en función de su peso molecular por lo que son

selectivamente retenidas en el ultrafiltrado, dependiendo del tamaño del poro de dicha membrana. Esta selectividad se conoce como *peso molecular cut off* (PMCO) y es una información que resulta indispensable a la hora de elegir el concentrador. Si se considera cuáles son las proteínas de interés en la electroforesis urinaria, además de albúmina (65 KDa) y otras alfa y beta globulinas séricas, son de relevancia clínica moléculas proteicas más pequeñas como las microproteínas de origen tubular, entre las que se encuentra la beta-2 microglobulina (marcadora de proteinuria tubular), cuyo peso molecular es de alrededor de 12 KDa, y las cadenas livianas libres kappa y lambda, cuyo peso molecular oscila entre 22 y 25 KDa. Por lo tanto, el concentrador de elección debe ser aquel cuyo PMCO sea del orden de 10 KDa o menor. Mientras las proteínas son selectivamente retenidas, agua, sales y moléculas pequeñas pasan a través de la membrana produciendo una reducción del volumen y logrando la concentración de las mismas en la muestra de orina. El pasaje de agua a través de la membrana puede lograrse aplicando fuerza centrífuga (concentradores centrífugos) o colocando material absorbente detrás del filtro (concentradores de camisa). En general, los concentradores de origen comercial se acompañan de información acerca de su desempeño, la carta de concentración, teniendo en cuenta variables como volumen inicial y final de la muestra, tiempo de concentración y principalmente, composición del contenido proteico recuperado en el ultrafiltrado, prestando particular atención a las proteínas de relevancia clínica como las ya mencionadas. Es función del bioquímico verificar dicho desempeño a los efectos de poder estandarizar el

Tabla I. Rangos de proteinuria de las orinas ensayadas.

	Muestra	Diuresis (ml)	*Pt(g/l)	Pt/24h (g/l)
Menor 1g/24h	1	4000	0,06	0,24
	2	2800	0,20	0,56
	3	2300	0,12	0,28
	4	1100	0,50	0,16
Entre 1-2 g/24h	5	1400	0,70	0,98
	6	1300	1,40	1,61
	7	1050	1,55	1,63
Mayor 3 g/24h	8	200	1,82	3,64
	9	1400	4,28	5,90
Mielomatsas	10	3000	0,61	1,83
	11	3000	0,15	0,45

►*Pt, proteinuria.

Figura 1. Concentrador Urinario tipo centrífugo.

► Izquierda: concentrador cargado antes de centrifugar. Derecha: post centrifugación durante 30 minutos. Se observa un volumen final de 200 μ l.

procedimiento de concentración previo a la electroforesis.

En el presente estudio, se efectuó un ensayo de validación de un concentrador urinario del tipo centrífugo, Marca Vivaspin 6 de 10 kDa fabricado por Sartorius (Goettingen, Alemania). El objetivo fue lograr concentrados de al menos 30x, con una composición proteica que mostrara las fracciones de interés clínico y permitiera la clasificación cualitativa del perfil de excreción de acuerdo con el uso previsto para la electroforesis de orina.

Materiales y métodos

El procedimiento se llevó a cabo en 2 etapas: etapa I) Verificación cualitativa/ semicuantitativa del proceso de concentración a través de la electroforesis de orinas que abarcan amplio rango de proteinuria, posteriormente a su concentración en condiciones controladas. Se tuvo en cuenta: volumen inicial, volumen final, tiempo y velocidad de centrifugación como variables a controlar; etapa II) Ensayo de recuperación de cadenas livianas libres kappa.

A continuación, se detallan cada una de las etapas.

