

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas - Endocrinologia
Mestrado e Doutorado

**Nefropatia diabética: aspectos laboratoriais da determinação da
albuminúria**

Gustavo Müller Lara

Orientadora: Prof. Dra. Joíza Lins Camargo

Porto Alegre, agosto 2006

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas - Endocrinologia

Mestrado e Doutorado

**Nefropatia diabética: aspectos laboratoriais da determinação da
albuminúria**

Gustavo Müller Lara

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas – Endocrinologia.

Orientadora: Prof. Dra. Joíza Lins Camargo

Porto Alegre, agosto 2006.

DEDICATÓRIA

À Dalin, pelos momentos de solidão que causei, mas ao mesmo tempo pelo suporte, compreensão e estímulo em todos os momentos que você me deu, apesar de todos os acontecimentos.

Aos meus pais, Francisco e Gladys, minha irmã Adriana e seu marido Paulo por acreditarem na minha capacidade, ao meu amado sobrinho que dentro de seu agito vem sempre me trazer uma grande paz.

Dedico também esta etapa de minha vida a todos os familiares que não foram citados, mas permanecem sempre vivos em minha memória.

“Qualquer coisa que faça, age com prudência e considera o fim”.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora prof. dr^a Joíza Lins Camargo, pelo convívio sempre enriquecedor e estimulante, pela compreensão dos meus limites, pela enorme contribuição em meu crescimento profissional e pessoal e pela atenção e motivação dispensada.

Ao prof. dr. Rogério Friedman, pelo acolhimento de meus primeiros passos, por fazer crer que a perseverança, a liberdade e a fé são expressões de crescimento profissional.

À prof. dr^a Mirela Jobim de Azevedo, pela disponibilidade, paciência e auxílio em todos os momentos que precisei, inclusive por acreditar na minha capacidade.

À dr^a Carmem Pilla pela colaboração disponibilizada no laboratório de pesquisa, sempre atenciosa e contribuindo para o bom andamento das dosagens efetuadas, disseminando sua grande experiência para todos que lhe procuram. Aos demais professores e colegas do curso pela colaboração e incentivo, que contribuíram com sugestões e esclarecimentos de várias dúvidas.

As farmacêuticas-bioquímicas do laboratório de análises clínicas do HCPA, Andréia Elisabet Wendland e Rosana, pela paciência e auxílio nas dosagens das amostras de urina. Às secretárias do setor de endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia da Faculdade de Medicina que com suas aptidões e eficiência, mantêm o bom andamento do serviço.

Ao coordenador do curso de Biomedicina da FEEVALE, e amigo, Renato Minozzo, por sempre estimular, a todos, com pequenas e sábias palavras, que o crescimento da ciência vale a pena e qualquer esforço, além de entender todos os momentos de ausência em nossas reuniões setoriais e institucionais.

Aos alunos do curso de Biomedicina da FEEVALE que passaram por minha disciplina de Imunologia Clínica que foi sempre aperfeiçoada com base nos ensinamentos obtidos nas disciplinas do mestrado e nos exemplos dados por todos os professores que tive.

A minha família, por estar sempre presente em minha vida, mesmo que às vezes eu estivesse distante, sempre mostrando apoio em minhas decisões, certo ou não, mas que de alguma forma conseguiam me enviar carinho.

E todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estudo.

CONTEÚDO

Agradecimentos	4
Abreviaturas	8
Lista de quadros	9
Lista de tabelas	10
Lista de figuras	11
Resumo	12
Abstract	13

Capítulo I

Introdução

Nefropatia diabética: aspectos laboratoriais da determinação da albuminúria

Introdução	16
Classificação da nefropatia diabética e curso clínico	17
Rastreamento e diagnóstico da ND.....	18
Métodos laboratoriais para medida da albumina urinária	21
Tipos de amostras de urina utilizadas para medida de albumina	26
<i>Amostras isoladas de urina</i>	26
<i>Urina de 24 horas</i>	27
Fatores pré-analíticos relacionados à medida de albuminúria.....	27
Fatores analíticos relacionados à medida de albuminúria	28
<i>Imprecisão e limites de detecção</i>	28

<i>Efeito pró-zona</i>	29
Conclusões	33
Referências bibliográficas	34
Objetivo.....	37

Capítulo II

Avaliação do impacto da mudança da mudança de imunoenaios na determinação da albumina urinária para o diagnóstico da nefropatia diabética

Resumo	39
Introdução	41
Materiais e métodos	43
Resultados	45
Discussão	53
Referências bibliográficas	56

ABREVIATURAS

CV	Coeficiente de variação
DCE	Depuração da creatinina endógena
DM	Diabetes melito
ELISA	Imunoensaios colorimétricos (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EUA	Excreção urinária de albumina
HPLC	Cromatografia líquida de alta precisão
IAC	Índice albumina/creatinina
IC	Imunocromatográficos
IN	Imunonefelometria
IR	Imunodifusão radial
IT	Imunoturbidimétricos
ND	Nefropatia diabética
MA	Microalbuminúria
PTU	Proteína total urinária
QUIA	Imunoquimioluminescência
RIA	Radioimunoensaio

LISTA DE QUADROS

Artigo de revisão

Quadro 1	Valores de albuminúria utilizados para caracterizar os diferentes estágios da nefropatia diabética, de acordo com o tipo de coleta de urina.	20
Quadro 2	Características dos métodos laboratoriais para albumina urinária.	25
Quadro 3	Resultados de albumina urinária obtidos pelos laboratórios participantes do Programa de Excelência para Laboratórios Médicos da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (PELM-SBPC) – Março 2006.	32

Artigo original

Quadro 1	Valores de albuminúria para o diagnóstico de ND	47
Quadro 2	Característica dos imunoensaios comerciais para dosagem de albuminúria utilizados neste estudo	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de albumina urinária nos diferentes estágios da nefropatia diabética nas amostras avaliadas	48
Tabela 2	Desempenho analítico dos imunoensaios para albumina urinária	48
Tabela 3	Correlação e concordâncias analíticas entre os imunoensaios para albumina urinária de acordo com o método de referência adotado (método A).	49
Tabela 4	Concordância diagnóstica entre os imunoensaios	50

LISTA DE FIGURAS

Artigo de revisão

Figura 1 Curva de precipitação antígeno-anticorpo. 31

Artigo original

Figura 1 Correlação entre os diferentes imunoensaios para albumina urinária. 51

Figura 2 Gráficos de Bland-Altman para os imunoensaios estudados. 52

RESUMO

O diabetes melito é considerado uma doença crônica caracterizada pela hiperglicemia e por complicações macro e microangiopáticas. Entre as complicações microangiopáticas, a nefropatia diabética vem adquirindo cada vez mais importância por ser considerada uma causa de insuficiência renal que pode ocorrer a qualquer momento e afeta cerca de 40% dos pacientes diabéticos.

A compreensão das mudanças moleculares e ultra-estruturais da proteinúria foi muito notada nos últimos anos e vários mecanismos foram propostos para explicar o dano renal. O que tem visto em comum entre todos é que os níveis de excreção urinária de albumina estão relacionados com a perda da capacidade de filtração seletiva da membrana basal glomerular do sistema renal. Isto acarreta o desenvolvimento de três estágios conhecidos na nefropatia diabética: a normoalbuminúria, microalbuminúria ou nefropatia incipiente e a macroalbuminúria ou nefropatia clínica.

Portanto os métodos para a dosagem da albumina urinária em pequenas quantidades, mas excessivas em pacientes com diabetes melito tornaram-se fundamentalmente importante para evitar o desenvolvimento de transtornos angiopáticos. Além do mais, o tipo da coleta de amostra a ser utilizado para o procedimento destas dosagens tem sido relatado como um fator relacionado ao custo, praticidade e variações de resultados.

Os métodos atualmente utilizados para screening, diagnóstico e monitoramento da nefropatia diabética possuem poucos resultados falso-negativos, baixo custo, reprodutibilidade e, portanto, são considerados adequados, entre eles a imunoturbidimetria tem sido o método de escolha.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is considered a chronic disease characterized by the hyperglycemia and for macro and microangiopathic complications. Among the microangiopathic complications, the diabetic nephropathy is acquiring more importance along the years for being considered a cause of renal insufficiency that can occur at any time and affects about 40% of the diabetic patients.

The comprehension of the molecular and ultra-structural changes of the proteinúria was very noticed in the past years and many mechanisms were considered to explain the renal damage. What all have in common is that the levels of albumin in urinary excretion is related with the loss of ability of selective filtration by the membrane basal glomerular of the renal system. This brings the development of three known stages in the diabetic nephropathy: the normoalbuminuria, microalbuminuria or incipient nephropathy and the macroalbuminuria or clinical nephropathy.

Therefore the methods for the measurement of small amounts of urinary albumin, but extreme in diabetic patients, became essencial to avoid the development of angiopathic disturb. Besides that, the kind of sample used for these measurements procedures have been related as being a factor to the cost, practicability and variations in the results.

The methods currently used for screening, diagnosis and monitoring diabetic nefropathy posses few false-negative results, low cost, reproducibility and therefore, are considered proper, among them; the immunoturbidimetry has been the choice method.

