

Límites de referencia para la mioglobina sérica en función de la edad basados en un modelo de regresión

A. Fernández Fernández¹, G. Valcárcel Piedra¹, E. Cruz Iglesias¹, R. Venta Obaya^{1,2}

Resumen

El efecto de la edad en las concentraciones séricas de mioglobina ha recibido una escasa atención en el establecimiento de los valores de referencia. Después de un cambio de metodología para su medición, nos planteamos la posibilidad de calcular unos límites de referencia como una función matemática de la edad, reduciendo con ello el número de individuos necesario.

En un grupo de 104 hombres y 147 mujeres, entre 29 y 91 años de edad, se midieron las concentraciones séricas de mioglobina por electroquimioluminiscencia. Tras una transformación logarítmica, el análisis de los residuales demostró que el modelo de regresión lineal de las concentraciones respecto a la edad producía el mejor ajuste posible. Una vez comprobado que la variancia es constante con la edad, se calcularon los límites de referencia al 95%, así como sus correspondientes intervalos de confianza al 95%, y se representaron frente a los datos.

La concentración sérica de mioglobina se incrementa linealmente con la edad en ambos sexos. Los límites superiores de referencia de acuerdo al modelo pueden variar hasta un 40% en los hombres y hasta un 45% en las mujeres, entre los individuos con las edades más alejadas en el estudio; estas diferencias podrían llegar a tener implicaciones en la toma de decisiones clínicas.

Como conclusión, la regresión de las concentraciones séricas de mioglobina en función de la edad ha aportado unos valores de referencia válidos. Este procedimiento permite reducir el número de individuos necesario para obtener los intervalos de referencia y evita la incoherencia de los límites calculados cuando se emplean subgrupos para las diferentes edades.

Palabras clave: Marcadores bioquímicos. Mioglobina. Valores de referencia. Modelos lineales.

Summary: Age-related reference values for serum myoglobin based on a regression model

Effect of age on serum myoglobin concentrations has seldom been considered in the production of reference values. As a result of a change in the procedure for measuring myoglobin, we planned the possibility to provide reference limits as a function of age, reducing the number of subjects needed for the study.

In a sample of 104 men and 147 women, with ages ranging from 29 to 91 years, serum concentrations of myoglobin were analyzed by electrochemiluminescence. After logarithmic transformation, residual analysis showed that linear regression of serum concentrations with age was the best-fitting model. Once variance was checked to be constant with age, 95% reference limits and their 95% confidence intervals were calculated and plotted against the raw data.

Serum myoglobin concentration shows a steady increase with age in both sexes. Upper reference limits derived from the model vary up to 40% in men and 45% in women among the subjects with the most distant ages included in the study. These differences may be important in clinical decision-making.

In conclusion, regression of myoglobin serum concentrations as a function of age has provided valid reference limits. This procedure allows us to reduce the number of subjects needed to produce the reference ranges and avoids the incoherence of calculated reference limits when several age subgroups are used.

Key words: Biochemical Markers; Myoglobin; Reference Values; Linear models.

INTRODUCCIÓN

Los marcadores cardíacos se cuantifican mediante una gran variedad de inmunoanálisis que emplean anticuerpos monoclonales específicos lo cual, dada la ausencia de métodos de referencia, ha llevado a que organizaciones internacionales como la IFCC hayan auspiciado la puesta en marcha de grupos de trabajo para su

estandarización (1). En el caso de la mioglobina, esta falta de estandarización conduce a una elevada variabilidad en los resultados obtenidos con los diferentes métodos comerciales disponibles (2), implicando la necesidad de obtener valores de referencia específicos en cada caso.