• Etapa I

Durante el mes de julio del 2021 se seleccionaron 11 muestras de orina de 24 h, con base en diferentes rangos de proteinuria:

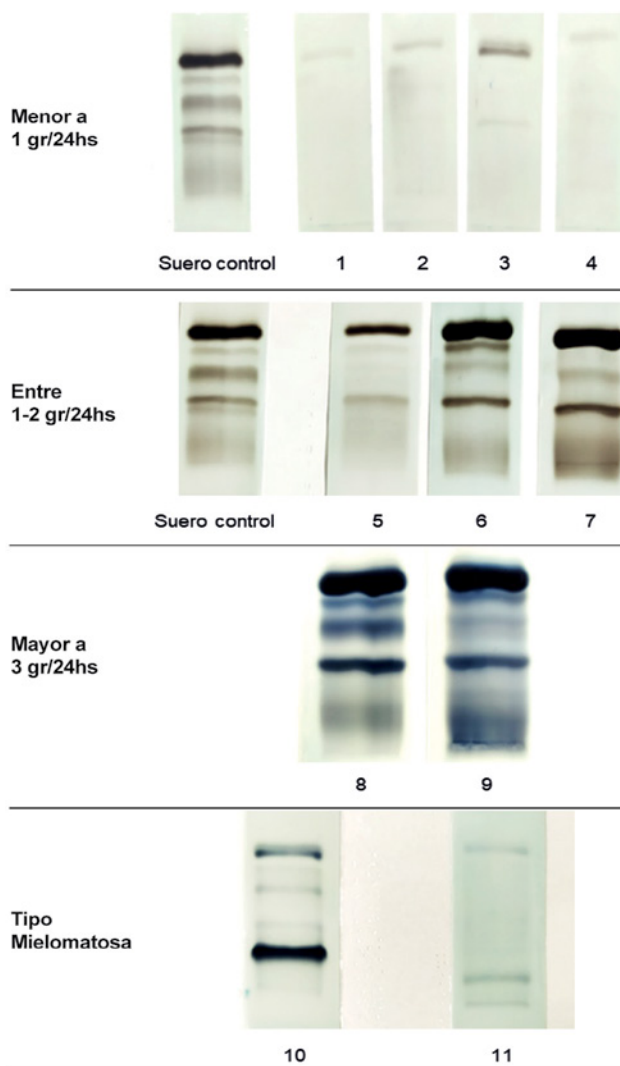
I) Proteinuria menor que 1 g/24 h

II) Proteinuria en rango intermedio: de 1 a 2 g/24 h

III) Proteinuria en rango nefrótico: mayor que 3 g/24 h

IV) Proteinuria de tipo mielomatosa: se citaron 2 pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple y antecedentes de proteinuria de Bence Jones positiva.

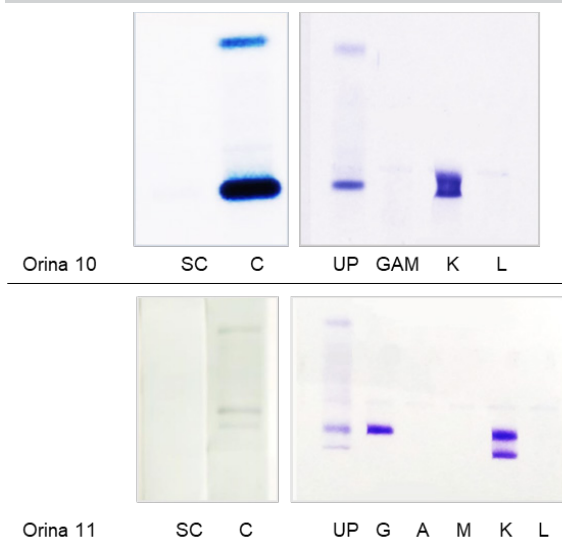
Las muestras provenían de pacientes que asistían al hospital y tenían solicitud de proteinuria. El método em-

Figura 2. Uroproteínogramas de las orinas ensayadas.

