

Falsos negativos en la determinación de proteinuria en pacientes del Hospital General Córdoba; comparación de métodos

José Arnold González-Garrido ¹, Silvia Garrido-Llanos ², Ivonne María Olivares- Corichi ¹ y José Rubén García-Sánchez ¹

¹ Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional México, DF. México. ² Laboratorio de análisis clínicos, Hospital General Córdoba, Veracruz, México

RESUMEN

Introducción. La diabetes y la hipertensión son los dos factores más importantes para el desarrollo de enfermedad renal crónica (ERC). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, uno de cada 10 adultos presenta algún grado de ERC. La cuantificación de proteinuria se utiliza como reflejo de daño renal en las ERC que puede ser modificable.

Objetivo. El propósito de este estudio fue comparar la variación en la cuantificación de proteinuria en la tira reactiva con respecto a técnicas espectrofotométricas en pacientes del Hospital General Córdoba, Veracruz.

Materiales y Métodos. En este estudio fueron incluidos 58 pacientes. La proteinuria fue determinada usando la tira reactiva y las técnicas de Lowry, Bradford y rojo de pirogalol en los sistemas URISCAN PRO II, ILAB y Beckman Coulter (DU-650).

Resultados. En los 58 pacientes se encontraron 37 positivos y 21 negativos, con promedio de edad de 44 años. Los principales diagnósticos fueron DM e hipertensión arterial. Los resultados indicaron un incremento en los valores de proteinuria de 3.41 veces por Lowry, 1.97 veces por Bradford y 2.68 veces para rojo de pirogalol en comparación con los valores obtenidos en la tira reactiva. Además, se detectó 52.4% falsos

negativos.

Conclusiones. En este estudio se reportó que la cuantificación de proteinuria por tira reactiva no presenta la sensibilidad necesaria en pacientes de alto riesgo y sugiere la necesidad de implementar el uso de técnicas complementarias en la valoración de proteinuria.

Palabras Clave: tira reactiva, Lowry, Bradford, rojo de pirogalol, proteinuria

ABSTRACT

False-negative in the determination of proteinuria in patients of General Hospital Cordoba; comparison of methods.

Introduction. The diabetes and hypertension are the two most important factor in development of Kidney chronic diseases (KCD). According to the World Health Organization one in 10 adults has some degree of CKD. Quantitation of proteinuria is used as a reflection of renal damage in the ERC, which can be modified.

Objective. The purpose of this study was to compare the variation in quantifying proteinuria on dipstick regarding spectrophotometric techniques in patients of General Hospital Córdoba, Veracruz.

Material and Methods. A total of 58 patients was included in the study. Proteinuria was

Autor para correspondencia: José Arnold González-Garrido, Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Casco de Santo Tomas, Delegación Miguel Hidalgo, C.P. 11340, México, D.F. **E-mail:** goga_ja13@hotmail.com

Recibido: el 17 de abril de 2015. **Aceptado para publicación:** el 1 de julio de 2015

Este documento está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb152632.pdf>

determined using the test strip and techniques Lowry, Bradford and pyrogallol red in URISCAN PRO II, ILAB and Beckman Coulter (DU-650) systems.

Results. Of the 58 patients included in the analysis dipstick proteinuria in 37 positive and 21 negative patients were found, with an average age of 44 years. The main diagnoses were DM and hypertension. Results indicated an increase in the values of proteinuria Lowry 3.41 times, Bradford 1.97 times and 2.68 times to pyrogallol red compared to the values obtained in the dipstick. In addition, 52.4% false negatives were detected.

Conclusion. In this study, we report that the quantification of proteinuria by dipstick does not have the necessary sensitivity in high-risk patients and suggests the need to implement the use of complementary techniques in the assessment of proteinuria.

