

## Variabilidad biológica de la concentración de piridinolina + desoxipiridinolina en la primera y segunda orina de la mañana. Elección del espécimen más adecuado para su cuantificación

B. Alegre Pérez, A. Otte de Soler, C. Martínez Camarasa, A. Miralles Bacete

### Resumen

La concentración urinaria de piridinolina y desoxipiridinolina es un buen indicador de la actividad resorptiva ósea. Su aumento durante las últimas horas del sueño aconseja cuantificarla en orina matutina y no en la de 24 horas. La primera y la segunda orina de la mañana serían útiles para esta finalidad. Para averiguar cuál es la más adecuada, se recogieron ambos especímenes mensualmente durante 5 meses en 16 voluntarias de edades entre 33 y 45 años; en todos los casos se determinó el cociente (piridinolina + desoxipiridinolina)/creatininio.

Los coeficientes de variación intra e interindividual fueron menores en la primera orina de la mañana que en la segunda (20,0%-23,4%; 16,1%-19,9%, respectivamente). A su vez, la primera orina matutina mostró menor individualidad, así como validez de los valores de referencia poblacionales (índice de individualidad = 1,4). Los índices de heterogeneidad de ambos especímenes indican la homogeneidad de sus variancias intraindividuales. El coeficiente de variación analítico del método resultó ser adecuado, teniendo en cuenta la variabilidad biológica.

De nuestros resultados podemos concluir que el cociente piridinolina + desoxipiridinolina/creatininio en la primera orina de la mañana ofrece una información más útil que en la segunda.

### Introducción

Los procesos de resorción ósea se han evaluado tradicionalmente midiendo la excreción urinaria de hidroxiprolina. Sin embargo, la sensibilidad diagnóstica de este constituyente para detectar incrementos ligeros de la resorción ósea es insuficiente (1).

En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para evaluar la destrucción ósea, los cuales se han aplicado a la detección y predicción de la osteoporosis (2). Entre ellos cabe mencionar el método de cuantificación de la excreción urinaria de piridinolina y desoxipiridinolina (compuestos reticulados de piridino). Este procedimiento permite detectar modificaciones de la actividad resorptiva incluso en osteopatías que cursan con cambios ligeros, como por ejemplo la osteoporosis posmenopáusica (3,4). La piridinolina y desoxipiridinolina tienen las ventajas de que son prácticamente específicas del colágeno óseo, sólo se liberan al degradarse

### Summary

Pyridinium crosslinks urine concentration is a good indicator of bone resorptive activity. As it increases during the last sleeping hours, it is better to quantify it in morning urine than in random or 24 hours urine. First and second morning urine would be useful to achieve good results; in order to see which one is the most appropriate, both specimens were taken monthly for 5 months in 16 volunteers women between 33 and 45 years old; the pyridinium crosslinks/creatininum ratio was calculated in all of them.

Within and between-subject coefficients of variation were lower in the first morning urine than in the second one (20.0% vs 23.4% and 16.1% vs 19.9%, respectively). On the other hand, the first morning urine showed less individuality, as well as validity of the population-based reference values (index of individuality = 1.4). The indexes of heterogeneity of both specimens show the homogeneity of their within-subject variances. The analytical coefficient of variation of the method was the appropriate, taking into account the biological variation.

From our results we can infer that the first urine morning offers more useful information, according to pyridinium crosslinks/creatininum ratio, than the second one.

éste y no son metabolizadas por el hígado (5-8), por ello se considera actualmente que la eliminación urinaria de piridinolina y desoxipiridinolina es el marcador más útil de resorción ósea (4).

Cuando se trata de medir la concentración urinaria de cualquier constituyente bioquímico es necesario elegir el espécimen más adecuado (orina de 24 horas, primera o segunda orina de la mañana, una muestra al azar, etc.). Tal decisión debe basarse en los datos de variabilidad biológica del constituyente analizado (9). Estos datos permiten establecer el índice de fiabilidad analítica deseable y la utilidad de los valores de referencia poblacionales. El mejor espécimen será el que tenga menor variancia biológica intraindividual. Si, además, sus variancias intraindividuales son homogéneas, las conclusiones obtenidas serán válidas para todos los individuos (9).