► Electroforesis en acetato de celulosa de los concentrados luego de 30 minutos de centrifugación.

pleado para medirlas fue la turbidimetría con cloruro de bencetonio automatizada en COBAS C 501 de Roche. En la tabla I, se observan los valores de las orinas seleccionadas. Cada orina fue procesada el mismo día de su recepción y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En un primer paso, se centrifugó una alícuota de 10 ml durante 15 minutos a 1500 rpm a los efectos de eliminar todo material particulado que pudiera obstruir el poro de la membrana. Se tomaron 6 ml del sobrenadante y se cargó el concentrador en toda su capacidad. Se centrifugó un tiempo total de 30 minutos a 3400 rpm, con una parada a los 15 minutos. A modo de orientación inicial, el fabricante recomienda tiempos de centrifugación del orden de 20 - 30 minutos, con paradas intermedias para ir monitoreando el progreso de la concentración producida en función de la reducción de volumen y poder obtener de esta manera la carta de concentración en las condi-

Figura 3. Uroproteinograma e inmunofijación de las orinas tipo mielomatosas.



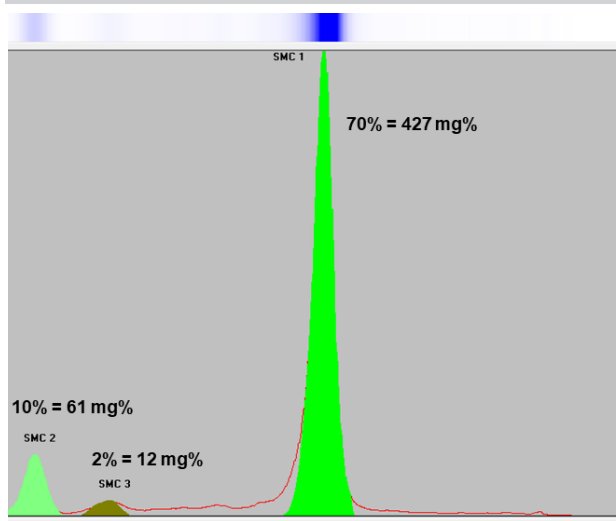
- ▶ Arriba: uroproteinograma (UP) en agarosa de orina 10 sin concentrar (SC) y concentrada (C). A la derecha, se muestra IF de orina concentrada con anti GAM trivalente, anti kappa y anti lambda. Abajo: uroproteinograma (UP) en acetato de celulosa de orina 11 sin concentrar (SC) y concentrada (C). A la derecha, se muestra IF con antisueros mono-específicos de orina concentrada.

ciones operativas del laboratorio. La velocidad de centrifugación, además del tiempo, es otra variable a tener en cuenta. Ambas son dependientes de las características técnicas de la centrífuga de que se disponga en el laboratorio, por lo tanto, estos primeros ensayos son del tipo de prueba y error. Se empleó una centrífuga de mesada marca Presvac, modelo DCS-16RVT Plus con rotor oscilante modelo CP-16. Se registró el volumen obtenido en cada parada. A los efectos de ilustrar el proceso, en la figura 1, se puede observar el dispositivo cargado con orina antes y al cabo de 30 minutos de centrifugación de la muestra nº 4. Al cabo de los 30 minutos, se extrajo el concentrado y se realizó una corrida electroforética con método manual sobre acetato de celulosa gelatinizado en *buffer* tris barbital, 45 minutos a 170 V y tinción con negro amido. Además, las orinas de tipo mielomatoso se inmunofijaron a partir del mismo concentrado que la electroforesis. Se empleó IF en agarosa automatizada con instrumento G26 de Interlab (Roma, Italia).

- Etapa II

Con el objetivo de verificar la recuperación de cadenas livianas libres, se ensayó el siguiente protocolo: se seleccionó una orina de un paciente conocido con mieloma múltiple y PBJ kappa (correspondiente a la orina nº 10). Se realizó una semicuantificación de la cadena liviana libre monoclonal a partir de la densitometría del uroproteinograma y la proteína total urinaria (ver Figura 4). La corrida electroforética se realizó en agarosa automatizada con instrumento G26 de Interlab. Con la

Figura 4. Densitometría de la muestra de orina nº 10.