CAPÍTULO I

Introdução

Nefropatia diabética: aspectos laboratoriais da medida da albuminúria

Artigo de Revisão a ser submetido ao periódico Jornal Brasileiro de Patologia

Clínica e Medicina Laboratorial

*Nefropatia diabética: aspectos laboratoriais da determinação da
albuminúria*

Gustavo Müller Lara¹

Mirela Jobim de Azevedo²

Jorge Luiz Gross²

Joíza Lins Camargo^{3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Endocrinologia, UFRGS e Centro
Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo - RS

² Serviço de Endocrinologia e ³ Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de
Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

*Autor para correspondência: Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de
Porto Alegre, rua Ramiro Barcellos, 2350 – 2º andar, 90035-003, Porto Alegre, RS,
Brasil, Fax: 51 21018310, e-mail: jcamargo@hcpa.ufrgs.br

Introdução

O diabetes melito (DM) é uma síndrome que se caracteriza por deficiência relativa (DM tipo 2) ou absoluta (DM tipo 1) de insulina que tem como consequência a hiperglicemia e pode apresentar complicações crônicas microvasculares (nefropatia diabética, retinopatia diabética), macrovasculares (doença cardiovascular) e neuropáticas [1, 2]. O controle dos níveis glicêmicos, associado ao controle da pressão arterial e possivelmente a fatores genéticos são considerados os principais fatores determinantes para o desenvolvimento e progressão das complicações do DM [3-5]. Estas complicações crônicas representam atualmente um grande problema de saúde pública [6].

O DM tipo 2 é a forma mais freqüente de DM, cerca de 90% dos casos, caracterizando-se por resistência à insulina e defeitos na secreção [1, 2]. O número estimado de pacientes adultos com DM no Brasil em 1995 era cerca de 4.9 milhões e até 2025 este número deverá aumentar para aproximadamente 11.6 milhões [7]. Cerca de 8% da população brasileira é portadora de DM, sendo que aproximadamente 50% desconhece ter a doença [8].

A nefropatia diabética (ND) é uma complicação crônica microvascular do DM que afeta até 40% dos pacientes e é a causa mais comum de doença renal terminal e ingresso em programas de hemodiálise [9, 10]. A ND está associada ao aumento de morbimortalidade cardiovascular, inclusive em seus estágios iniciais [11]. Os principais fatores associados a esta complicação são de ordem genética e não genética: história familiar, hiperglicemia, hipertensão arterial sistêmica, hiperfiltração glomerular, fumo, dislipidemia, retinopatia diabética, neuropatia autonômica, os próprios valores de albuminúria, ingestão protéica, duração da diabete, idade e sexo [12, 13].

O objetivo deste trabalho é revisar aspectos do diagnóstico da ND com ênfase na análise crítica dos aspectos laboratoriais relacionados à medida da albumina na urina.

Classificação da nefropatia diabética e curso clínico

A ND é tradicionalmente definida pela presença de proteinúria acima de 500 mg/24h. Este estágio da ND é denominado proteinúria ou de nefropatia clínica [9, 14]. Estudos da década de 80 [15-17] mostraram que pequenas quantidades de albumina na urina, usualmente não detectadas por métodos laboratoriais convencionais, eram preditivas do desenvolvimento de proteinúria em pacientes diabéticos. A partir destes estudos foi definido o termo microalbuminúria (MA), e por consenso estabelecidos os valores diagnósticos. A partir de então a ND foi didaticamente dividida em estágios, do menor ao maior envolvimento renal do DM, com base em valores de excreção urinária de albumina (EUA): normoalbuminúria, microalbuminúria (nefropatia incipiente) e macroalbuminúria (nefropatia clínica). Os valores de albuminúria atualmente adotados para o diagnóstico da ND [14, 17], de acordo com o tipo de coleta de urina, estão expressos no Quadro 1. Entretanto deve ser salientado que evidências recentes sugerem que o risco de desenvolver ND [18-21] e doença cardiovascular [22] inicia já com níveis de EUA elevados, porém ainda dentro dos valores considerados normais. A progressão para micro e macroalbuminúria mostrou-se mais freqüente em pacientes com DM tipo 2 com valores basais de EUA acima de 2,5 mg/24h [18]. Após 10 anos de acompanhamento, a chance de desenvolver ND é 29 vezes maior nos pacientes com DM tipo 2 com valores de EUA iniciais acima de 10 µg/min [20]. Esta observação é também válida para pacientes com DM tipo 1 [19]. Estas evidências favorecem o conceito de

que o risco associado à EUA é contínuo e que possivelmente valores de EUA inferiores aos estabelecidos atualmente devam ser adotados para o diagnóstico de MA.

Outro aspecto importante relacionado ao curso clínico da ND é que nem todos pacientes apresentam um curso progressivo da doença renal, podendo ocorrer inclusive regressão ao estágio de normoalbuminúria [18-19]. A progressão de micro para macroalbuminúria foi inicialmente estimada em 80%. [18]. Entretanto, atualmente estima-se que até 45% dos pacientes que desenvolvem microalbuminúria progredem para macroalbuminúria. É provável que esta observação seja a consequência do uso de um tratamento agressivo para normalizar valores de glicose [4, 5] e de pressão arterial [23]. De fato, entre as justificativas do rastreamento para a presença de MA em pacientes com DM estão os resultados dos estudos clínicos *Diabetes Clinical and Complication Trial* (DCCT) [4] e *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) [5, 23], que mostraram que a ND pode ser reversível em seus estágios iniciais e/ou a progressão para estágios mais avançados pode também ser interrompida, se um tratamento agressivo for realizado para manter os níveis glicêmicos o mais próximo possível dos níveis considerados normais.

Rastreamento e diagnóstico da ND

O primeiro passo para o rastreamento e diagnóstico da ND é a medida da albumina em uma amostra isolada de urina, coletada na primeira hora da manhã ou casualmente durante o dia [9, 14, 17]. Devido à variação biológica diária da EUA ser de 40% a 50% [24], o diagnóstico de MA necessita de confirmação com uma segunda medida, preferencialmente utilizando-se urina de 24 horas [17].

Nos pacientes com DM tipo 2 os testes para MA devem ser feitos já no diagnóstico. Nos pacientes DM tipo 1, a dosagem de MA é recomendada antes do início da puberdade e após a duração de pelo menos 5 anos do DM. Como a MA pode estar presente antes deste período em uma parcela considerável de pacientes, sugere-se que o rastreamento inicie pelo menos após 1 ano do diagnóstico. Entretanto, se a MA estiver ausente o teste deve ser repetido para todos os pacientes anualmente [9, 17, 25].

O rastreamento não deve ser realizado na presença de condições que aumentem a EUA, tais como infecções do trato urinário, hematúria, doenças febris agudas, exercício vigoroso, DM descompensado (hiperglicemia pronunciada), hipertensão não controlada e insuficiência cardíaca descompensada, menstruação e leucorréia [9, 14, 24, 26].

Além da medida da albumina urinária, no diagnóstico da ND a creatinina sérica deve ser avaliada anualmente para a estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG) em todos os pacientes adultos com diabetes, especialmente a partir do estágio de MA [9]. A creatinina sérica isolada não deve ser utilizada como uma medida de função renal, mas usada para estimar a TFG [25].

A coleta de urina de 24 horas é incômoda e propensa a erros relacionados a coleta das amostras ou registro do tempo. Os resultados de albumina medidos em amostras isoladas de urina podem ser expressos como concentração de albumina urinária (mg/L) ou como índice albumina/creatinina (IAC; mg/g) [14, 27] de acordo com o quadro 1. Apesar da possibilidade teórica de que a concentração de albumina possa ser influenciada pela diluição ou concentração da amostra de urina, esta opção é tão precisa quanto o IAC e apresenta menor custo [28].

Quadro 1 –Valores de albuminúria utilizados para caracterizar os diferentes estágios da nefropatia diabética, de acordo com o tipo de coleta de urina [9,14,17].

Tipo de coleta de urina				
Estágio	Urina com tempo marcado (µg/min)	Urina de 24 h (mg/24h)	Amostra	
			Albumina/creatinina (mg/g)	Concentração (mg/L)
Normoalbuminúria	<20	< 30	< 30	< 17
Microalbuminúria	20 a 199	30 a 299	30 a 299	17 a 173
Macroalbuminúria	≥ 200	≥ 300 *	≥ 300	≥ 174

* valor de proteína total correspondente neste estágio: ≥ 500 mg/24h ou ≥ 430 mg/L em amostra de urina

Métodos laboratoriais para medida da albumina urinária

Métodos Quantitativos:

Em 1963 [30] foi desenvolvido o primeiro método de radioimunoensaio (RIA) para a medida da albuminúria, o qual permitiu quantificar níveis de EUA que eram indetectáveis utilizando os métodos convencionais. Baseados neste ensaio foram desenvolvidos, posteriormente, ensaios quantitativos imunocromatográficos (IC), imunoturbidimétricos (IT), por imunodifusão radial (IR), imunonefelométricos (IN), imunoensaios colorimétricos (ELISA) e imunoquimioluminescentes (QUIA), até o desenvolvimento recente de técnicas de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) [31-34]. Todos os métodos, com exceção da técnica de HPLC, baseiam-se na interação antígeno-anticorpo. Alguns ensaios necessitam de um meio revelador (radiação, reação enzimática ou precipitação), enquanto que em outros a evidência de reação é direta [35].

Os métodos de reação de primeiro estágio (RIA, IC, ELISA, QUIA) estão fundamentados na ligação da albumina urinária a um anticorpo anti-albumina e deste imunocomplexo a um segundo anticorpo, adicionado posteriormente e conjugado a radioisótopos, ou a enzimas para a reação colorimétrica final. A contagem da radiação, a coloração ou precipitação obtida são proporcionais à concentração de albumina urinária. Os métodos de reação de segundo estágio (IT, IR, IN) contam apenas com uma única interação antígeno-anticorpo. Quando o anticorpo anti-albumina liga-se a albumina urinária, ocorre uma turvação ou precipitação do meio capaz de ser captada e mensurada a 340 nm. A absorbância medida é diretamente proporcional a concentração do analito na amostra [35].