La mioglobina es una hemoproteína de bajo peso molecular presente en el citosol de las células del músculo liso, esquelético y cardíaco (2), que se libera al plasma por destrucción fibrilar y posteriormente es eliminada por excreción renal. Se observan concentraciones séricas elevadas en situaciones con una elevada destrucción muscular como en la rabdomiólisis

¹Servicio de Análisis Clínicos, Hospital San Agustín, Avilés, (Asturias)

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo, (Asturias)

(3,4) o las miopatías inflamatorias (5). Sin embargo, su mayor utilidad clínica, por el número de análisis solicitados al laboratorio, es como marcador precoz de lesión cardíaca (6) aunque su baja especificidad diagnóstica sólo le confiere un buen valor predictivo negativo, a menos que se acompañe de mediciones complementarias como la anhidrasa carbónica III (7). La mioglobina puede ser también útil como marcador de efectividad de la terapia trombolítica (8).

Las concentraciones séricas de mioglobina muestran diferencias entre sexos que se pueden explicar por la diferente masa muscular (9), lo que ha conducido a la obtención de valores de referencia específicos para el sexo. Por otro lado, la mioglobina muestra un incremento gradual con la edad que parece responder a la pérdida progresiva de la función renal (9,10), compensada parcialmente por la disminución de la masa muscular que tiene lugar en edades avanzadas. Este efecto de la edad ha recibido mucha menos atención en el establecimiento de valores de referencia, a pesar de que una interpretación correcta de las concentraciones séricas puede depender de la disponibilidad de unos valores de referencia adecuados.

La obtención de unos valores de referencia válidos en aquellas magnitudes bioquímicas que varían con la edad presenta dos inconvenientes principales: por un lado, el elevado número de individuos requerido para todos los posibles subgrupos que pueden ser necesarios y por otro, la frecuente falta de continuidad en los límites calculados para los subgrupos de edades adyacentes. En estos casos, es posible recurrir a otras alternativas para la producción de valores de referencia.

La obtención de unos límites de referencia continuos, mediante una función matemática capaz de describir la relación entre la edad y la mioglobina sérica, podría ser la aproximación adecuada, siempre que se tome en consideración tanto la variación de las concentraciones medias como de sus varianzas con la edad (11). Se han descrito modelos matemáticos para la construcción de intervalos de referencia respecto a la edad basados en la regresión polinómica (12) o en la regresión lineal por etapas (13), así como modelos que describen la varianza en función de la edad (14,15), cuando ésta no es constante a lo largo del periodo estudiado. Todos ellos están basados en la asunción de la normalidad de los datos, no obstante la estimación de curvas cuantílicas mediante métodos no paramétricos también ha sido descrita (16,17).

Como consecuencia de un cambio en el método empleado en nuestro laboratorio para la medición de mioglobina sérica y de la inexistencia de información previa sobre el efecto de la edad en las concentraciones de este marcador, nos propusimos desarrollar un modelo matemático, basado en procedimientos paramétricos, para describir la variación de las concentraciones séricas de mioglobina con la edad, a partir del cual estimar unos límites de referencia que obvian los inconvenientes mencionados y, posteriormente, evaluar la validez de los mismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos y muestras

Entre todas las solicitudes de análisis recibidas durante un periodo de un mes, procedentes de los distintos centros de salud atendidos por nuestro laboratorio, se recogieron muestras de suero pertenecientes a 104 hombres y 147 mujeres, con edades comprendidas entre 29-91 y 30-87 años, respectivamente. Tras la revisión de las historias clínicas, se seleccionaron pacientes

sin patología cardíaca, con función renal y hepática normales para su edad, en los que la medición de las concentraciones séricas de creatina-cinasa demostró valores dentro del intervalo de referencia. Las alícuotas correspondientes a las muestras seleccionadas se congelaron a -20°C hasta el momento del análisis.

Análisis de las muestras

La concentración de mioglobina se midió en un autoanalizador Elecsys 2010 (Roche Diagnostics) mediante un inmunoanálisis de electroquimioluminiscencia. La cuantificación de creatina-cinasa se realizó mediante un método enzimático en un autoanalizador Modular Analytics IPE (Roche Diagnostics). En ambos casos, se emplearon los reactivos y aplicaciones suministrados por el fabricante y la imprecisión fue inferior al 4% en todas las concentraciones ensayadas.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados mediante el programa Microsoft Excel XP (Microsoft Corp.) y analizados estadísticamente utilizando el programa SPSS 12.0 para Windows (SPSS Inc.).