La máxima actividad resorptiva ósea a lo largo del día tiene lugar durante las últimas horas del sueño, por lo que existe un máximo en la excreción de piridinolina y desoxipiridinolina entre las 5 y las 8 horas (10-12). Puesto que la mayor eliminación urinaria corresponde a las primeras horas de la mañana, es lógico tratar de usar especímenes de este periodo matutino cuando se quiere evitar la utilización de orina

Laboratorio de Análisis Clínicos,  
Hospital de Sagunto,  
Puerto de Sagunto (Valencia).  
Recibido: 23-8-95.  
Aceptado el 4-3-96

de 24 horas. En diferentes trabajos, por otra parte, se ha comprobado que existe buena correlación entre la excreción de piridinolina y desoxipiridinolina en la primera o segunda orina de la mañana y la registrada en la orina de todo el día, proponiéndose que este espécimen sea sustituido por una muestra matutina (13,14); con ello se evitarían los errores inherentes a la recogida de orina durante 24 horas y se abreviaría el procedimiento.

En este trabajo se compara el cociente piridinolina + desoxipiridinolina / creatinina de la primera y la segunda orina de la mañana, con el fin de averiguar cuál de los dos especímenes es el más adecuado para la determinación del cociente.

## Material y métodos

### Individuos y especímenes

Para este estudio se seleccionó a 16 mujeres, voluntarias, de edades entre 33 y 45 años, con ciclos menstruales regulares. Ninguna tomaba medicamentos ni padecía enfermedades que afectaran a su metabolismo óseo.

Todas las voluntarias recogieron orina una vez al mes durante cinco meses. Cada vez se obtuvieron dos especímenes: entre las 7 y las 8 horas el correspondiente a la primera micción de la mañana, aprovechando para vaciar completamente la vejiga; a continuación se les hacía tomar 0,25 L de agua y se obtenía otro espécimen de orina 2 horas después (segunda orina de la mañana). Todos los especímenes se centrifugaron y los sobrenadantes se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo máximo de un mes.

### Procedimientos

En ambos especímenes de orina se cuantificó la concentración de piridinolina y desoxipiridinolina por un enzoinmunoanálisis (Metra Byosystems, Palo Alto, EEUU) (15) que incluye controles y calibradores. Asimismo, y con el fin de corregir las variaciones de la concentración urinaria de piridinolina y desoxipiridinolina, se determinó en los mismos especímenes la concentración de creatinina por el método de Heinegard y Tidestrom (16), para lo cual se usaron materiales de control séricos estabilizados (Decision<sup>®</sup>, niveles 2 y 3) y calibradores (CX Multi<sup>™</sup> Calibrator) de Beckman Instruments Inc.

Para todos los propósitos de este trabajo se ha empleado el cociente piridinolina + desoxipiridinolina / creatinina expresado en nmol/mmol.

### Tratamiento estadístico

Mediante la prueba de Cochran (17) se descartaron tres de los especímenes, cuyos valores fueron considerados extremos.

Al aplicar la prueba de Reed (18) se confirmó que no había individuos rechazables, por lo que todas las voluntarias fueron incluidas en el estudio.

El coeficiente de variación analítico interserial ( $CV_A$ ) del cociente piridinolina + desoxipiridinolina / creatinina se calculó a partir de los resultados obtenidos en alícuotas congeladas de un espécimen de orina en diez días diferentes.

La variancia biológica intraindividual ( $s_W^2$ ) se obtuvo al restar la variancia analítica ( $s_A^2$ ) de la variancia total intraindividual ( $s_{W+A}^2$ ); esta última se calcula usando la media de las variancias de cada voluntaria (19):

$$s_W^2 = s_{W+A}^2 - s_A^2$$

De la  $s_W^2$  se deduce el coeficiente de variación biológica intraindividual ( $CV_W$ ).