Entre os métodos para dosagem da albuminúria já descritos, um dos mais utilizados na rotina laboratorial é o método IT, pois apresenta adequada especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de ND [36]. Este método é facilmente automatizado e possui um custo razoável.

Recentemente, foi relatado que os métodos imunológicos convencionais, inclusive IT, subestimam parte da albumina urinária, descrita como uma fração não-imunoreativa a qual não reage com os métodos convencionais. Esta fração não-imunoreativa pode ser avaliada através de HPLC [37]. É possível que, futuramente, o HPLC venha a substituir o método IT.

O desempenho analítico dos métodos quantitativos mais frequentemente utilizados para a medida da albuminúria estão resumidos no quadro 2.

Uma situação freqüente em laboratórios de patologia clínica é a necessidade de mudança nos métodos e/ou kits utilizados para medida de EUA. A validação e comparação de novos métodos e/ou *kits* são essenciais para evitar erros ou diferenças significativas nos resultados de albuminúria e conseqüentemente na conduta clínica dos pacientes. Recentemente demonstramos que diferentes imunoensaios baseados na IT podem ser intercambiáveis, sem acarretar mudanças significativas na classificação dos diferentes estágios da ND, desde que sejam desenvolvidos protocolos padronizados e controlados de dosagem [38]. Já o método quimioluminescente pode modificar a classificação da ND e deve ter os resultados interpretados com precaução, principalmente nos limites superior ou inferior dos pontos de corte diagnóstico.

Métodos Qualitativos

Existem também disponíveis no mercado testes semi-quantitativos para medida de albumina urinária que utilizam fitas reagentes. Os métodos semi-quantitativos para detecção da MA são simples e rápidos, com fornecimento de resultados em cerca de 1 a 5 minutos, e podem contribuir para facilitar o diagnóstico quando não são disponíveis métodos quantitativos [28].

Entretanto, a sensibilidade diagnóstica destes testes é inferior àquela recomendada para a utilização em testes de rastreamento ($\geq 95\%$) [24]. Na prática, eles apresentam sensibilidade de 70 a 91% [24, 28, 39]. Um grande estudo multicêntrico [40], demonstrou uma sensibilidade para o diagnóstico de MA de 96,7% utilizando um teste qualitativo. Porém deve ser salientado que o teste foi realizado em uma alíquota de urina de 24h e não em uma amostra isolada de urina, que é como o teste é utilizado na prática clínica.

Embora estes testes tenham um custo elevado (~ R\$ 10) quando comparados com os métodos laboratoriais quantitativos, eles podem ser utilizados em locais onde a estrutura laboratorial não está disponível, facilitando o rastreamento da ND.

Entre os testes qualitativos estão o teste Micral II[®] (Boehringer Mannheim GmbH), que detecta a albumina urinária em tira reativa com uma escala cromática de 5 zonas, com leitura aos cinco minutos após a imersão, consideram-se resultados negativos (concentração fisiológica de albumina na urina) se a leitura for nas duas primeiras zonas. A terceira corresponde ao valor de ponto de corte de 20 mg/L, correspondente ao diagnóstico de MA

de acordo com o fabricante. As duas últimas permitem determinar o grau de albuminúria [28, 39].

Quadro 2 – Características dos métodos laboratoriais para albumina urinária ^[32, 38].

Ensaio (Equipamento)	Fornecedor do reagente	CV (%)		Limite de detecção (mg/L)	Linearidade (mg/L)
		Normoalbuminúri a	Microalbuminúri a		
Radioimunoensaio	In-house	9,2	4,8	0,016	-
Imunonefelometria (<i>Array Analyser</i> ®)	Beckman Diagnostics	4,2	5,3	2,0	150
Imunoturbidimetria (<i>Turbitimer</i> ®)	Dade-Behring	4,1	4,2	6,0	100
Imunoturbidimetria (<i>Dimension</i> ®)	DiaSorin	8,5	3,4	6,0	200
Imunoturbidimetria (<i>Cobas</i> ®)	Bayer	2,5	3,2	5,0	160
Imunoturbidimetria (<i>Hitachi 917</i> ®)	Aptec Diagnostics	7,3	2,9	5,0	200
Imunoturbidimetria (<i>Hitachi 917</i> ®)	Roche	4,4	1,6	3,0	400
Imunoturbidimetria (<i>Hitachi 917</i> ®)	Randox	3,8	2,0	4,0	200
Quimioluminescência (<i>Immulite</i> ®)	Diagnostics Products Corporation	2,9	-	2,5	60
HPLC	In-house	5,6	6,0	2,0	-

Tipos de amostras de urina utilizadas para medida de albumina

A medida de albuminúria pode ser realizada em amostras de urina isoladas, em amostras de 24 horas, e em amostras de urina com tempo marcado (24h ou outros tempos) [9, 14, 24, 25]. Cada tipo de coleta de urina apresenta vantagens e limitações, que precisam ser sempre consideradas para não prejudicar a interpretação final dos resultados.

Amostras isoladas de urina:

As amostras isoladas de urina podem ser utilizadas para a medida da concentração de albumina (mg/L) ou do IAC (mg/g) [14, 27]. Para a medida da concentração de albumina na urina, em geral, utiliza-se amostra de urina casual, que tem a vantagem de ser fácil para coletar, podendo ocorrer em qualquer consulta médica.

A amostra isolada tem grande utilidade para avaliação da presença de MA, apresentando sensibilidade e especificidade adequadas para rastreamento e diagnóstico e evitando os desconfortos relativos à coleta de urina de 24 horas.

Alguns autores preferem utilizar a primeira urina matinal, pois esta amostra teoricamente teria menor variabilidade, pois não estaria sujeita as variações posturais, de exercício, alimentação e outros fatores interferentes [26]. Nestes casos, a medida de creatinina é realizada junto com a medida de albumina (IAC). Deve ser lembrado que uma segunda dosagem laboratorial agrega também a variabilidade desta segunda medida [42] e que a medida da excreção da creatinina pode variar de acordo com gênero, idade e etnia. Embora não exista um consenso [14, 43, 44], alguns investigadores propõem um ponto de corte para MA gênero-específico ao utilizarem o IAC [28, 45]. Esta estratificação por sexo conferiria um aumento de sensibilidade e especificidade ao teste [28]. É provável que esta divisão por sexo não seja necessária, já

tendo sido demonstrado que um IAC de 30 mg/g de creatinina tem 100% de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de MA [46].

Quando medida somente a concentração de albumina, o ponto de corte de 17 mg/L possui uma sensibilidade de 100% e especificidade de 80% para o diagnóstico da MA [17, 28, 41].

Em conclusão, a utilização de uma amostra isolada de urina com a medida de apenas a concentração de albumina é o método mais simples, de menor custo e com excelente acurácia diagnóstica para a MA.

Urina de 24 horas

As coletas de urina de 24 horas podem ser feitas com ou sem tempo marcado. A EUA na urina de 24 horas é tradicionalmente considerada como o critério de referência para o diagnóstico de MA [9, 14]. As amostras de urina de 24 horas minimizariam as variações intra-individuais decorrentes do exercício, alimentação, etc. Além disto, os pacientes devem receber instruções claras para a coleta, pois esta está passível a erros relacionados ao volume coletado e à medição do tempo [45, 46] e quanto ao frasco, que pode ser insuficiente para conter a quantidade de urina. Cerca de 30% das urinas de 24h necessitam ser coletadas novamente devido a erros de procedimento [47].

Fatores Pré-analíticos relacionados à medida de albuminúria

A albumina é estável em amostras de urinas não tratadas armazenadas entre 4 a 20°C, por pelo menos 1 semana. A centrifugação ou filtração prévia das amostras parece ser desnecessária em amostras que não foram congeladas (-20 a -80°C). Quando

centrifugada, filtrada, ou não tratada, a concentração de albumina pode diminuir cerca de 0.27% ao dia quando mantida na temperatura ambiente (18-25°C). Entretanto, não forma observadas alterações quando as amostras foram congeladas a -80°C por cerca de 160 dias [24].

Fatores Analíticos relacionados à medida de albuminúria

1) Imprecisão e Limites de Detecção

As metas para precisão analítica (reprodutibilidade dos resultados) propostas para os testes laboratoriais são relacionadas ao grau de variação biológica do analito a ser analisado. Analitos que variam amplamente nos indivíduos a serem testados não requerem métodos com muita precisão. A variação intra-indivíduo da EUA é grande nas pessoas sem DM e mais elevada em pacientes com DM [24].

Howey e colaboradores [48] estudaram a variação diária, por mais de 4 semanas, da EUA (24h), da concentração de albumina, e do IAC. Em voluntários saudáveis, os coeficientes de variação encontrados para o IAC foi de 31% enquanto que para a primeira amostra de urina da manhã foi de 36%. A precisão analítica de 15% para o IAC e amostras cronometradas e de 18% para amostras isoladas (primeira urina da manhã) são recomendadas [24, 48, 49].

Nos indivíduos com DM, a variação intra-indivíduos (CV) foi 61% para a concentração de albumina na primeira amostra da manhã e 39% para o IAC. Assim, as metas acima parecem mais do que adequadas para uso em indivíduos com DM [49]. A imprecisão total encontra-se dentro da meta analítica de 15%, e freqüentemente é bem mais baixa (Quadro 2).

Os métodos quantitativos comercialmente disponíveis para MA possuem limites de detecção de 5 mg/L ou inferior. Um estudo recente mostrou que a maioria dos

métodos, mas não todos, concordam entre si e possuem um intervalo de referência de 2–20 albumina/mg de creatinina [24].

