

## COMUNICACION BREVE

*Un método inmunonefelométrico con rayo láser para la determinación de microalbuminuria*

G. García Bulnes, D. González Bárcena\*, A. Ibarra\*, A. Pérez López\*\* y J. E. Exaire\*\*\*

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas. Jefatura de Investigación Médica, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Departamento de Endocrinología\*, Unidad de Trasplante\*\*, División de Medicina\*\*\*. Hospital de Especialidades, Centro Médico La Raza, IMSS, México DF.

**Introducción**

Los capilares basal del glomérulo normal restringen casi en su totalidad el paso de moléculas de gran tamaño, como la albúmina. Cuando se inicia el daño glomerular, como en el caso de la nefropatía diabética, los capilares permiten el paso de proteínas de diferentes tamaños moleculares. Detectar esta patología en su principio no era posible debido a la escasa sensibilidad de las técnicas para cuantificar albúmina en la orina; anteriormente era posible diagnosticar esta nefropatía cuando las concentraciones de aquélla ya alcanzaban magnitudes de miligramos (albuminuria clínica), o sea cuando el daño glomerular ya se hallaba en fases avanzadas e irreversibles.

Con el radioinmunoanálisis modificado<sup>1</sup> para la determinación de pequeñas cantidades de albúmina en orina a nivel de microgramos (albuminuria subclínica o microalbuminuria) es posible conocer en qué momento se inicia el daño glomerular en la nefropatía diabética. Asimismo su importancia para predecir el futuro de la misma es relevante<sup>2</sup>. Claramente conviene disponer de métodos alternativos, posiblemente menos costosos. Se presenta aquí la validación de un método inmunológico específico y sensible. Se funda en la precipitación de albúmina en pequeños volúmenes de orina (µl) con un anticuerpo antialbúmina humana. La determinación de la concentración

de los complejos (Ag-Ac) se efectúa por nefelometría láser, lo que lo hace reproducible y exacto.

**Material y método**

El fundamento del método es el siguiente:

Antígeno (Ag)	+	Anticuerpo (Ac)	►	Ag-Ac
Albúmina humana		Suero de conejo anti-albúmina humana		Complejo precipitado

Para procesar la curva de calibración se utilizó albúmina humana del Instituto Merieux Lyon, Francia (lote núm. O67,303H), suero de conejo anti-albúmina humana para nefelometría de los laboratorios Behring (s.a.p.a. Hoescht Behring), OSAL 04/05 (lote núm. B. 153916A), solución de cloruro de sodio al 0,9 % de concentración, a la que se le agrega detergente (Tween 20) a razón de 0,15 ml por litro. Esta solución se utiliza para hacer las diluciones de la albúmina humana y del anticuerpo, así como para llevar a 100 µl las muestras de orina.

La curva de calibración se procesa con las siguientes concentraciones de albúmina: 0,01 0,1 56, 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5 y 5,0 µg en 100 µl c/u de cada concentración, y por duplicado se depositan 100 µl directamente en las celdillas para nefelome-

Recibido: 23-III-92  
En versión definitiva: 9-XII-93.  
Aceptado: 9-XII-93.

Correspondencia: Dr. J. Emilio Exaire.  
Hospital Especial del Centro Médico La Raza.  
Seris y Zaachila, s/n.  
C.P. 02990 -México D.F.

tría láser (Behring OVEI 0,4/0,5), se les agregan 200 ul del antisuero anti-albúmina humana diluido 1:10 c/u de las celdillas, se agitan y se dejan a temperatura ambiente por una hora.

Las muestras de orina se centrifugan a 2.000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C, se decantan y del sobrenadante se toman 20 ul, que se depositan directamente en la celdilla para nefelometría. Se complementa el volumen con 80 ul de solución salina Tween 20 y se procede igual que en la curva de calibración.