La variancia biológica interindividual ( $s_B^2$ ) resulta de restar la  $s_{W+A}^2$  de la variancia total ( $s_T^2$ ), que es la variancia de todos los datos de todas las voluntarias (19):

$$s_B^2 = s_T^2 - s_{W+A}^2$$

A partir de  $s_B^2$  se obtiene el coeficiente de variación biológica interindividual ( $CV_B$ ).

Para valorar la utilidad de los valores de referencia poblacionales se calculó el índice de individualidad (II), mediante la siguiente fórmula (20):

$$II = (CV_W^2 + CV_A^2)^{1/2} / CV_B$$

La homogeneidad de las variancias intraindividuales se comprobó mediante el índice de heterogeneidad (IH), que es el cociente entre la variancia obtenida y la teórica (21):

$$IH = CV_{W+A}^2 / (2/n-1)^{1/2} \times 100$$

donde n es el número medio de especímenes por voluntaria (en nuestro caso cinco). Para cinco especímenes por individuo un índice de heterogeneidad inferior a 1,63 es indicativo de homogeneidad.

## Resultados

En la tabla I se muestran la media y la variancia obtenidas en la primera y segunda orina de cada voluntaria. Asimismo aparecen la media y desviación típica de cada espécimen para el conjunto de voluntarias.

En la tabla II aparecen los correspondientes coeficientes de variación analítica interserial y biológica intra e interindividual, así como sus índices de individualidad y heterogeneidad. Tanto el coeficiente de variación intraindividual como el interindividual son menores en la primera orina de la mañana que en la segunda. A su vez, la primera orina

**Tabla I. Valores del cociente piridinolina + desoxipiridinolina / creatinina (nmol/mmol) obtenidos en el estudio**

Paciente	Primera orina de la mañana			Segunda orina de la mañana		
	$\bar{x}$	$s^2$	n	$\bar{x}$	$s^2$	n
1	31,1	40,9	5	29,7	16,0	5
2	33,2	3,6	5	33,3	54,8	5
3	27,5	63,6	5	28,4	96,0	5
4	29,2	100,0	5	37,8	237,2	5
5	30,2	3,9	4	30,3	90,3	5
6	48,5	56,3	5	57,2	8,4	5
7	32,5	29,2	5	31,1	31,4	5
8	38,0	169,0	5	36,8	132,3	5
9	29,0	16,0	5	29,5	31,4	5
10	31,4	59,3	5	35,2	94,1	5
11	45,7	144,0	5	49,4	44,9	5
12	37,8	47,6	5	43,7	156,3	5
13	42,0	50,4	5	36,2	62,4	5
14	37,9	47,6	5	34,9	62,4	5
15	51,6	75,5	4	55,1	222,0	4
16	41,1	10,2	5	41,6	4,8	5
$\bar{x}$	36,5			38,1		
s	7,1			9,0		
n	16			16		

**Tabla II. Cociente piridinolina + desoxipiridinolina/creatininio en la primera y segunda orina de la mañana**

	Primera orina de la mañana	Segunda orina de la mañana
$CV_A$	10,2%	10,2%
$CV_w$	20,0%	23,4%
$CV_B$	16,1%	19,9%
$I$	1,4	1,2
$IH$	0,29	0,34

$CV_A$ : coeficiente de variación analítica;  $CV_w$ : coeficiente de variación biológica intraindividual;  $CV_B$ : coeficiente de variación biológica interindividual;  $I$ : índice de individualidad;  $IH$ : índice de heterogeneidad.

de la mañana presenta un índice de individualidad de 1,4 por lo que para este espécimen son útiles los valores de referencia poblacionales. La segunda orina de la mañana tiene un índice de individualidad ligeramente inferior: 1,2. Según Fraser y Harris los valores de referencia poblacionales son útiles si el índice de individualidad es igual o superior a 1,4 (19).