2) Efeito Pró-zona

O efeito pró-zona (ou gancho) ainda é um grande problema nos testes imunológicos de etapa única (*one-step*) [55]. Este fenômeno refere-se à ausência de precipitação, devido a formação de imunocomplexos solúveis, que ocorre nas regiões de excesso de anticorpo e/ou excesso de antígeno (Figura 1). Para evitarmos este efeito, o imunoensaio deve ser padronizado para funcionar na zona de equivalência, onde as concentrações de anticorpo e antígeno estão em concentrações ideais de reação. Em geral, os métodos que detectam antígeno por precipitação com um anticorpo têm a zona de equivalência correspondente ao intervalo entre o limite de detecção e a linearidade do método (intervalo de medição ou reação). As amostras que possuem concentrações muito elevadas de antígeno (maiores que a linearidade do método) estão sujeitas ao efeito pró-zona. Nestes casos, é necessário diluir a amostra para que a concentração de antígeno esteja na zona de equivalência. A maioria dos aparelhos automatizados pode monitorar cineticamente a reação imunológica e está programada para detectar o excesso de antígeno. Entretanto, na prática, é difícil a previsão do efeito gancho e sua detecção posterior a primeira dosagem demanda maior trabalho manual e aumenta o custo das dosagens. Desta forma, deveríamos testar as amostras sem diluição e após serem diluídas. Se o resultado da amostra com diluição for maior que o da amostra não diluída, a amostra exibiu o efeito pró-zona. Estes passos aumentam o trabalho técnico e o custo com reativos [56].

Vários fatores podem afetar a precipitação de imunocomplexos, além da relação entre as concentrações de antígeno-anticorpo, como a afinidade e especificidade do anticorpo ao antígeno, temperatura de reação, pH e força iônica dos reagentes. O

conjunto destes fatores determina o intervalo de medição dos diferentes métodos e imunoensaios destinados a um antígeno específico.

O efeito gancho pode ser um dos motivos da grande variabilidade entre os resultados de albumina urinária obtidos por diferentes laboratórios. O quadro 3 mostra os resultados de albuminúria, em 3 amostras de urinas, obtidos pelos laboratórios participantes do Programa de Excelência para Laboratórios Médicos da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (PELM-SBPC) no mês de março de 2006. Observa-se uma imensa variabilidade inter-laboratório, independente da faixa de albuminúria.

Uma alternativa para o controle do eventual efeito pró-zona nos imunoensaios para albumina, é a estimação da contribuição da albumina, através da dosagem da proteína urinária total (PTU) por ensaio turbidimétrico, previamente à dosagem de albuminúria, em todas as amostras. Considerando-se que, em média, 50% da concentração de proteína total é constituída de albumina é possível realizar uma diluição da amostra ($1/2$, $1/5$, $1/10$, $1/20$, $1/30$ ou $1/50$), permitindo assim a medida da albuminúria dentro da faixa de medição de todos os ensaios [41]. Este procedimento pode reduzir o trabalho manual de diluições sucessivas em amostras com concentração de albumina nas faixas de micro e macroalbuminúria e também economizar no número de testes necessários para se obter o resultado final.

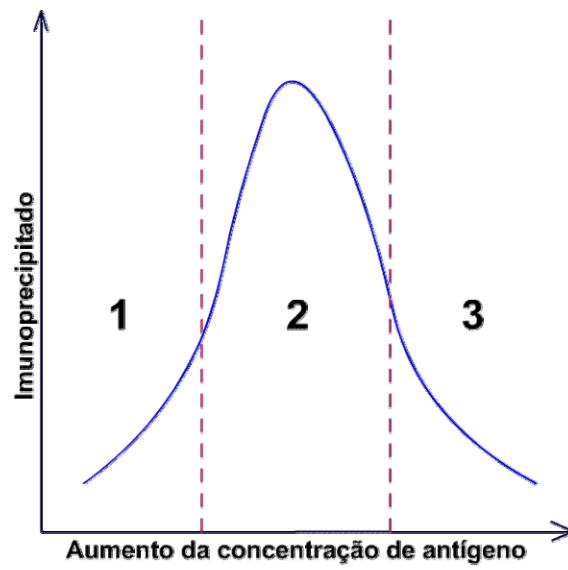


Figura 1. Curva de precipitação antígeno-anticorpo. A quantidade de anticorpo é mantida constante. 1 = zona de excesso de anticorpo; 2 = zona de equivalência e 3 = zona de excesso de antígeno [Adaptado da Ref 57].

Quadro 3 – Resultados de albumina urinária obtidos pelos laboratórios participantes do Programa de Excelência para Laboratórios Médicos da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (PELM-SBPC) – Março 2006.

Método/Equipamento	Amostra 01				Amostra 02				Amostra 03			
	n	Média	DP	CV%	n	Média	DP	CV%	n	Média	DP	CV%
Imunoturbidimetria – Bayer Advia 1650	09	571,8	122,2	21,4	09	1,5	1,0	71,3	09	178,0	20,4	11,5
Imunoturbidimetria – Bayer/Express Plus/550	13	234,5	182,0	77,6	13	19,1	9,8	51,2	13	100,0	52,6	52,6
Imunoturbidimetria – Behring BN II	10	628,9	36,6	5,8	11	4,8	6,0	126,0	11	186,4	13,5	7,3
Nefelometria– Behring Nefelômetro 100	10	537,1	282,8	52,7	10	27,2	57,7	212,1	10	186,5	29,7	16,0
Imunoturbidimetria – M Vitalab Selectra I/II	18	363,4	311,7	85,8	18	9,9	11,8	118,8	18	116,0	70,9	61,1
Imunoturbidimetria – R Cobas Mira/Mira Plus	33	405,4	376,0	92,7	33	7,0	11,5	163,8	33	131,5	85,4	64,9
Imunoturbidimetria – Roche/Hitachi Modular	-	-	-	-	07	2,2	1,1	48,7	07	162,5	5,4	3,3
Quimioluminescência – DPC Immulite/1000/2000	15	462,6	226,7	49,0	17	2,0	1,3	67,9	17	210,2	67,1	31,9

Conclusões

Todos os pacientes diabéticos devem ser avaliados quanto a presença da albuminúria, de acordo com os critérios nacionais e internacionais [2, 9, 14]. A utilização de amostras de urina isolada facilita o diagnóstico, que deve ser confirmado em uma segunda medida.

Existem vários métodos disponíveis no mercado para o diagnóstico da ND [24]. A comparação inter-laboratorial depende dos diversos fatores que afetam a medida imunológica da albumina na urina. Muitas vezes o resultado obtido por um método não pode ser diretamente comparável com outro, obtido por outro método utilizando o mesmo princípio, mas equipamento ou reagente diferente.

Cada laboratório deve estar atento aos fatores analíticos que representam fontes de erros que podem alterar seus resultados de albuminúria e conseqüentemente a classificação da ND.

Os resultados fornecidos devem ser exatos e precisos para que o médico assistente possa atuar adequadamente na prevenção e tratamento da nefropatia diabética.

Referências Bibliográficas

1. Organization, W.H., *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation*. World Health Organization, 1999: p. 59.
2. *Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso brasileiro sobre diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2*. 2002, Rio de Janeiro: Diagraphic Editora. 72.
3. Camargo, J.L. and J.L. Gross, *Glico-hemoglobina (HbA1c): aspectos clínicos e analíticos*. Arq Bras Endocrinol Metab, 2004. **48**(4): p. 451-463.
4. *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group*. N Engl J Med, 1993. **329**(14): p. 977-86.
5. *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group*. Lancet, 1998. **352**(9131): p. 837-53.
6. Scheffel, R.S., et al., *Prevalência de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes melito do tipo 2 em atendimento ambulatorial*. Rev Assoc Med Bras, 2004. **50**(3): p. 263-7.
7. Passos, V.M.d.A., et al., *Type 2 diabetes: prevalence and associated factors in a Brazilian community – the Bambuí health and aging study*. São Paulo Med J, 2005. **123**(2): p. 66-71.
8. Malerbi, D.A. and L.J. Franco, *Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence*. Diabetes Care, 1992. **15**(11): p. 1509-16.
9. Gross, J.L., et al., *Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment*. Diabetes Care, 2005. **28**(1): p. 164-76.
10. Bruno, R.M. and J.L. Gross, *Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study*. J Diabetes Complications, 2000. **14**(5): p. 266-71.
11. Valmadrid, C.T., et al., *The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus*. Arch Intern Med, 2000. **160**(8): p. 1093-100.
12. Murussi, M., et al., *Nefropatia diabética no diabete melito tipo 2: fatores de risco e prevenção*. Arq Bras Endocrinol Metab, 2003. **47**(3): p. 207-219.
13. Canani, L.H., F. Gerchman, and J.L. Gross, *Increased familial history of arterial hypertension, coronary heart disease, and renal disease in Brazilian type 2 diabetic patients with diabetic nephropathy*. Diabetes Care, 1998. **21**(9): p. 1545-50.
14. Molitch, M.E., et al. *Nephropathy in diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27 Suppl 1**: p. S79-83.
15. Viberti, G.C., et al., *Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus*. Lancet, 1982. **1**(8287): p. 1430-2.
16. Mogensen, C.E. and C.K. Christensen, *Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients*. N Engl J Med, 1984. **311**(2): p. 89-93.
17. Zelmanovitz, T., et al., *The receiver operating characteristics curve in the evaluation of a random urine specimen as a screening test for diabetic nephropathy*. Diabetes Care, 1997. **20**(4): p. 516-9.

