

# Determinação do *Cutoff Value* de Proteinúria para Imunofixação Urinária e Redução do Custo Total por Exame

\* Igor Patrick Vasconcelos Vieira<sup>1</sup> ; Gerson Bonfim Ferraz Sousa<sup>1</sup> ; Patrícia Aguiar de Oliveira<sup>1</sup> ; Alan Carvalho Dias<sup>1</sup> ; Luciana de Almeida Silva<sup>1</sup> ; Alessandra Lopes Barbosa<sup>1</sup> ; Graciella Ribeiro Martins<sup>1</sup> ; Lídia Freire Abdalla<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório Sabin Medicina Diagnóstica, Brasília – DF.

\* [igor.vieira@sabin.com.br](mailto:igor.vieira@sabin.com.br)

## Introdução

A detecção de alterações nos perfis eletroforéticos de proteínas totais séricas ou urinárias possuem grande importância diagnóstica em diversas patologias. Destaca-se o uso da metodologia de imunoeletroforese urinária (IFE) no diagnóstico de gamopatias monoclonais devida sua elevada sensibilidade quando comparada à eletroforese isolada como ferramenta única de detecção. O uso da IFE permite determinar o subtipo específico de Imunoglobulinas excretadas pelo paciente, assim como suas respectivas cadeias leves livres (proteína de Bence-Jones) ou associadas.

A metodologia mais estabelecida no momento indica a concentração de urinas para IFE. São utilizadas colunas concentradoras capazes de separar por filtração moléculas com peso molecular >10 kDa, trazendo a concentração dos analitos alvos à faixa de linearidade do teste. No entanto, pacientes com elevado grau de proteinúria frequentemente precisam ser reprocessados em amostras não concentradas para melhor visualização do gel. Com isso, gera-se retrabalho e custo adicional. Ademais, este quadro agrava-se quando considerado o alto valor agregado dos reagentes e seu preço atrelado à variação cambial.

Sendo assim, este trabalho se propôs a encontrar pontos de melhoria processuais que pudessem reduzir o custo total e melhorar o tempo de atendimento total (TAT), sem ônus à qualidade dos laudos liberados.

## Objetivos

1. Determinar o limiar de exclusão (*cutoff value*) de proteinúria para concentração de urina para imunofixação;
2. Avaliar a correlação do aumento de proteinúria e a detecção de Imunoglobulinas e suas frações em amostra urinária.

## Materiais e Métodos

### 1. Obtenção dos dados

Foram analisados retrospectivamente os dados de 1.431 ordens de serviço compreendidas no período de 01/01/2020 a 20/06/2021 onde foram solicitadas análises de proteinúria e imunofixação de urina 24h ou isolada para obtenção do *cutoff value*. As amostras utilizadas para validação experimental foram obtidas entre 12 a 31/08/2021. Não foram necessárias informações pessoais dos pacientes para este estudo, sendo elas desconsideradas.

### 2. Amostras

Todos os pacientes foram orientados sobre o procedimento padrão de coleta da urina através de panfleto informativo e no momento do atendimento na unidade. É recomendado o início da coleta do material após a primeira urina do dia, seguido pela coleta de toda a urina até a primeira do dia subsequente. O material é mantido refrigerado (4 a 8°C) e entregue assim que finalizada a coleta. No caso de amostras de urina isolada, os pacientes colhem 15 mL da primeira urina do dia. As amostras são aliquotadas e centrifugadas a 2.300 x g por 10 minutos antes de seguirem para dosagem de proteínas.

### 3. Dosagem da proteína urinária

A mensuração da concentração de proteínas foi obtida pelo equipamento Advia Chemistry 2400 (Siemens) utilizando o reagente Sensiprot (Labtest) com as configurações indicadas pelo fabricante. A metodologia utilizada é baseada em uma reação colorimétrica entre vermelho de pirogalol e molibdato, que formam um complexo com absorção máxima a 470 nm. O método se baseia na mudança de cor da reação, que ocorre quando o complexo se liga aos grupamentos básicos das proteínas contidas na amostra. Nestas condições, é possível notar a formação de uma coloração azul com absorção máxima a 600 nm. A diferença entre as absorvâncias 600/470 nm é diretamente proporcional à quantidade de proteínas contida na amostra. O coeficiente de variação deste teste é 2,5 %. A linearidade do teste ocorre entre 2 – 100 mg/dL.