Los índices de heterogeneidad de ambos especímenes, inferiores a 1,63, avalan la homogeneidad de sus respectivas variancias intraindividuales (21).

El coeficiente de variación analítica del cociente piridinolina + desoxipiridinolina/creatininio obtenido fue de 10,2% ( $\bar{x}=22,5$  nmol/mmol). Para la primera y segunda orinas de la mañana los valores deseables, considerados como la mitad de la variabilidad biológica intraindividual (22), deberían ser menores de 10,0% y 11,7% respectivamente.

## Discusión

La cuantificación de constituyentes urinarios plantea el problema de seleccionar el espécimen que ofrezca la información más útil (orina de 24 horas, orina de un tiempo determinado del día, orina al azar, etc.).

La decisión de cuál es el mejor espécimen se basa en sus datos de variabilidad biológica (23), los cuales permiten establecer la utilidad de los valores de referencia poblacionales, así como los objetivos de la calidad analítica y los cambios de referencia o diferencias críticas. Cuanto menor sea la variabilidad biológica, tanto mayor será la fiabilidad de los resultados. Los datos de variabilidad biológica, en definitiva, sirven para decidir cuál es el espécimen que da la información más útil.

El espécimen de elección será el que tenga menor variabilidad biológica y mayor homogeneidad de sus variancias intraindividuales, así como valores comunes al sector más amplio posible de la población. Estas características vienen definidas por el coeficiente de variación biológica, índice de heterogeneidad e índice de individualidad.

Los escasos datos disponibles sobre la variabilidad biológica de la excreción de piridinolina y desoxipiridinolina se refieren a éstas por separado, pues se han obtenido utilizando cromatografía líquida (4,14). Con el procedimiento usado en el presente estudio y debido a las características de los anticuerpos utilizados, estos constituyentes se cuantifican conjuntamente; por ello nuestros datos de variabilidad biológica no son comparables con los obtenidos por cromatografía líquida. El equipo comercial empleado en este trabajo se usa muy ampliamente, aunque los datos de variabilidad

biológica que ofrece este procedimiento no son bien conocidos.

Según los resultados del presente estudio, la variabilidad analítica del procedimiento empleado es aceptable, pues, aunque en la primera orina de la mañana es ligeramente superior al deseable, tan sólo contribuye en proporción mínima a aumentar la variabilidad total.

De los dos tipos de especímenes estudiados, el más adecuado resulta ser la primera orina de la mañana; en efecto, sus coeficientes de variación biológica intraindividual e interindividual son menores que los de la segunda orina matutina, lo que permite obtener resultados más fiables (9).

A la menor variabilidad observada en la primera orina de la mañana puede contribuir el que en las últimas horas del sueño tenga lugar el máximo diario de resorción ósea, que diversos autores sitúan entre las 5 y las 8 horas (11). Este espécimen se beneficiaría de un aumento de excreción de piridinolina y desoxipiridinolina que tendería a reducir sus índices de variabilidad. También debe reducir las posibilidades de error la mayor sencillez de su recogida.

La primera orina de la mañana presenta, además, la ventaja de tener un índice de individualidad mayor, lo que permite la utilización de los valores de referencia poblacionales, si bien las diferencias entre los dos especímenes comparados es muy pequeña. Ambos especímenes, a su vez, tienen variancias intraindividuales homogéneas, confirmadas por sendos índices de heterogeneidad bajos, lo que garantiza que las conclusiones que se deduzcan de sus resultados son válidas para todos los pacientes.

Podemos concluir, pues, que de los dos especímenes empleados para estudiar el cociente piridinolina + desoxipiridinolina / creatininio, el que ofrece información más útil es la primera orina de la mañana, tanto por tener menores coeficientes de variación biológica como por ser utilizables sus valores de referencia poblacionales, dada su menor individualidad.