18. Caramori, M.L., P. Fioretto, and M. Mauer, *The Need for Early Predictors of Diabetic Nephropathy Risk. Is Albumin Excretion Rate Sufficient?* Diabetes, 2000. **49**: p. 1399-1408.
19. Perkins, B.A., et al., *Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes.* N Engl J Med, 2003. **348**(23): p. 2285-93.
20. Murussi, M., et al., *Risk factors for microalbuminuria and macroalbuminuria in type 2 diabetic patients: a 9-year follow-up study.* Diabetes Care, 2002. **25**(6): p. 1101-3.
21. Forsblom, C.M., et al., *Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in NIDDM.* Diabetes Care, 1998. **21**(11): p. 1932-8.
22. Gaede, P., et al., *Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes.* N Engl J Med, 2003. **348**(5): p. 383-93.
23. *Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group.* Bmj, 1998. **317**(7160): p. 703-13.
24. Sacks, D.B., et al., *Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus.* Clin Chem, 2002. **48**(3): p. 436-72.
25. *American Diabetes Association - Standards of Medical Care in Diabetes-2006.* Diabetes Care, 2006. **29**(suppl 1): p. S4-S42.
26. Mogensen, C.E., et al., *Microalbuminuria and potential confounders: a review and some observations on variability of urinary albumin excretion.* Diabetes Care, 1995. **18**: p. 572-581.
27. Gross, J.L., et al., *Screening for diabetic nephropathy: is measurement of urinary albumin-to-creatinine ratio worthwhile?* Diabetes Care, 1999. **22**(9): p. 1599-600.
28. Incerti, J., et al., *Evaluation of tests for microalbuminuria screening in patients with diabetes.* Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(11): p. 2402-7.
29. *A desktop guide to Type 2 diabetes mellitus. European Diabetes Policy Group 1999.* Diabet Med, 1999. **16**(9): p. 716-30.
30. Keen, H. and C. Chlouverakis, *An Immunoassay Method for Urinary Albumin at Low Concentrations.* Lancet, 1963. **186**: p. 913-4.
31. Pfab, T., et al., *Rapid immunochromatographic strip test for the detection of albuminuria and brief literature review on albuminuria screening.* Eur J Med Res, 2006. **11**(1): p. 3-6.
32. Comper, W.D., G. Jerums, and T.M. Osicka, *Differences in urinary albumin detect by four immunoassays and high-performance liquid chromatography.* Clin Biochem, 2004. **37**: p. 105-111.
33. Lewis, J.B., *Microalbuminuria: accuracy or economics.* Am J Kidney Dis, 1998. **32**(3): p. 524-8.
34. Comper, W.D. and T.M. Osicka, *Detection of urinary albumin.* Adv Chronic Kidney Dis, 2005. **12**(2): p. 170-6.
35. Reis, M.M., *Testes imunológicos : manual ilustrado para profissionais da saúde.* 1998, Porto Alegre, RS: AGE.
36. Tabaei, B.P., et al., *Does microalbuminuria predict diabetic nephropathy?* Diabetes Care, 2001. **24**(9): p. 1560-6.
37. Brinkman, J.W., et al., *Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A comparison of immunonephelometry with HPLC.* Kidney Int Suppl, 2004(92): p. S69-75.
38. Lara, G.M. and J.L. Camargo, *Avaliação do impacto da mudança de imunoensaios na determinação da albumina urinária para o diagnóstico da nefropatia diabética, in Hospital de Clínicas de Porto Alegre.* 2006, UFRGS: Porto Alegre.

39. Torres, D.V., et al., *Validez de los métodos semicuantitativos de cribado de la microalbuminuria en la diabetes mellitus*. Atención Primaria, 1998. **22**(10): p. 631-635.
40. Mogensen, C.E., G.C. Viberti, and P. E., *Multicenter evaluation of the Micral-test II test strip, na immunologic rapid test for the detection of microalbuminuria*. . Diabetes care, 1997. **20**: p. 1642-1646.
41. Zelmanovitz, T., et al., *Proteinuria is still useful for the screening and diagnosis of overt diabetic nephropathy*. Diabetes Care, 1998. **21**(7): p. 1076-9.
42. Harvey, J.N., et al., *Prediction of albumin excretion rate from albumin-to-creatinine ratio*. Diabetes Care, 1999. **22**(9): p. 1597-8.
43. Eknoyan, G., et al., *Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK)*. Am J Kidney Dis, 2003. **42**(4): p. 617-22.
44. Nelson, R.G., et al., *Assessment of risk of overt nephropathy in diabetic patients from albumin excretion in untimed urine specimens*. Arch Intern Med, 1991. **151**(9): p. 1761-5.
45. Dyer, A.R., et al., *Estimating laboratory precision of urinary albumin excretion and other urinary measures in the International Study on Macronutrients and Blood Pressure*. Am J Epidemiol, 2004. **160**(3): p. 287-94.
46. Dyer, A.R., et al., *Evaluation of measures of urinary albumin excretion in epidemiologic studies*. Am J Epidemiol, 2004. **160**(11): p. 1122-31.
47. Khawali, C., A. Andriolo, and S.R. Ferreira, *Comparison of methods for urinary albumin determination in patients with type 1 diabetes*. Braz J Med Biol Res, 2002. **35**(3): p. 337-43.
48. Howey, J.E., M.C. Browning, and C.G. Fraser, *Biologic variation of urinary albumin: consequences for analysis, specimen collection, interpretation of results, and screening programs*. Am J Kidney Dis, 1989. **13**: p. 35-7.
49. Ghazalli, R., et al. *Clinical practice guidelines - diabetic nephropathy*. 2003 [cited; 5-28]. Available from: <http://www.acadmed.org.my/html/cpg.htm>.
50. Tiu, S.C., S.S. Lee, and M.W. Cheng, *Comparison of six commercial techniques in the measurement of microalbuminuria in diabetic patients*. Diabetes Care, 1993. **16**(4): p. 616-20.
51. Giampietro, O., et al., *Which method for quantifying "microalbuminuria" in diabetics? Comparison of several immunological methods (immunoturbidimetric assay, immunonephelometric assay, radioimmunoassay and two semiquantitative tests) for measurement of albumin in urine*. Acta Diabetol, 1992. **28**(3-4): p. 239-45.
52. Poulsen, P.L., et al., *Evaluation of a dipstick test for microalbuminuria in three different clinical settings, including the correlation with urinary albumin excretion rate*. Diabete Metab, 1992. **18**(5): p. 395-400.
53. Leong, S.O., et al., *The use of semi-quantitative urine test-strip (Micral Test) for microalbuminuria screening in patients with diabetes mellitus*. Singapore Med J, 1998. **39**(3): p. 101-3.
54. Fernandez Fernandez, I., et al., *Rapid screening test evaluation for microalbuminuria in diabetes mellitus*. Acta Diabetol, 1998. **35**(4): p. 199-202.
55. Stites, D.P. and A.I. Terr, *Basic and clinical immunology*. 17 ed. 1991, Connecticut: Appleton & Lange. 869.
56. Butch, A.W., *Dilution protocols for detection of hook effects/prozone phenomenon*. Clin Chem, 2000. **46**(10): p. 1719-21.

OBJETIVO

Avaliar diferentes métodos para a medida de albuminúria e verificar o impacto da mudança de metodologia na classificação dos diferentes estágios da nefropatia diabética.

***Avaliação do impacto das mudanças de imunoenaios na
determinação da albumina urinária para o diagnóstico da
nefropatia diabética***

Gustavo Müller Lara¹

Andréa Elisabet Wendland²

Mirela Jobim de Azevedo³

Jorge Luiz Gross³

Joíza Lins Camargo^{2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Endocrinologia, UFRGS, ² Unidade de Bioquímica e Imunoensaios do Serviço de Patologia Clínica e ³ Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

* Autor para correspondência: Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, rua Ramiro Barcellos, 2350 – 2º andar, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil, Fax: 51 21018310, e-mail: jcamargo@hepa.ufrgs.br

RESUMO

Introdução: A nefropatia diabética (ND) é uma importante complicação crônica do diabetes mellitus (DM) sendo a determinação da albumina urinária utilizada para seu diagnóstico. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da mudança de metodologia e de procedimentos diagnósticos padronizados (*kits*) para a dosagem da albuminúria, na classificação dos diferentes estágios da ND.

Métodos: Neste estudo de teste diagnóstico foram selecionadas 98 amostras de urinas de pacientes diabéticos sem distinção quanto ao sexo, idade e tipo de DM. A albumina urinária foi determinada utilizando imunoenaios comerciais, sendo 4 ensaios imunoturbidimétricos (A, B, C, D) e 1 quimioluminescente (E). O método A foi utilizado como critério de referência para classificar as amostras em: normoalbuminúricas (albuminúria <30 mg/24h ou <17 mg/L em amostra casual); microalbuminúricas (albuminúria 30-299 mg/24h ou 17-173 mg/L em amostra casual); e macroalbuminúricas (albuminúria >300 mg/24h ou >174 mg/L em amostra casual). A comparação analítica dos métodos foi feita pela correlação de Pearson e pelos gráficos de Bland-Altman. A concordância diagnóstica foi analisada pela estatística Kappa .

Resultados: Todos os métodos estudados apresentaram coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaio <6%. A sensibilidade foi semelhante em todos os métodos (aproximadamente 5 mg/L). A linearidade variou de 60 a 400 mg/L. Os métodos B.C.e D apresentaram uma excelente correlação e concordância analítica comparados com o método A sendo que as médias das diferenças entre todos eles (A, B, C, D) não foram diferentes ($P > 0.05$). Apenas o método E diferiu dos demais em todas as faixas de concentração. Já a concordância diagnóstica com o método de referência foi de 91,8%; 94,9%, 91, 8% para os métodos A, B, C e D respectivamente de 80,0% para o método E. Menos de 10% das

amostras foram classificadas diferentemente do método de referência pelos ensaios imunoturbidimétricos, enquanto que 20% das amostras foram classificadas erroneamente pelo método quimioluminescente.