Key words: dipstick, Lowry, Bradford, pyrogallol red, proteinuria

INTRODUCCIÓN

El examen general de orina es utilizado en la clínica, para la búsqueda de marcadores que reflejen las condiciones de salud del paciente (1). Entre estos marcadores se encuentra la proteinuria que permite conocer la presencia o evolución de diversas enfermedades que conllevan el desarrollo de la ERC entre las principales enfermedades que desencadenan la proteinuria se destacan la Diabetes Mellitus y la hipertensión (2, 3). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que en el mundo existen aproximadamente 150 millones de personas con diabetes, las cuales si no reciben un cuidado estricto de su padecimiento estarán llenando las Unidades Nefrológicas, que hoy en día son insuficientes para la atención de los pacientes diabéticos con enfermedad renal, alertando en la detección de pacientes en alto riesgo de ERC (4). Diversos estudios describen

la importancia en la cuantificación de proteinuria como un reflejo de daño renal en las ERC, el cual puede ser modificable mediante un diagnóstico temprano, que permita una mayor eficiencia en el tratamiento y manejo de los pacientes. (5-7). De hecho, la cuantificación de proteinuria en el examen general de orina es determinada mediante la utilización de la tira reactiva. Por lo tanto, en este trabajo nos planteamos determinar las diferencias en los valores de proteinuria evaluados mediante la utilización de la tira reactiva del examen general de orina y los métodos de Lowry, Bradford y Rojo de Pirogalol utilizados en la cuantificación de proteínas.

MATERIALES Y METODOS

Localidad. El Hospital General Yanga es un Hospital de Segundo nivel que se encuentra ubicado en la parte sur de la ciudad de Córdoba, Veracruz, México. La ciudad se encuentra colindando en el norte con el municipio de Ixuatlan del Café, en el noroeste con los municipios de Tomatlan y Chocaman, en el este y sureste con el municipio de Amatlan de los reyes y en el suroeste con el municipio de Fortín de las Flores.

Población de estudio. Este estudio se realizó en el Departamento de Uroanálisis y Bioquímica del Hospital General Yanga de Córdoba, Veracruz, México; durante el período comprendido del 1° de Enero del 2013 al 30 de Abril del 2013. Se incluyeron, los pacientes de consulta externa que contaban con las condiciones adecuadas y aceptaron participar.

Consentimiento informado. El estudio se realizó de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki de 1975 (revisada en 1983), fue consistente con las guías de buena práctica clínica. El protocolo de este estudio fue aprobado por el comité de investigación y ética del Hospital General Córdoba y un consentimiento informado por escrito fue obtenido de cada uno de los participantes.

Comparación metodológica de proteinuria

Muestras de Orina. Se obtuvieron 20 ml de la primera orina de la mañana, fue recolectada en condiciones asépticas en frascos de plástico estériles y fueron procesadas al ingresar al laboratorio.

Cuantificación de proteinuria

Método Cualitativo. Se realizó la medición cualitativa mediante la utilización de la tira reactiva URISCAN utilizada para el examen general de orina (EGO), y el lector de tiras URISCAN PRO II. Las mediciones fueron realizadas previa calibración y evaluación de los controles del equipo Uritrol.

Método cuantitativo. Las lecturas fueron realizadas en los equipos ILAB (rojo de pirogalol) y en el espectrofotómetro Beckman Coulter DU 650 (Bradford y Lowry).

Lowry. Se tomaron 250 μ L de orina (diluida 1:100) de la muestras, posteriormente se agregó 1 mL del reactivo (2% de Na_2CO_3 en 0.10 N NaOH , 5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1% de tartrato de sodio) incubando durante 10 minutos, transcurrido el tiempo de incubación se le agregaron 100 μ L del reactivo de Folin Ciocalteu, incubándose durante 50 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo de la coloración. Las absorbancias de las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm (8).

Bradford. Se tomaron 100 μ L de la muestras de orina (previamente diluida 1:100) y se le adicionó 1 mL del reactivo de Bradford (azul de Coomasie-G), posteriormente se mezcló y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la lectura de la absorbancia a 595 nm (9).

Rojo de pirogalol. Se tomaron 20 μ l (dilución 1:5) de la muestras de orina y se le adicionó 1 mL del reactivo de rojo de pirogalol (POINTE SCIENTIFIC), posteriormente las muestras fueron incubados a 37°C por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se realizó la lectura a 600 nm (10)

Análisis estadístico. Los resultados fueron

expresados como las medias \pm error estandar. Los datos obtenidos en los diferentes experimentos fueron analizados estadísticamente mediante un método de análisis de varianza (ANOVA) y el análisis post hoc mediante una prueba de Bonferroni en el programa estadístico Prism 5.0, un valor de $p < 0.05$ se consideró para establecer que existe diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio.