- ▶ Estimación semicuantitativa del pico a cadena liviana kappa. Se muestran los porcentajes de área bajo la curva y su equivalente en valor absoluto a partir de una proteinuria de 610 mg/l.

concentración estimada de cadena kappa, se agregó en volumen creciente a una orina fisiológica (diuresis: 1350 ml/24 h, proteinuria: 0,13 g/l y albuminuria: 0,66 mg/dl) hasta obtener concentraciones finales de 25, 50 y 100 mg/l de PBJ kappa. En la tabla III, se muestra el protocolo de preparación de estas mezclas. Cada mezcla fue concentrada durante 30 minutos a 3400 rpm. Al cabo de ese tiempo, se realizó una electroforesis en acetato de celulosa.

Resultados

La carta de concentración obtenida en la primera etapa se muestra en la tabla II, donde se registraron los volúmenes finales luego de 15 y 30 minutos de centrifugación a 3400 rpm y se calculó el factor de concentración obtenido a partir del volumen inicial de 6 ml. Los uroproteinogramas de los concentrados obtenidos a los 30 minutos se muestran en la figura 2. En los grupos que tenían proteinurias inferiores a los 2 g/24 h, se empleó un suero como control de electroforesis, que corresponde a la calle señalada como *suero control*. Las orinas con perfiles de tipo mielomatoso (nº 10 y 11) se inmunofijaron y los resultados se muestran en la figura 3, en tanto que los de la etapa II se muestran en la figura 5.

Discusión

De acuerdo con lo observado en la tabla II, los niveles de concentración oscilaron dentro de un rango de 15 - 60x, con volúmenes finales desde 0,4 a 0,1 ml, con excepción de la orina nº5, que concentró más lentamente. La amplitud del rango de concentración obtenido trabajando con un volumen inicial constante de 6 ml para todas las orinas y tiempo total de 30 minutos responde a la elevada variabilidad bioló-

Tabla II. Carta de concentración.

Muestra	Pt (g/l)	15 min		30 min	
		*Vf (ml)	**Factor	Vf (ml)	Factor
1	0,06	0,8	7,5x	0,3	20x
2	0,20	1	6x	0,4	15x
3	0,12	0,2	30x	-----	-----
4	0,15	2	3x	0,2	30x
5	0,70	2,5	2x	0,8	7.5x
6	1,24	0,8	8x	0,1	60x
7	1,55	1,8	3x	0,2	30x
8	1,82	2	3x	0,2	30x
9	4,28	2	3x	0,25	23x
10	0,61	-----	-----	0,15	40x
11	0,15	-----	-----	0,30	20x

► *Vf, volumen final; **factor, factor de concentración obtenido a partir de volumen inicial de 6 ml.

gica interindividual de la orina. El volumen del concentrado es un factor importante a considerar, puesto que debe ser el suficiente para la realización de una electroforesis y una IF, en el caso de ser necesaria, y para esto se requiere un mínimo de 150 - 200 µl. Si se observa la figura 1, el diseño de este dispositivo permite una carga completa de 6 ml de orina y al mismo tiempo, llevarla a un volumen final de 100 µl concentrando 60X, en tanto que a volumen final de 200 µl, la orina concentra 30X. De acuerdo con lo expuesto en la carta de concentración de la tabla II, en 6 de los 11 ensayos, se alcanzaron o superaron los 30x en 30 minutos de centrifugación con volúmenes finales que oscilaron entre 100 y 200 µl. Es importante observar que el fabricante propone la alternativa de recuperar aquellas orinas excesivamente concentradas agregando el volumen deseado de sobrenadante o agua

destilada. También se ofrece la posibilidad de utilizar un volumen inicial menor para acortar los tiempos, sobre todo en las orinas de tipo nefrótico. De acuerdo con los requisitos del laboratorio, los resultados son satisfactorios si se alcanza la meta de concentrar al menos 30x, con volumen final de 200 µl, en un tiempo aceptable de 30 minutos. Para orinas que concentraron más lentamente se prolongó el tiempo de centrifugación hasta alcanzar la concentración deseada.