Correspondencia:  
Bernardino Alegre Pérez  
Laboratorio de Análisis Clínicos  
Hospital de Sagunto  
46520 Puerto de Sagunto (Valencia)

## Bibliografía

- Bettica P, Moro L, Robins SP, Taylor AK, Talbot J, Singer FR et al. Bone-resorption markers galactosyl hydroxylysine, pyridinium crosslinks, and hydroxyproline compared. *Clin Chem* 1992; 38: 2313-8.
- Bollerslev J. Biochemical markers used in the diagnosis and monitoring of osteoporosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1994; 54 (Suppl 219): 33-5.
- Demers LM. New biochemical marker for bone disease: Is it a breakthrough? *Clin Chem* 1992; 38: 2169-70.
- Beck Jensen JE, Sorensen HA, Kollerup G, Jensen JE, Sorensen OH. Biological variation of biochemical bone markers. *Scand J Clin Lab Invest* 1994; 54 (Supl 219): 36-9.
- Pinnel RS, Fox R, Krane S. Human collagens: difference in glycosylated hydroxylysines in skin and bone. *Biochem Biophys Acta* 1971; 229: 119-22.
- Krane SM, Kantrowitz FG, Byrne M, Pinnel SR, Singer FR. Urinary excretion of hydroxylysine and its glycosides as an index of collagen degradation. *J Clin Invest* 1977; 59: 819-27.
- Eyre DR, Koob TJ, Van Ness KP. Quantification of hydroxyproline crosslinks in collagen by high performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1984; 137: 380-8.
- Robins SP, Duncan A. Pyridinium crosslinks of bone collagen and their location in peptides isolated from rat femur. *Biochim Biophys Acta* 1987; 914: 233-9.
- Álvarez V, Hernández A, Maciá M, Minchinela J, Jiménez CV, Perich C et al. Elección del mejor espécimen para la determinación de constituyentes en orina. Uso de los datos de variabilidad biológica. *Quim Clin* 1992; 11: 161-5.

10. Eastell R, Simmons PS, Colwell A, Assiri AM, Burritt MF, Russell RG et al. Nyctohemeral changes in bone turnover assessed by serum bone GLA-protein concentration and urinary deoxypyridinoline excretion: effects of growth and ageing. *Clin Sci Colch* 1992; 83: 375-82.
11. Schlemmer A, Hassager C, Jensen SB, Christiansen C. Marked diurnal variation in urinary excretion of pyridinium cross-links in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 476-80.
12. Pagani F, Panteghini M. Diurnal rythm in urinary excretion of pyridinium crosslinks. *Clin Chem* 1994; 40: 952-3.
13. Abbiati G, Bartucci F, Longoni A, Fincato G, Galimberti S, Rigoldi M, et al. Monitoring of free and total urinary pyridinoline and deoxypyridinoline in healthy volunteers: samples relationships between 24-h and fasting early morning urine concentrations. *Bone Miner* 1993; 21: 9-19.
14. Colwell A, Russell RG, Eastell R. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinnks of collagen as markers of bone resorption. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 341-9.
15. Seyedin SM, Kung VT, Daniloff YN, Hesley RP, Gómez B, Nielsen L et al. Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J Bone Mineral Res* 1993; 8: 635-41.
16. Heinegard D, Triderstroem G. Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1973; 43: 303-10.
17. Cochran WS. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Ann Eugen* 1941; 11: 47.
18. Reed AH, Henry RJ, Mason WB. Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem* 1971; 17: 275.
19. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Revs Clin Lab Sci* 1989; 27: 409-37.
20. Harris EK. Statistical aspects of reference values in clinical pathology. *Progr Clin Pathol* 1981; 8: 45-6.
21. Harris EK. Distinguishing physiologic variation from analytic variation. *J Chron Dis* 1970; 23: 469-80.
22. Proceedings of the Subcommittee on Analytical Goals in Clinical Chemistry, World Association of Societies of Pathology, London, England. Analytical goals in clinical chemistry: their relationship to medical care. *Am J Clin Pathol* 1979; 71: 624-30.
23. Fraser CG. Desirable performance standards for clinical chemistry tests. *Adv Clin Chem* 1983; 23: 299-339.