Las lecturas se hacen en el Behring Laser Nephelometer Mod. -B, que se encuentra conectado a una computadora Hewlett Packard mod. 9815-A, cuyo casete se programa previamente con las concentraciones y las lecturas correspondiente de voltaje, obtenidas de la curva de calibración en el nefelómetro láser.

La computadora informa directamente los ug/100 ul de albúmina en las muestras de orina.

Con el objeto de obtener las cifras normales de microalbuminuria por este método se solicitó la colecta de orina de 24 horas a 14 sujetos sanos (residentes médicos y personal de laboratorio). También se estudió un grupo de 47 pacientes adultos que asisten para su control a la Clínica de Diabetes Tipo I del Hospital de Especialidades del Centro Médico La Raza, del IMSS.

Los pacientes fueron hospitalizados para evaluar diversas complicaciones de la diabetes mellitus, entre las que se incluyó la microalbuminuria de 24 horas. En este grupo, los períodos de evolución del padecimiento fueron de 3 meses a más de 20 años.

## Resultados

La figura 1 presenta tres curvas de calibración de albúmina humana cuyas pendientes se sometieron a un análisis de varianza y el resultado ( $p = 0,410$ ) demuestra que las tres son iguales. También se observa la sensibilidad, que va desde 0,156 a 5,0 ug/100 ul, así como a la variación interensayo, ya que se procesaron con una semana de diferencia una de la otra y el coeficiente de correlación fue  $F = 0,950$ .

La linealidad se estudió colocando 5, 10 y 20 ul de la orina número 344, tomada al azar (fig. 2).

La tabla I muestra también que se pueden usar diferentes volúmenes de orina sin alterar el resultado de la concentración de la albúmina.

La reproducibilidad intraensayo se efectuó procesando 20 ul de la orina número 344 por decuplicado. Los resultados se presentan en la tabla II.

En la tabla III se presentan las cifras normales de microalbuminuria obtenidas por inmunonefelometría láser, así como la comparación de estas concentraciones con las de otros métodos utilizados (RIA, inmunodifusión radial, etc.) por otros grupos de trabajo

y los valores límites internacionales que se han establecido para la microalbuminuria.

Tabla I. Linealidad

Vol. de orina	Lect. nefelómetro	Dil.	Vol. tot. ul orina 24 h	ug tot. albúmina	Microalbúmina ug/min
5 µl	0,2	200	1.490ml	59.600	41,38
10 µl	0,4	100	1.490ml	59.600	41,38
20 µl	0,8	50	1.490ml	59.600	41,38

Las concentraciones de microalbuminuria en 24 horas de los 47 pacientes diabéticos tipo I hospitalizados, independientemente del tiempo de evolución, fueron:

En 5 orinas (11 %) las cifras se encontraron entre los límites normales, de 0-7 µg/min. En 36 pacientes (76 %), con valores de 20-70 µg/min, y los seis restantes (13 %), con más de 70 µg/min. En la figura 3 se presenta gráficamente la distribución de estos pacientes agrupados por períodos de cinco años de evolución hasta más de 20 años de haber iniciado el padecimiento.

Al comparar las concentraciones de albúmina de los cinco grupos por cálculos estadísticos (prueba de U de Mann-Whitney<sup>10</sup> para dos muestras independientes) con las cifras normales, todos los grupos resultaron diferentes a los normales: normales vs 3 meses a 5 años,  $p < 0,002$ ; normales vs 5-10 años,  $p = 0,0005$ ; normales vs 15-20 años,  $p < 0,003$ ; normales vs más de 20 años,  $p < 0,025$ .