RESULTADOS

En este estudio se incluyeron 58 pacientes, cuya edad promedio fue de 44 años en un intervalo de 17 a 77 años de edad. En el **Cuadro 1**, se indica la población en estudio y su clasificación por diagnóstico encontrado. En el análisis de la proteinuria en tira reactiva se encontraron 37 pacientes positivos y 21 negativos. Si bien el grupo de pacientes presentaron distintos diagnósticos, una mayor prevalencia de Diabetes mellitus 2 (DM2) se encontró en la mayoría de nuestra población en estudio. (70.6% de los participantes). De hecho, todos los pacientes negativos a proteinuria presentaron el diagnóstico de DM2 (**Cuadro 1**).

Por otro lado, la determinación de proteinuria mediante las técnicas de Lowry, Bradford y rojo de pirogalol en el grupo de

Cuadro 1
Frecuencia de diagnósticos encontrados y rango de edad

Diagnóstico	(+) proteinuria n=37		(-) proteinuria n=21	
	Frecuencia %	Edad	Frecuencia %	Edad
Diabetes mellitus tipo 2	21 56-75%	22-77 años	21 100%	25-40 años
Hipertensión arterial	7 18.91%	34-77 años		
Embarazo	9 24.32	17-34 años		
Total	100%		100%	

estudio indicó (**Cuadro 2**), los resultados mostraron un incremento en los valores de 3.41 veces por Lowry, 1.97 veces por Bradford y 2.68 veces para rojo de pirogalol en comparación con los valores obtenidos en la tira reactiva. Con la finalidad de conocer las diferencias en los valores de proteinuria por frecuencias de diagnóstico y la determinación en la tira reactiva, se agruparon en el **Cuadro 3**. El diagnóstico con DM2 fue el que presentó los valores más altos en la cuantificación de proteinuria, sin embargo, al determinar la proteinuria de los pacientes que dieron negativos en la tira reactiva se encontró que, 52.4 % de los pacientes, con valores de proteinuria negativo en tira reactiva, fueron falsos negativos y debieron ser detectados, ya que se encontraron sobre el límite de detección (15 mg/dL). Estos resultados muestran que la evaluación de proteinuria mediante tira reactiva, permite detectar pacientes con una proteinuria marcada; sin embargo, la utilización de las técnicas de Lowry, Bradford y rojo de pirogalol pueden ser de utilidad para determinar niveles de proteinuria de importancia clínica en determinados diagnósticos como la DM2.

DISCUSIÓN

En la valoración de la función renal, la cuantificación de proteinuria es parte del examen general de orina en el laboratorio clínico. Diversos estudios indican que la evaluación de microalbuminuria o determinación de la proporción radio albúmina/creatinina, permite

el diagnóstico temprano de un trastorno renal (11,12), sin embargo, la cuantificación de estos marcadores no son parte del EGO, siendo la determinación de proteinuria el indicador frecuentemente utilizado en la clínica como un marcador de daño renal (13-15); no obstante, se describe la presencia de proteinuria como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Se define a este tipo de pacientes como un grupo de alto riesgo de mortalidad cardiovascular temprana, encontrándose con mayor frecuencia en la DM2 y la hipertensión esencial(16-18); en nuestro estudio ponemos de manifiesto la presencia de los pacientes con DM2 (70.6%). Si bien en nuestro resultado se muestra pacientes con DM2, en el grupo de pacientes negativos a proteinuria en la tira reactiva, atribuible a la falta de sensibilidad, proponemos que la utilización de técnicas cuantitativas como las técnicas de Lowry, rojo de pirogalol y Bradford, permitiría disminuir los falsos negativos, considerando la importancia de la detección de proteinuria en el manejo de este tipo de pacientes (1,2).

Es de amplio conocimiento que la utilización de tiras reactivas detecta preferentemente albúmina, que es menos sensible frente a globulinas y puede presentar falsos negativos cuando las proteínas urinarias son de bajo peso molecular. Por otra parte, se han realizado ensayos con las tiras reactivas Combistrix (19), Combur-Test strip [Roche], URS-4S [Meditest], UroColor-4S [Standard Diagnostics] y Sticks [Arkray]), observando que la gravedad específica en la orina y la utilización de tiras reactivas permite incrementar la precisión en la cuantificación de proteinuria (19,20). De acuerdo a los resultados encontrados la mayor detección de proteinuria fue por el método de Lowry, el cual, podría estar direccionado por la sensibilidad con proteínas de bajo peso molecular y péptidos. Se ha descrito que el método de Lowry presenta una sensibilidad por las globulinas en comparación con otros métodos colorimétricos.