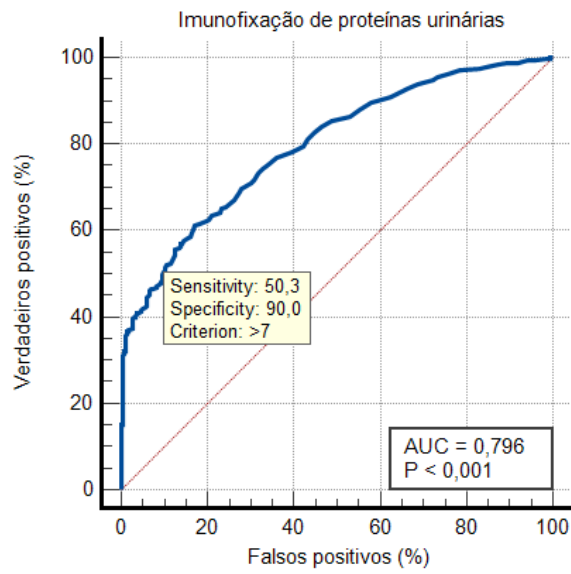
### 4. Imunofixação urinária

A IFE foi realizada de maneira semi automatizada de acordo com os procedimentos padronizados pelo fabricante no equipamento Hydrasys 2 (Sebia). A detecção e caracterização das proteínas de Bence-Jones foram feitas com amostras concentradas em coluna Amicon 10.000 (Merck) ou sem concentração quando indicado. A concentração das proteínas foi feita por centrifugação a 4.500 x g por 30 minutos. As amostras foram aplicadas em géis do tipo HYDRAGEL IF4 (Sebia) e feita a eletroforese de maneira automatizada com protocolo padronizado pelo fabricante. Em seguida, foram aplicados os antissoros para IgA, IgG, IgM, kappa ou lambda nas respectivas linhas do gel. Foi feita a incubação por 5 minutos a temperatura ambiente para que ocorresse a fixação e imunoprecipitação. A etapa final consistiu na coloração dos géis com negro de amido ou violeta ácido. O excesso de corante é lavado e a secagem do gel ocorre de forma automatizada pelo equipamento. Os padrões de bandas foram analisados por inspeção visual.

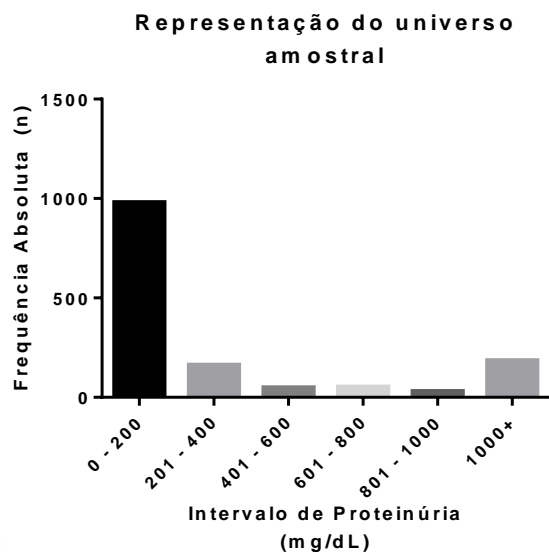
### 5. Tratamento estatístico

A análise da distribuição e dos histogramas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 6. Os dados apresentados possuem distribuição assimétrica positiva. A curva ROC (*relative operating characteristics*) foi construída utilizando o software MedCalc v20.015 e usada para avaliar a performance diagnóstica do teste. Um *p-value* menor que 0,001 foi considerado estatisticamente significativo.

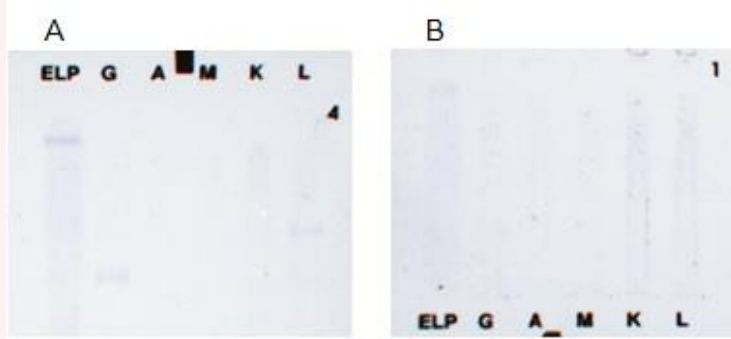
## Resultados e Discussão



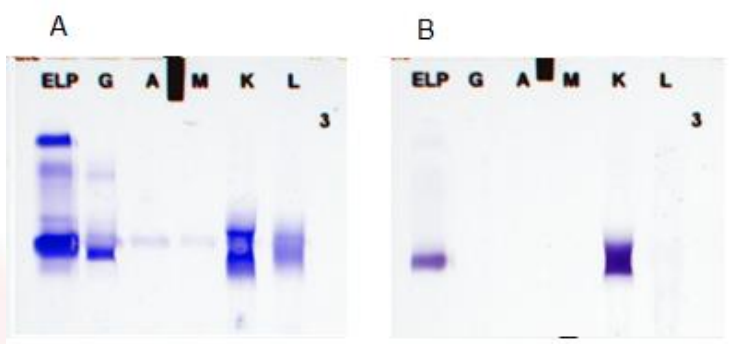
**Figura 1:** Curva ROC obtida a partir dos dados de proteinúria e detecção positiva na Imunofixação. *Cutoff value* calculado de 7,0 mg/dL. Especificidade de 90 % e Sensibilidade de 50,3 %. Área sob a curva (AUC) de 0,796.