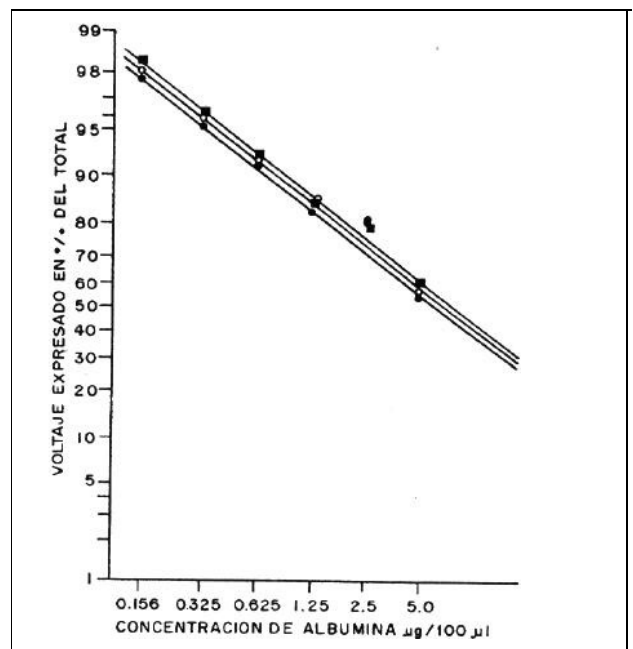


Fig. 1.—Microalbuminuria por nefelometría láser.

**Tabla II.** Intraensayo orina número 344 (vol. 20 ul).

Número	Lect. nefelómetro	ug totales	Microalbuminuria ug/min
1	0,8	59.600	41,38
2	0,7	52.150	36,21
3	0,7	52.150	36,21
4	0,0	59.600	41,38
5	0,8	59.600	41,38
6	0,8	59.600	41,38
7	0,8	59.600	41,38
8	0,8	59.600	41,38
9	0,9	67.050	46,56
-10	0,8	59.600	41,38

n = 10, x = 40.864 VS = 2.786. v'x = 0.881 CV = 6,81.

**Discusión**

Los valores de albúmina urinaria encontrados en los sujetos sanos por el método inmunonefelométrico láser (0-7 µg/min) son comparables con los que informan otros autores <sup>29</sup>.

En el estudio de los 47 pacientes diabéticos tipo 1, el 11% de ellos estuvieron entre cifras normales. Según los estudios de Mogensen y cols.<sup>2,9</sup>, el grupo en el que presentaron concentraciones de 20-70 µg/min el daño renal es temprano y reversible con tratamiento y dieta. En los seis pacientes cuyos valores se encontraron por arriba de 70 µg/min, el daño renal es probablemente avanzado e irreversible.

No se presenta en detalle la relación entre los valores de microalbuminuria y el estado clínico de los pacientes, por ser éste un informe preliminar, cuyo interés principal es mostrar la exactitud y sencillez del método inmunoelectroforético láser para la cuantificación de pequeñas cantidades de albúmina en orina.

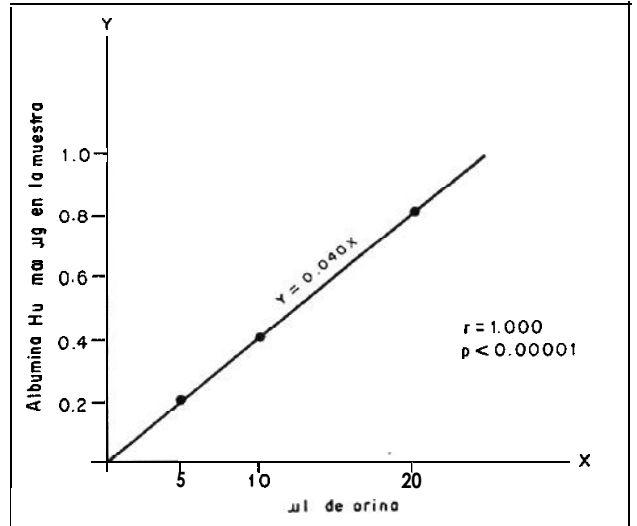


Fig2.-Linealidad microalbuminuria .