Conclusão: Os métodos imunoturbidimétricos analisados para medida de albuminúria não modificaram de forma importante o diagnóstico da nefropatia diabética nos diferentes estágios, podendo ser intercambiáveis. O método quimioluminescente pode modificar a classificação da ND e deve ter os resultados interpretados com precaução, principalmente nos limites superior ou inferior dos pontos de corte diagnóstico.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica que, devido a defeitos na secreção e/ou na ação da insulina, se caracteriza por hiperglicemia crônica e pode apresentar complicações micro e macrovasculares (1). As complicações crônicas do DM podem causar, a longo prazo, falência de vários órgãos, entre eles, os rins (2, 3) levando ao aparecimento de nefropatia diabética (ND) (4).

Aproximadamente até 40% dos pacientes diabéticos desenvolvem ND e esta complicação está associada a um aumento na mortalidade cardiovascular (5). A ND é a causa mais freqüente de doença renal em pacientes ingressando em programas de hemodiálise (6)

Estudos da década de 80 (7-9) mostraram que pequenas quantidades de albumina na urina, usualmente não detectadas por métodos laboratoriais convencionais, eram preditivas do desenvolvimento de proteinúria em pacientes diabéticos. A partir destes estudos foi definido o termo microalbuminúria, e por consenso estabelecidos os valores diagnósticos. O diagnóstico pode ser feito a partir de urinas de 24h, com ou sem tempo marcado, ou ainda em coleta isolada de urina (10-12). A ND é classificada, com base nos valores de excreção urinária de albumina (EUA) em normoalbuminúria, microalbuminúria ou nefropatia incipiente e macroalbuminúria ou nefropatia clínica de acordo com o Quadro 1. Atualmente existem evidências sugerindo que o risco de desenvolver ND começa já quando os valores de EUA estão nos limites superiores dos valores adotados para definir normoalbuminúria (10, 13) e que o risco cardiovascular aumentado inicia já na fase de microalbuminúria (5).

A detecção precoce da ND através da medida da EUA e a implantação de estratégias terapêuticas efetivas, previnem e/ou reduzem a progressão da doença renal (4, 14). Estudos como o United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) e Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) mostraram que a obtenção de um controle glicêmico (15, 16) e

pressórico (16) intensificados no DM podem reduzir significativamente o aparecimento e progressão de microalbuminúria e conseqüentemente da nefropatia clínica nos pacientes diabéticos.

De acordo com consensos atuais, o primeiro passo para o rastreamento e diagnóstico da ND é a medida da albumina em uma amostra urinária isolada, coletada na primeira hora da manhã ou casualmente durante o dia. Este procedimento apresenta acurácia adequada e é fácil de realizar (12, 17). Como a variação biológica diária da EUA é de 40% a 50% (12), o diagnóstico de microalbuminúria necessita de confirmação com uma segunda medida, preferencialmente utilizando-se urina de 24 horas (4).

Os testes laboratoriais, tradicionalmente imunoenaios, devem ser sensíveis e específicos para detectar pequenas mudanças na EUA (12). Devido a grande variedade de reagentes e *kits* disponíveis no mercado, torna-se necessário a avaliação criteriosa destas metodologias. Na rotina laboratorial freqüentemente há a necessidade de troca de metodologias ou fabricantes de reagentes, e a comparação e validação de novos métodos são essenciais para evitar erros ou diferenças significativas nos resultados de albuminúria e como conseqüência na conduta clínica dos pacientes.

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da mudança de metodologia e de procedimentos diagnósticos padronizados (*kits*) para a dosagem da albuminúria, na classificação dos diferentes estágios evolutivos da ND.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do estudo: Estudo de acurácia de testes diagnósticos.

Pacientes: Foram selecionadas, por conveniência e aleatoriamente, 98 amostras de urinas de pacientes diabéticos, sem distinção em relação ao gênero ou idade, atendidos pelo Serviço de Endocrinologia e Medicina Interna do Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre o período de Novembro de 2005 a Janeiro de 2006.

Amostras de urina: As amostras foram provenientes de coletas de 24h ou de amostras isoladas. Todas as amostras selecionadas para análise foram consideradas estéreis (urocultura negativa) e conservadas a -80°C até a realização da dosagem da albuminúria, realizada em um período inferior a 3 meses. Nesta ocasião as amostras foram descongeladas, centrifugadas e analisadas no mesmo dia.

Métodos: A albumina urinária foi determinada utilizando imunoensaios comerciais conforme descrito no Quadro 2, sendo 4 ensaios imunoturbidimétricos e 1 quimioluminescente. O método A foi utilizado como critério de referência para classificar as amostras em: normoalbuminúricas (albuminúria <30 mg/24h ou <17 mg/L em amostra casual); microalbuminúricas (albuminúria 30-299 mg/24h ou 17-173 mg/L em amostra casual); e macroalbuminúricas (albuminúria >300 mg/24h ou >174 mg/L em amostra casual) [10-12]. Para o controle do eventual efeito pró-zona nos imunoensaios para albumina, a proteína urinária total (PTU) foi dosada por ensaio turbidimétrico (Cloreto de Benzetônio U/CSF Protein Roche[®], no aparelho Hitachi 917 Roche[®]), previamente à dosagem de albuminúria, em todas as amostras. Esta medida estimou a contribuição da albumina na concentração de PTU em cada amostra (18). Considerou-se que, em média, 50% da concentração de proteína total é constituída de albumina (na faixa de micro e macroalbuminúria). A partir desta estimativa, foi realizada uma diluição da amostra de urina a

ser dosada (1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/30 ou 1/50), permitindo a medida da albuminúria dentro da faixa de medição de cada ensaio. As urinas estimadas como normoalbuminúricas (PT < 174 mg/L) [11] não foram previamente diluídas.

Os coeficientes de variação (CV) intra (n = 5) e inter-ensaios (n = 10) para cada um dos métodos utilizados neste estudo, foram determinados utilizando-se dois controles comerciais com concentrações de albuminúria de 30 mg/L (faixa normal) e de 100 mg/L (faixa patológica). A reprodutibilidade do método E foi analisada apenas pelo controle comercial, com albuminúria de 30 mg/L, devido a linearidade do método ser até 60 mg/L. A sensibilidade analítica e linearidade dos métodos foram comparadas.

Análise Estatística: A comparação entre os diferentes métodos utilizados foi feita através da correlação de Pearson. A análise dos valores de concordância analítica (diferenças entre as médias dos resultados entre os métodos) foi realizada através dos gráficos de Bland–Altman (19) e ANOVA de Friedman, seguida de teste de comparação múltipla.

A concordância diagnóstica foi analisada pela estatística Kappa, onde kappa = 0 indica total discordância e kappa = 1 indica total concordância.

Os dados foram descritos como mediana e (mínimo - máximo). Os valores de albumina foram transformados em escala logarítmica (Ln), devido a sua distribuição não paramétrica para a análise estatística. Foi adotado o nível de significância de 5%. O programa SPSS 12.0 foi utilizado para a análise dos dados.

RESULTADOS

Foram analisadas 98 amostras de urinas, das quais 40 eram urinas de 24h e 58 eram amostras casuais. De acordo com os valores de EUA, 27 urinas foram classificadas como normoalbuminúricas, 49 como microalbuminúricas e 22 como macroalbuminúricas, como descritas na Tabela 1.

Os desempenhos analíticos dos métodos estudados estão descritos na Tabela 2. Todos os métodos estudados apresentaram CVs intra e inter-ensaio inferiores a 6%. Nos diferentes métodos a sensibilidade analítica variou de 0 a 5 mg/L, e a linearidade variou de 60 a 400 mg/L, sendo que o método C apresentou a maior linearidade.

Todos os métodos estudados apresentaram uma excelente correlação com o método de referência adotado (Método A) (Figura 1; Tabela 3). Os resultados de concentração de albumina obtidos pelos métodos B [59,3 mg/L (2,3 – 1151,0)], C [56,0 mg/L (>3,0 – 1109,0)], e D [48,2 mg/L (>4,0 – 950,0)] quando comparados com o método A [54,4 mg/L (5,3 – 1938,0)], e entre eles, não foram diferentes ($P > 0,05$). Já a comparação do método E [48,8 mg/L (5,3 – 1398,0)] foi diferente tanto em relação ao método A quanto aos métodos B, C e D ($P < 0,01$) (Tabela 3). Embora todos os métodos tenham apresentado uma excelente correlação com o método de referência, os métodos B, C e D apresentaram um desvio negativo nos resultados mais altos de albumina, enquanto o método E apresentou um desvio positivo nesta mesma faixa, como pode ser observado pela inclinação das retas expressas na Figura 1.

A concordância analítica, representada pelas diferenças das médias entre o método A e os métodos em estudo, estão representadas na Figura 2. A média das diferenças observadas entre os métodos A e os demais métodos foram: A vs. B = 8,17 (-1,23 a 17,58); A vs. C = 13,34 (3,99 a 22,69); A vs. D = 35,1 (19,69 a 50,48); A vs. E = - 49,5 (-84,83 a -14,18). Não

houve diferença entre os valores de concordância analítica obtidos entre os métodos A, B, C e D ($P > 0,05$) e o método E apresentou uma maior diferença em relação a todos os outros métodos ($P < 0,01$).