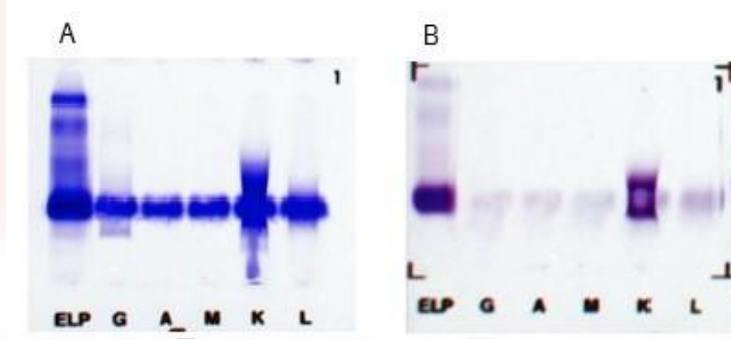
**Figura 2:** Histograma representativo do universo amostral analisado. Nota-se que os dados possuem distribuição assimétrica positiva, sendo a maior frequência em valores inferiores a 200 mg/dL. N = 1.431 exames.



**Figura 3:** Imunofixação de urina 24h com 4,1 mg/dL de proteinúria. Excreta total de proteínas de 118,9 mg/24h. **A:** amostra concentrada; **B:** amostra não concentrada. Presença de componente monoclonal IgG/Lambda detectada apenas em amostra concentrada.



**Figura 4:** Imunofixação de urina 24h com 50,7 mg/dL de proteinúria. Excreta total de proteínas de 745,5 mg/24h. **A:** amostra concentrada; **B:** amostra não concentrada. Presença de componente monoclonal de cadeia leve Kappa sem correspondência com as cadeias pesadas IgA, IgG e IgM.



**Figura 5:** Imunofixação de urina isolada com 143,6 mg/dL de proteinúria. **A:** amostra concentrada; **B:** amostra não concentrada. Presença de componente monoclonal de cadeia leve Kappa sem correspondência com as cadeias pesadas IgA, IgG e IgM.

## Conclusão

1. As conclusões obtidas neste trabalho podem ser replicadas na rotina de qualquer laboratório, desde que avaliado o *cutoff value* de acordo com a metodologia de dosagem proteica e equipamento utilizado.
2. Se a excreção de proteína for superior a 7,0 mg/dL de proteína em urina isolada ou urina 24h, a amostra poderá ser utilizada sem concentração para IFE sem ônus à qualidade do laudo.
3. A melhoria do fluxo de trabalho permitiu a redução de ao menos 43% do uso de colunas concentradoras, impactando também na redução do tempo de processamento e repetições de exames.
4. A utilização de urina não concentrada na IFE de pacientes com proteinúria severa ajuda na visualização do gel e impede efeitos de ligação inespecífica de anticorpos devido à alta concentração proteica da amostra.
5. A concentração de amostras abaixo do *cutoff value* permite a detecção de Imunoglobulinas na urina em estágio inicial da patologia, auxiliando no diagnóstico precoce e início do tratamento.

## Referências Bibliográficas

1. Levinson SS. Urine immunofixation electrophoresis remains important and is complementary to serum free light chain. Clin Chem Lab Med. 2011;49(11):1801–4.
2. Roden AC, Lockington KS, Tostrud LJ, Katzmman JA. Urine protein electrophoresis and immunoelectrophoresis using unconcentrated or minimally concentrated urine samples. Am J Clin Pathol. 2008;130(1):141–5.
3. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. Pattern Recognit Lett. 2006;27(8):861–74.
4. Therneau TM, Kyle RA, Melton LJ, Larson DR, Benson JT, Colby CL, et al. Incidence of monoclonal gammopathy of undetermined significance and estimation of duration before first clinical recognition. Mayo Clin Proc [Internet]. 2012;87(11):1071–9.
5. Han J hua, Wang J nuo, Zhang Y lun, Cao X xin, Zhou D bin, Xu T da, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance in a large population with annual medical check-ups in China. Blood Cancer J. 2020;10(3):10–3.
6. Landgren O, Graubard BI, Kumar S, Kyle RA, Katzmman JA, Murata K, et al. Prevalence of myeloma precursor state monoclonal gammopathy of undetermined significance in 12372 individuals 10-49 years old: a population-based study from the National Health and Nutrition Examination Survey. Blood Cancer J. 2017;7(10):e618.