**Conclusiones**

El método inmunonefelométrico láser para la cuantificación de microalbuminuria es una herramienta sencilla de gran utilidad en la clínica, por ser un método específico, sensible, reproducible, exacto y de bajo costo, que permite al clínico en un momento dado disponer de una orientación rápida acerca de la magnitud del daño glomerular en el curso de la evolución del padecimiento renal.

**Agradecimientos**

Al Dr. Silvestre Frenk Freud por la revisión y corrección del manuscrito. Al físico Hugo Tuddón Garcés por los cálculos estadísticos, y a la señora Mónica Abrajam por su labor secretarial.

**Tabla III.** Microalbuminuria y cifras normales.

Año	Autor	Método	Normales µg/min (24 h)	Microalbuminuria µg/min
1961	Berggörd 1.	Inmunoquímico	2,5-9,8	
1968	Poorlman J. 4	Inmunodifusión radial	6,1-15,2	
1970	Miles D. W. 5	RIA	5,9-7,9	
1971	Mogensen C. E. 6	RIA	4,2-15,2	
1982	Vibert, Kenn 7	RIA	< 30	30-140
1982	Parvin H. 8	Inmunodifusión radial	< 27,7	
1984	Mogensen C. E. 9	RIA	0-15	15-150
1987	Mogensen C. E. 2	RIA	0-9	
1988	García B. G.	Inmunonefelométrico láser	0-7	20-200

números ( ) bibliografía.

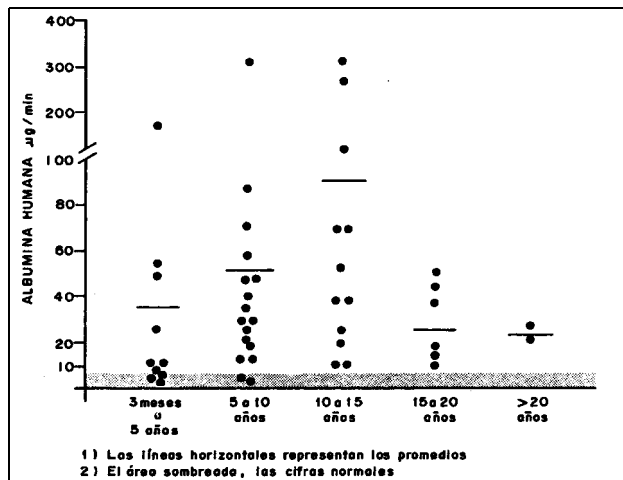


Fig. 3.-Microalbuminuria en pacientes diabéticos tipo 1.

### Bibliografía

1. Keen H y Chlouverakis C: An immnoassay method for urinary albumin at low concentrations. *Lancet* 2:913-914, 1964 .
2. Mogensen CE: Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* 31:673-689, 1987.
3. Berggard I y Risinger C: Quantitative immunochemical determination of albumin in normal human urine. *Acta Soc Med Upsalien* 66:217, 1961.
4. Poortmans J y Jeanloz KW: Quantitative immunological determination of 12 plasma proteins excreted in human urine collected before and after exercise. *J Clin Invest* 47:386-393, 1968.
5. Miles DW, Mogensen CE y Gundersen HJG: Radioimmunoassay for urinary albumin using a single antibody. *Stand J Clin Lab Invest* 26:5- 11, 1970.
6. Mogensen CE: Urinary albumin excretion in early and long-term juvenile diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* 28:183- 193, 1971.
7. Viberti CC, Jarret RJ, Mahmud U, Hill RD, Argyropoulos A y Keen H: Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 26:1430-1432, 1982.
8. Parving HH, Oxenboll B, Svendsen PA, Christensen JS y Andersen AR: Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy. A longitudinal study of urinary albumin excretion. *Acta Endocrinol (Copenh)* 100:500-555, 1982.
9. Mogense CE y Christensen CK: Predicting diabetic nephropathy in insulindependet patients. *N Engl J Med* 311:89-93, 1984.
10. Statistical Methods for the analysis of Biomedical data RF Woolson, John Wiley & Sons, 1987.