A concordância diagnóstica com o critério de referência adotado (método A), considerando os diferentes estágios da ND (normo, micro e macroalbuminúria) foi de 91,8%; 94,9%; 91,8% e 80,0% para os métodos B, C, D e E, respectivamente. Quando avaliadas pela estatística Kappa, as concordâncias para os métodos B, C e D foram consideradas excelentes ($\kappa = 0,887$; $0,929$ e $0,887$; respectivamente). O método E apresentou uma concordância diagnóstica regular ($\kappa = 0,693$). A concordância diagnóstica entre os diferentes métodos está descrita na Tabela 4. Do total de amostras analisadas, 8 (8,2%) no método B, 5 (5,1%) no método C e 8 (8,2%) no método D foram discordantes com os resultados do Método A. O método E apresentou 9 (20%) resultados discordantes do método de referência.

Quadro 1 – Valores de albuminúria para o diagnóstico de ND (10-12)

Estágios	Amostra casual (mg/L)	Urina de 24 h (mg/24h)
Normoalbuminúria	< 17	< 30
Microalbuminúria	17 a 174	30 a 300
Macroalbuminúria	> 174	> 300

Quadro 2 – Características dos imunoenaios comerciais para dosagem de albuminúria utilizados neste estudo:

Método	N	Princípio	Fabricante	Equipamento
A	98	Imunoturbidimetria	Urin Pack Imuno Bayer®	Cobas Mira - Roche
B	98	Imunoturbidimetria	Malb Apetc BioSys	Hitachi 917 - Roche
C	98	Imunoturbidimetria	Albumin Tina-Quant® Roche	Hitachi 917 - Roche
D	98	Imunoturbidimetria	Microalbumin Randox	Hitachi 917 - Roche
E	48	Quimioluminescência	Microalbumin DPC	Immolute – DPC

Tabela 1 – Valores de albumina urinária nos diferentes estágios da nefropatia diabética nas amostras avaliadas.

	Amostra casual (mg/L) (n = 58)	Amostra 24 h (mg/24h) (n = 40)
Normoalbuminúria (n = 27)	9,1 [5,0 – 16,5]	14,7 [8,4 – 29,2]
Microalbuminúria (n = 49)	68,7 [18,9 – 170,9]	93,1 [30,8 – 282,6]
Macroalbuminúria (n = 22)	346,4 [185,7 – 1126,0]	911,1 [360,8 – 3034,6]

Dados expressos como mediana [mínimo – máximo].

Tabela 2 – Desempenho analítico dos imunoensaios para albumina urinária.

	CV (%)				Faixa de medição (mg/L) [§]
	Intraensaio		Interensaio		
	30 mg/L	100 mg/L	30 mg/L	100 mg/L	
A	5,5	4,6	2,5	3,2	5,0 – 160,0
B	0,7	1,0	3,6	2,9	0,0 – 200,0
C	0,7	0,6	4,4	1,6	3,0 – 400,0
D	1,1	1,1	3,8	2,0	4,0 – 200,0
E	2,6	-	2,9	-	2,5 – 60,0

[§] Limites fornecidos pelo fabricante; métodos A [Bayer], B [Aptec], C [Roche], D [Randox]; E [DPC].

Tabela 3 – Correlações e concordâncias analíticas entre os imunoenaios para albumina urinária de acordo com o método de referência adotado (Método A).

Método*	n	r	P [†]	Mediana (mg/L) (Mínimo – Máximo)	Concordância Analítica [‡] (mg/L) (IC 95%)
A vs B	98	0,9906	< 0,001	B: 59,3 (2,3 – 1151,0)	8,17 (-1,23 – 17,58)
A vs C	98	0,9906	< 0,001	C: 56,0 (>3,0 – 1109,0)	13,34 (3,99 – 22,69)
A vs D	98	0,9878	< 0,001	D: 48,2 (>4,0 – 950,0)	35,09 (19,69 – 50,48)
A vs E	41	0,9630	< 0,001	E: 48,8 (5,3 – 1938,0)	-49,50(-84,83 – -14,18)

* Método A = 54,4 mg/L (5,0 – 1392,0) e A [Bayer], B [Aptec], C [Roche], D [Randox], E [DPC]; [†] p < 0,0001; [‡] diferenças entre as médias do método A e do método em estudo

Tabela 4 – Concordância diagnóstica entre os imunoensaios*

	B			ÍndiceKappa	C			ÍndiceKappa	D			ÍndiceKappa	E			ÍndiceKappa
	Normo	Micro	Macro	A vs B	Normo	Micro	Macro	A vs C	Normo	Micro	Macro	A vs D	Normo	Micro	Macro	A vs E
Normo	20	7	-		23	4	-		26	1	-		7	7	-	
A Micro	-	48	1	0,887	-	49	-	0,929	2	47	-	0,887	-	16	2	0,693
Macro	-	-	22		-	1	21		-	5	17		-	-	13	

* A = kit Urin Pack Imuno Bayer®, B = kit Malb Apetc BioSys, C = kit Albumin Tina-Quant® Roche, D = kit Microalbumin Randox e E = kit Microalbumin DPC.

Normo = Normoalbuminúria; Micro = Microalbuminúria; Macro = Macroalbuminúria

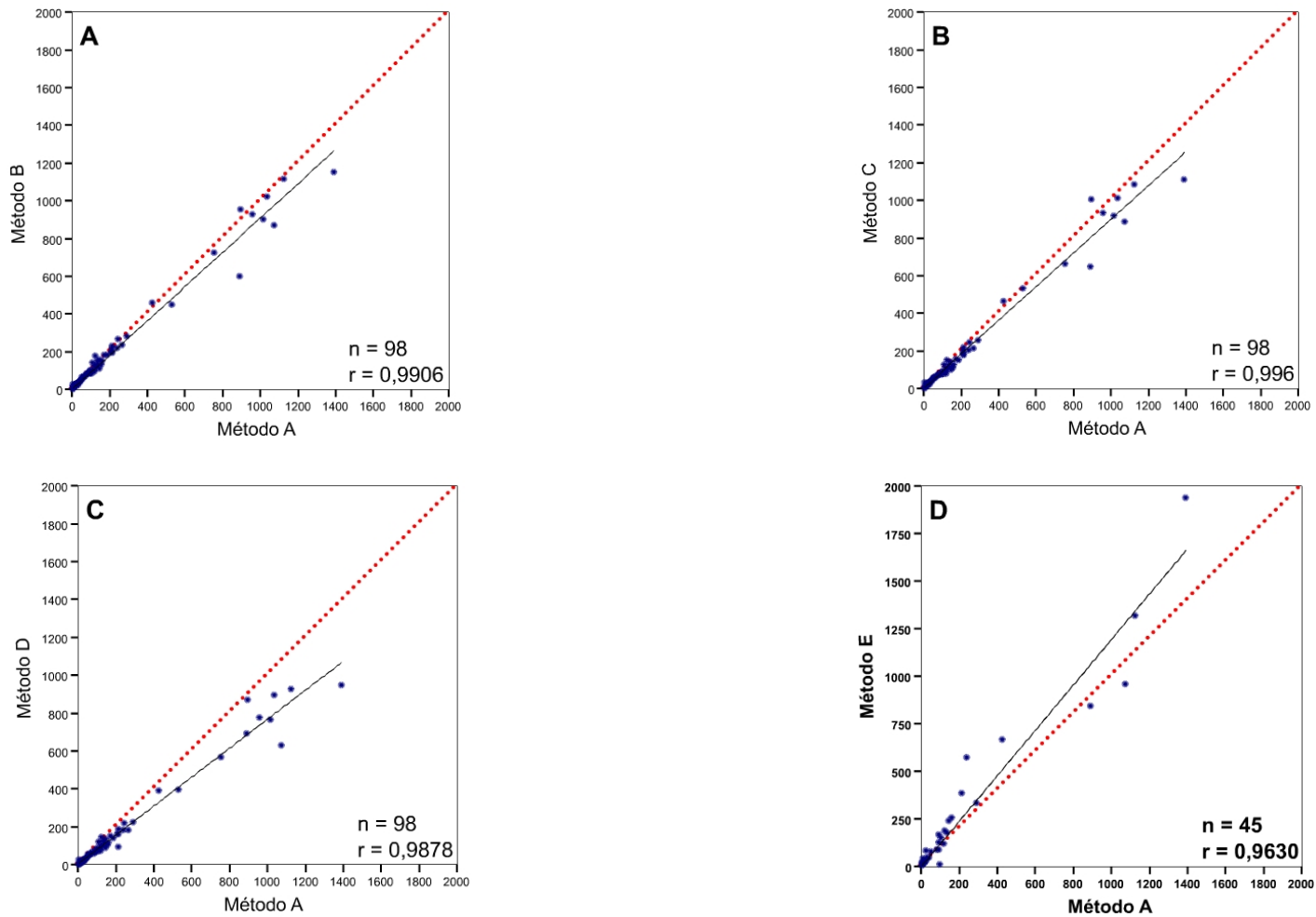


Figura 1 – Correlação entre os diferentes imunoensaios para albumina urinária. (a) Bayer[®] versus Aptec[®]; (b) Bayer[®] versus Roche[®]; (c) Bayer[®] versus Randox[®]; e (d) Bayer[®] versus DPC[®]. (As linhas pontilhadas representam a linha de igualdade, onde Y = X).