Cuadro 2
Comparación de técnicas
en la cuantificación de proteinuria

	Tira (mg/dL)	Lowry (mg/dL)	Bradford (mg/dL)	Rojo pirogalol (mg/dL)
(+) proteinuria n=37	51.90±8.07	177.00±14.57*	102.50±14.30*	139.10±26.20*
(-) proteinuria n=21	-----	19.82±08.00*	12.73±07.70*	14.04±07.78

Los datos son expresados como media + EE, analizado por ANOVA
±p<0.05

Comparación metodológica de proteinuria

Cuadro 3
Valores de proteinuria en diagnósticos encontrados

Diagnóstico	(+) proteinuria en tira reactiva n=37			
	Tira (mg/dL)	Lowry (mg/dL)	Bradford (mg/dL)	Rojo pirogalol (mg/dL)
Diabetes mellitus tipo 2 n=21	41.43±9.86	166.9±13.23*	104.3±14.54*	111.5±16.40*
Hipertensión arterial n=7	23.57±12.76	51.57±15.02*	45.90±12.86*	36.29±16.30*
Embarazo n=9	32.78±13.13	123±27.29*	78.32±15.03*	76.88±22.23*
Diagnóstico	(-) proteinuria en tira reactiva n=21			
	Tira (mg/dL)	Lowry (mg/dL)	Bradford (mg/dL)	Rojo pirogalol (mg/dL)
Diabetes mellitus n=10 negativos a técnicas espectrofotométricas	<15 mg/dL	11.94±2.15*	5.03±2.60	6.25±2.40
Diabetes mellitus n=11 positivos a técnicas espectrofotométricas	<15 mg/dL	27.94±2.56*	20.43±2.76	21.82±2.64

Los datos son expresados como media ± EE, analizado por ANOVA +p<0.05

(21). Por otro lado, la utilidad de los métodos colorimétricos como las técnicas Bradford y rojo de pirogalol se describen con un mejor desempeño en comparación con métodos turbidimétricos, los cuales son más afines en la detección de albúmina (22). Si bien, el uso de tiras reactivas es de gran utilidad en la clínica, la evaluación de proteinuria con métodos colorimétricos podría disminuir el error analítico que presentan en la evaluación con tiras reactivas. De hecho, el diagnóstico de embarazo ocupó el segundo lugar de prevalencia y valores incrementados de proteinuria. Estos pacientes presentaron proteinuria positiva en la tira reactiva, los valores detectados con las técnicas rojo de pirogalol, Bradford y Lowry fueron incrementados 2.3, 2.39 y 3.7 veces, respectivamente. Además, es importante señalar que la proteinuria es un punto de control durante el embarazo (23). Recientemente, se describen casos de embarazos con síntomas de

preeclampsia, pero con ausencia de proteinuria (24,25) que, de acuerdo a nuestro estudio, sugiere que la ausencia de proteinuria puede estar relacionada con la falta de sensibilidad en la detección de proteinuria por tira reactiva utilizada en el EGO.

Por lo tanto, los datos obtenidos en este trabajo sugieren la necesidad de implementar metodologías cuantitativas en la determinación de proteinuria en el examen general de orina que permitan incrementar la detección de proteinuria en los pacientes y disminuir los falsos negativos. Destacando el énfasis en la necesidad de contar con una atención temprana, con un monitoreo periódico que no disminuya la economía de nuestra población, contribuirá a evitar el incremento en el desarrollo de enfermedades renales, las cuales han tenido un incremento de casos cuya prevalencia, en México, es desconocida (26).

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue apoyado por el Conacyt CB-2010-01157739.