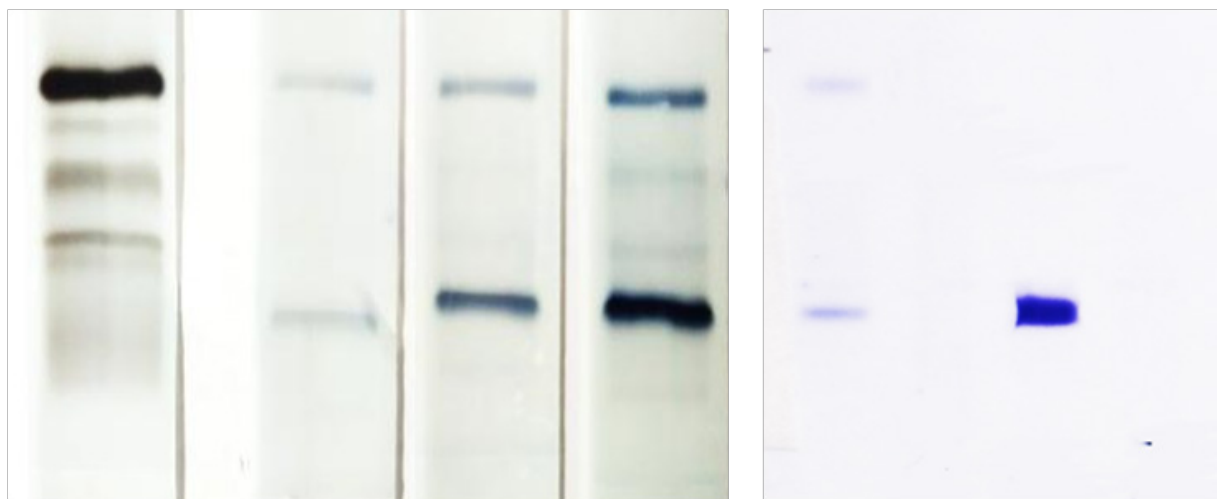
La composición de los concentrados se muestra en la figura 2. En general, se observa un incremento en la intensidad y cantidad de fracciones proteicas apreciables con el incremento de la proteinuria y factor de concentración. No se observan artefactos y es posible reconocer los diferentes perfiles y selectividades.

Una debilidad del presente estudio es la no inclusión de al menos una orina con perfil tubular, ya que las microproteínas del orden de 12 KDa de peso molecular tienen un tamaño muy próximo al PMCO de 10 KDa. No obstante, dado que la principal aplicación del uroproteinograma en este laboratorio es la detección de PBJ, resulta relevante destacar los hallazgos con las orinas tipo mielomatosas. Estos resultados se muestran en la figura 3, donde se observa el efecto del proceso de concentración cuando se contrasta la electroforesis de la orina concentrada con la de la orina sin concentrar. Además, las bandas observadas fueron identificadas por IF. Es de notar que estas orinas eran proteinúricas (mayores que 200 mg/24 h) y que la fracción principal en la electroforesis era la cadena liviana libre monoclonal, por lo tanto, se decidió realizar un ensayo de recuperación cualitativo/semicuantitativo, trabajando con orinas con cantidades conocidas de cadena liviana monoclonal e inferiores al nivel fisiológico. Las concentraciones ensayadas se muestran en la tabla III y las electroforesis, en la figura 5. Se observó la banda monoclonal aun con la concentración de 0,025 g/l y las intensidades crecientes de la banda observada en el resto de las corridas son un hallazgo consistente con el incremento de la concentración de cadena liviana agregada, habida cuenta de que las tres muestras concentraron entre 30 y 60x. De acuerdo con estos resultados, la sensibilidad para la detección de PBJ es de al menos 0,025 g/l, bajo las condiciones operativas descritas. Dada la intensidad de la banda en la corrida PBJ de 25 mg/l de la figura 5, es probable que

Tabla III. Protocolo para la preparación de mezclas con concentraciones conocidas de cadenas livianas libres kappa.