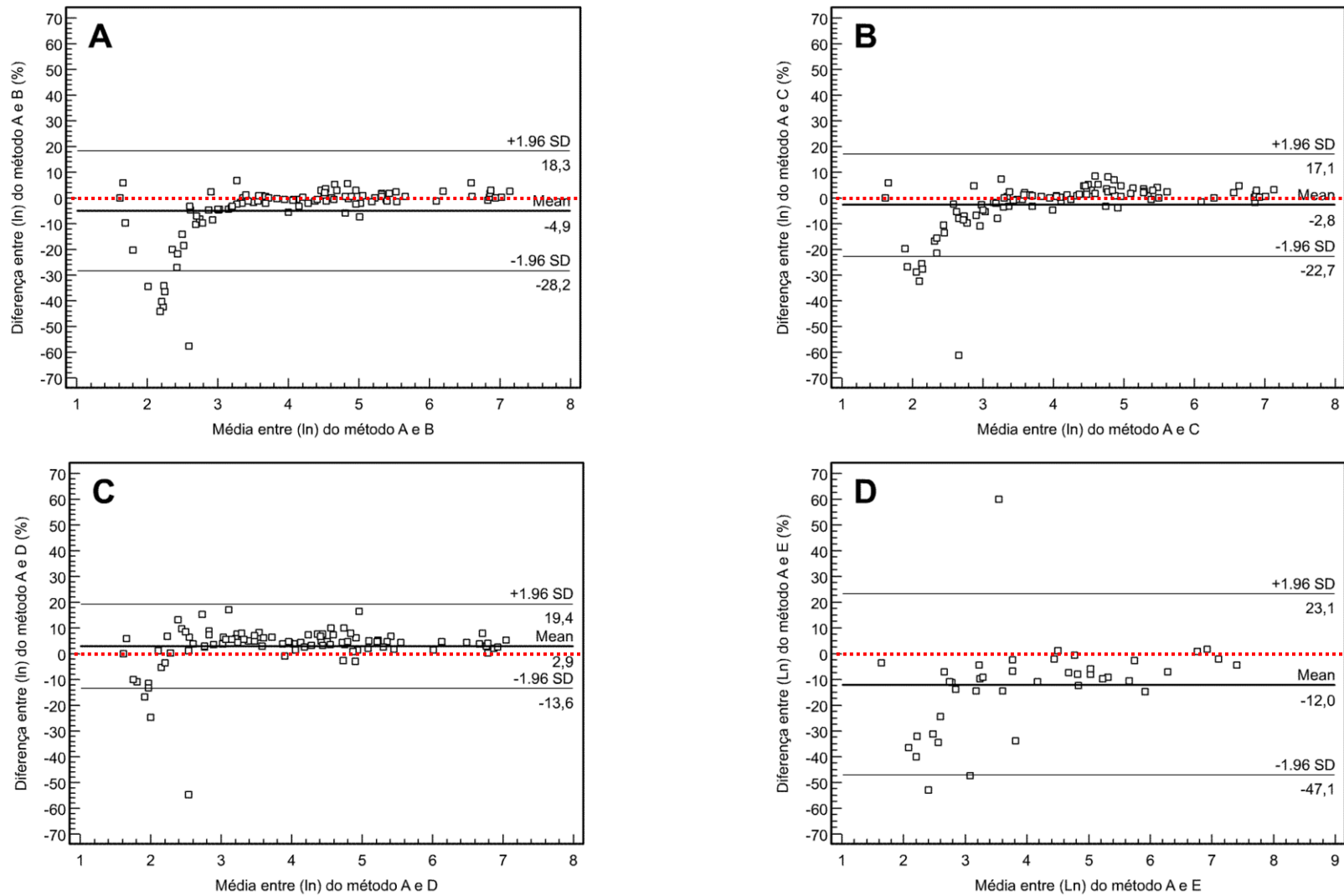


Figura 2 – Gráficos de Bland-Altman para os imunoenaios estudados: (a) Bayer[®] versus Aptec[®], (b) Bayer[®] versus Roche[®], (c) Bayer[®] versus Randox[®] e (d) Bayer[®] versus DPC[®].

DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o impacto da mudança de metodologia para a determinação de albumina na urina, utilizando cinco imunoenaios de fabricantes diferentes, na classificação da nefropatia diabética. Os métodos imunoturbidimétricos analisados não modificaram de forma importante o diagnóstico da ND nos diferentes estágios. Já o método por quimioluminescência apresentou resultados discordantes em 20% das amostras em relação à classificação da ND obtida pelo método de referência adotado (método A).

O coeficiente de variação analítico recomendado para os métodos de determinação de albumina urinária deve ser inferior a 15% [15]. Todos os métodos avaliados neste estudo, tanto em níveis normais quanto patológicos, apresentaram $CV < 6\%$, bem abaixo das metas analíticas recomendadas.

Houve uma excelente correlação entre todos os métodos estudados e o método de referência. No entanto, quando a concordância analítica foi avaliada pelos gráficos de Bland-Altman, observou-se que os resultados na faixa dos valores de normoalbuminúria apresentaram as maiores diferenças, o que provavelmente não afetou o desempenho diagnóstico destes métodos.

A acurácia diagnóstica dos ensaios imunoturbidimétricos estudados foi adequada, como demonstrado através da análise estatística kappa, onde se observa uma concordância de 91,8%; 94,9%; 91,8% para os métodos B, C, D, respectivamente, com o critério de referência adotado (método A), considerando os diferentes estágios da ND. A acurácia do método de E foi regular, como observado pelo índice kappa de 0,693, o que conferiu uma concordância de apenas 80% com o método A.

O método E apresentou uma linearidade (intervalo de medição superior) muito baixa (60 mg/L), e esta provavelmente foi a causa do grande número de amostras discordantes quando dosadas por esta metodologia. Para estarem dentro da faixa de medição do ensaio, as

amostras com concentração >60 mg/L tiveram de ser diluídas quando determinadas pelo método E. Em contraste, os outros métodos só necessitaram de diluições quando o valor de albumina foi maior que 150 mg/L. A diluição é um fator pré-analítico importante e pode inferir erro no resultado final. Neste estudo, 53,3% das amostras analisadas pelo método E apresentaram albuminúria >60 mg/L e necessitaram diluição. A proporção de amostras que necessitaram diluição foi menor nos outros métodos (24%, 21%, 11% e 14%, para métodos A, B C e D, respectivamente) devido a maior linearidade. Para minimizar a variação nos resultados devido a esta possível fonte de erro que ocorreu com maior frequência no método E, a ampliação da faixa de medição, utilizando padrões com concentrações na faixa de 150 – 200 mg/L, é necessária.

Do total de amostras analisadas, 8 (8,2%) no método B (7 normoalbuminúricas e 1 microalbuminúrica), 5 (5,1%) no método C (4 normoalbuminúricas e 1 macroalbuminúrica), 8 (8,2%) no método D (1 normoalbuminúrica, 2 microalbuminúricas e 5 macroalbuminúricas) e 9 (20%) no método E (7 normoalbuminúricas e 2 microalbuminúricas) apresentaram resultados discordantes em relação à classificação da ND (Tabela 4). Os valores de albuminúria destas amostras encontravam-se no limite superior ou inferior dos pontos de corte diagnóstico utilizados.

Deve ser considerado que a classificação final da ND é definida baseada na faixa de concentração de albuminúria obtida em 2 de 3 amostras urinárias (4,12). Esta prática também poderia ser utilizada para minimizar as possíveis variações analíticas, observadas no presente estudo, em especial para as faixas limítrofes para diagnóstico da ND determinação da albumina urinária.

Desta forma, os métodos imunoturbidimétricos analisados neste estudo podem ser intercambiáveis, sem acarretar mudanças significativas na classificação dos diferentes estágios da ND. O método quimioluminescente pode modificar a classificação da ND e deve

ter os resultados interpretados com precaução, principalmente nos limites superior ou inferior dos pontos de corte diagnóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Geneva. World Health Organization, Vol., 1999:59.
2. Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso Detecção e Tratamento das Complicações Crônicas do Diabetes Mellitus. Arq Bras Endocrinol Metabol 1999;43:7-13.
3. Scheffel RS, Bortolanza D, Weber CS, Costa LA, Canani LH, Santos KGd, et al. Prevalência de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes melito do tipo 2 em atendimento ambulatorial. Rev Assoc Med Bras 2004;50:263-7.
4. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. Diabetes Care 2005;28:164-76.
5. Valmadrid CT, Klein R, Moss SE, Klein BE. The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus. Arch Intern Med 2000;160:1093-100.
6. Bruno RM, Gross JL. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study. J Diabetes Complications 2000;14:266-71.
7. Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet 1982;1:1430-2.
8. Parving HH, Andersen AR, Smidt UM, Svendsen PA. Early aggressive antihypertensive treatment reduces rate of decline in kidney function in diabetic nephropathy. Lancet 1983;1:1175-9.

9. Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med* 1984;311:89-93.
10. Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH, Steffes MW. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27 Suppl 1:S79-83.
11. Zelmanovitz T, Gross JL, Oliveira JR, Paggi A, Tatsch M, Azevedo MJ. The receiver operating characteristics curve in the evaluation of a random urine specimen as a screening test for diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 1997;20:516-19.
12. Sacks, D.B., et al., Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem*, 2002. **48**(3): p. 436-72.
13. Murussi M, Baglio P, Gross JL, Silveiro SP. Risk factors for microalbuminuria and macroalbuminuria in type 2 diabetic patients: a 9-year follow-up study. *Diabetes Care* 2002;25:1101-3.
14. Microalbuminuria Collaborative Study Group, United Kingdom. Intensive therapy and progression to clinical albuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and microalbuminuria. *British Medical Journal* 1995;311:973-7.
15. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352:837-53.
16. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993;329:977-86.
17. Incerti J, Zelmanovitz T, Camargo JL, Gross JL, de Azevedo MJ. Evaluation of tests for microalbuminuria screening in patients with diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:2402-7.

18. Zelmanovitz T, Gross JL, Oliveira J, de Azevedo MJ. Proteinuria is still useful for the screening and diagnosis of overt diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 1998;21:1076-9.
19. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986:307-10.