REFERENCIAS

1. **Utsch B, Klaus G.** Urinalysis in children and adolescentst. *Dtsch Arztebl Int.* 2014;111(35-36):617-26.
2. **Ohta M, Babazono T, Uchigata Y, Iwamoto Y.** Comparison of the prevalence of chronic kidney disease in Japanese patients with Type 1 and Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2010;27(9):1017-23.
3. **Schoolwerth AC, Engelgau MM, Hostetter TH, Rufo KH, Chianchiano D, McClellan WM, et al.** Chronic kidney disease: a public health problem that needs a public health action plan. *Prev Chronic Dis.* 2006;3(2):A57.
4. **Willoughby D, Dye C, Burriss P, Carr R.** Protecting the kidneys of patients with diabetes. *Clin Nurse Spec.* 2005;19(3):150-6.
5. **Hunsicker LG, Adler S, Caggiula A, England BK, Greene T, Kusek JW, et al.** Predictors of the progression of renal disease in the Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney Int.* 1997;51(6):1908-19.
6. **Klahr S, Levey AS, Beck GJ, Caggiula AW, Hunsicker L, Kusek JW, et al.** The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *N Engl J Med.* 1994;330(13):877-84.
7. **Peterson JC, Adler S, Burkart JM, Greene T, Hebert LA, Hunsicker LG, et al.** Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The Modification of Diet in Renal Disease Study. *Ann Intern Med.* 1995;123(10):754-62.
8. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
9. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
10. **Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A, Yamanaka M, Ohsawa S, Makino K, et al.** Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin Chem.* 1986;32(8):1551-4.
11. **Slinin Y, Ishani A, Rector T, Fitzgerald P, MacDonald R, Tacklind J, et al.** Management of hyperglycemia, dyslipidemia, and albuminuria in patients with diabetes and CKD: a systematic review for a KDOQI clinical practice guideline. *Am J Kidney Dis.* 2012;60(5):747-69.
12. **Kozan O, Ozcan EE, Sancaktar O, Kabakci G, Turkish investigators of the i Ss.** The prevalence of microalbuminuria and relevant cardiovascular risk factors in Turkish hypertensive patients. *Turk Kardiyol Dern Ars.* 2011;39(8):635-45.
13. **Coca SG, Jammalamadaka D, Sint K, Thiessen Philbrook H, Shlipak MG, Zappitelli M, et al.** Preoperative proteinuria predicts acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;143(2):495-502.
14. **Kojima G, Sonoda K, Bell CL, Chen R, Petrovitch H, Abbott RD, et al.** Proteinuria in midlife and 39-year total mortality: the Honolulu Heart Program. *Ann Epidemiol.* 2014;24(5):407-9.
15. **Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, Manns BJ, James MT, Klarenbach S, et al.** Using proteinuria and estimated glomerular filtration rate to classify risk in patients with chronic kidney disease: a cohort study. *Ann Intern Med.* 2011;154(1):12-21.
16. **Lin CC, Chen CC, Kung PT, Li CI, Yang SY, Liu CS, et al.** Joint relationship between renal function and proteinuria on mortality of patients with type 2 diabetes: the Taichung Diabetes Study. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:131.
17. **Madison JR, Spies C, Schatz IJ, Masaki K, Chen R, Yano K, et al.** Proteinuria and risk for stroke and coronary heart disease during 27 years of follow-up: the Honolulu Heart Program. *Arch Intern Med.* 2006;166(8):884-9.
18. **Keane WF, Eknoyan G.** Proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, elimination (PARADE): a position paper of the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis.* 1999;33(5):1004-10.
19. **Chotayaporn T, Kasitanon N, Sukitawut W, Louthrenoo W.** Comparison of proteinuria determination by urine dipstick, spot urine protein creatinine index, and urine protein 24 hours in lupus patients. *J Clin Rheumatol.* 2011;17(3):124-9.
20. **Makihara N, Yamasaki M, Morita H, Yamada H.** A dipstick test combined with urine specific gravity improved the accuracy of proteinuria determination in pregnancy screening. *Kobe J Med Sci.* 2011;56(4):E165-72.
21. **Singh A, Gudehithlu KP, Le G, Litbarg NO, Khalili V, Vernik J, et al.** Decreased urinary peptide excretion in patients with renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2004;44(6):1031-8.

Comparación metodológica de proteinuria

- 22. Madalena L, Pandolfo M, Facio ML, Garlatti C, Alexandre¹ M, Bresciani PD, et al.** Proteinuria: lesión estructural renal comparación de métodos. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 2013;47:85-93.
- 23. Fabbri S, Alston M, Metz TD, Krull M.** Evaluation of the utility of baseline serum hepatic and renal testing in pregnant patients with chronic hypertension. *J Reprod Med*. 2014;59(9-10):471-5.
- 24. Sibai BM, Stella CL.** Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(5):481 e1-7.
- 25. American College of O, Gynecologists, Task Force on Hypertension in P. Hypertension in pregnancy.** Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2013;122(5):1122-31.
- 26. Trevino-Becerra A.** Chronic renal insufficiency (CRI) an emerging, catastrophic, and therefore priority disease. *Cir Cir*. 2004;72(1):3-4.