CL KAPPA (mg/l)	Volumen orina nº 10 (ml)	Volumen orina F (ml)	Vt	Vf	Factor
25	0,35	5,65	6,00	0,2	30x
50	0,70	5,30	6,00	0,1	60x
100	1,40	4,60	6,00	0,1	60x

► F, fisiológica; Vt, volumen total; Vf, volumen final luego de 30 minutos de centrifugación.

Figura 5. Electroforesis e inmunofijación del ensayo de recuperación de cadenas livianas libres kappa.

► Izquierda: uroproteinograma. Debajo de cada tira se indica la concentración de cadena liviana en mg/l. Derecha: inmunofijación de la orina con 25 mg/l de cadena kappa.

resulten detectables niveles inferiores, pero esto no ha sido ensayado. En la misma figura, se observa la IF de la mezcla PBJ de 25 mg/l que identifica la cadena liviana kappa con el componente monoclonal observado en la electroforesis, como era de esperar.

Otra debilidad de este estudio es que no se ha ensayado la cadena liviana lambda, aunque considerando que tiene similar peso molecular, se puede inferir una recuperación comparable con la obtenida para cadena kappa, pero esto no ha sido probado.

Estos resultados fueron satisfactorios, ya que se logró alcanzar el requerimiento propuesto. Así pues, se decide trabajar con volumen inicial a capacidad completa de 6 ml, centrifugando a 3400 rpm, llevando a volumen final de 150 - 200 μ l y tiempo variable, según cada muestra. Con este procedimiento se logra un rango de concentración de 40 - 60X en un tiempo que oscila entre 30 y 40 minutos. Finalmente, es de remarcar la importancia que tienen las especificaciones técnicas de la centrifuga, ya que la fuerza g aplicada dependerá del tipo de rotor (fijo o basculante), de su diámetro, de la velocidad. Ello significa que cada laboratorio deberá evaluar las condiciones del ensayo y definir sus propios requisitos a los efectos de lograr la estandarización del procedimiento.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer la valiosa colaboración de la bioquímica Fabiana Vommaro, Jefa del laboratorio de Química Clínica y Orinas y a la Sra. Patricia Minguillon, técnica del laboratorio de Química Clínica y Orinas, quienes con su trabajo han contribuido a recolectar todo el material empleado en el presente estudio.

Asimismo, se agradece a la empresa Sartorius Argentina S.A. por el aporte de los concentradores urinarios.

Referencias bibliográficas

1. Ehrlich JH, Wurster U. Differentiation of proteinurias with electrophoresis. *Pediatr Nephrol.* 1991; 5(4):376-8.
2. Winter, W.E. Urine Protein Electrophoresis. In: Harris, N.S. & Winter, W.E. editors. *Multiple Myeloma and Related Serum Protein Disorders: An Electrophoretic Guide.* 1st ed. New York: Demos Medical Publishing; 2012.p. 83 – 115.
3. Crispiani, I. Proteinuria en discrasias de células plasmáticas. *ByPC* 2015; 79(1):37-40.
4. International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. Consensus Recommendations for Standard Investigative Workup: Report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*, 2011; 117(18), 4701-5.
5. Bovone, NS. Desde las Guías de Práctica Clínica al Laboratorio: resumen de los tópicos de laboratorio más relevantes en los documentos de consenso sobre diagnóstico y seguimiento del paciente renal crónico. *ByPC* 2015; 79(1):21-25.
6. Salihu S, Toseska K, Aluloska N, Gucev Z, Cekovska S, Tasic V. The Spectrum of Kidney Diseases in Children Associated with Low Molecular Weight Proteinuria. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences.* 2018; 6(5):814-819.