Para el cálculo de los valores de referencia en función de la edad se aplicó el método de regresión polinómica de Royston (12):

$$y_i = y_{pred} + d_i = b_0 + b_1 x_i + b_2 x_i^2 + \dots + b_k x_i^k + d_i$$

donde $i = 1, 2, \dots, n$; $b_0, b_1, b_2, \dots, b_k$ son los coeficientes de regresión estimados mediante el modelo; k es el grado del polinomio; x es la edad en años y d es el residual o diferencia entre el valor verdadero (y) y el valor predicho por el modelo (y_{pred}).

Para realizar un ajuste mediante el método de regresión lineal se debe cumplir que los residuales obtenidos al aplicar el modelo se distribuyan según una ley normal. Debido a la distribución no gaussiana de los residuales obtenidos tras un primer ajuste (prueba de Shapiro-Wilk) se realizó una transformación logarítmica de los datos de mioglobina sérica para conseguir la condición de normalidad. Posteriormente, se comprobó que la desviación estándar (s) de los residuales transformados se mantenía constante con la edad, según el procedimiento de Altman (14), y se utilizó en la construcción de los límites de referencia. Se consideraron aberrantes, y no fueron incluidos en el modelo, los valores de mioglobina situados a 3,5 o más desviaciones estándar de la media (18).

El cálculo de los límites de referencia (L) y de los intervalos de confianza (IC), ambos al 95%, se realizó utilizando las fórmulas de Virtanen (13):

$$L = y_{pred} \pm 1,96 s a_{n-p}$$

$$IC = L \pm 1,96 s a_{n-p} (\nu + 1,96^2 (\sum_{n-p}^2 - 1))^{1/2}$$

donde $a_{n-p} = ((n-p)/(n-p-0,5))^{1/2}$; $\nu = (1/n + (x_0 - x_m)^2 / \sum_1 (x_1 - x_m)^2)$; n es el tamaño de la muestra; p es el número de coeficientes de regresión del modelo y x_m es la media de la edad.

RESULTADOS

Mediante la transformación logarítmica de los datos se consiguió la normalización de la distribución de los residuales, como se representa en la figura 1, donde se demuestra el

alineamiento de los residuales estandarizados con la recta normal en hombres y mujeres (prueba de Shapiro-Wilk; $P=0,42$ y $P=0,27$, respectivamente).

Aplicando el modelo de regresión de Royston a los datos transformados logarítmicamente, se obtuvieron las siguientes ecuaciones para describir la variación de la concentración de mioglobina en función de la edad (x):

$$\begin{aligned} \text{Hombres:} & \quad \text{Ln } y_{\text{pred}} = 3,25 + 0,0067 x \quad (s = 0,2421) \\ \text{Mujeres:} & \quad \text{Ln } y_{\text{pred}} = 3,23 + 0,0068 x \quad (s = 0,2038) \end{aligned}$$

Un análisis de la varianza demostró que una parte significativa de la variabilidad global de la mioglobina se puede explicar mediante la edad, de acuerdo al modelo de regresión obtenido ($F=18,920$, $P < 0,00001$ en hombres; $F=40,085$, $P < 0,00001$ en mujeres).

En la figura 2 se representan los límites de referencia y sus intervalos de confianza al 95%, obtenidos aplicando el modelo de regresión lineal. Debido a la transformación logarítmica de los datos, los límites de referencia calculados, así como sus intervalos de confianza, se distribuyen de forma asimétrica en torno a la media y a los correspondientes límites. El número de puntos que se quedan fuera de los límites calculados representa un 4,8% en hombres y un 3,4% en mujeres, valores próximos al 5% esperado.

En la tabla I, aparecen los intervalos de referencia de la concentración de mioglobina para diferentes edades, calculados aplicando el modelo de regresión obtenido en el estudio. Se observa como la concentración de mioglobina sérica aumenta claramente con la edad, tanto en hombres como en mujeres.

Figura 1. Diagrama de normalidad de los residuales estandarizados obtenidos al aplicar el modelo de regresión lineal, distribuidos en función del sexo.

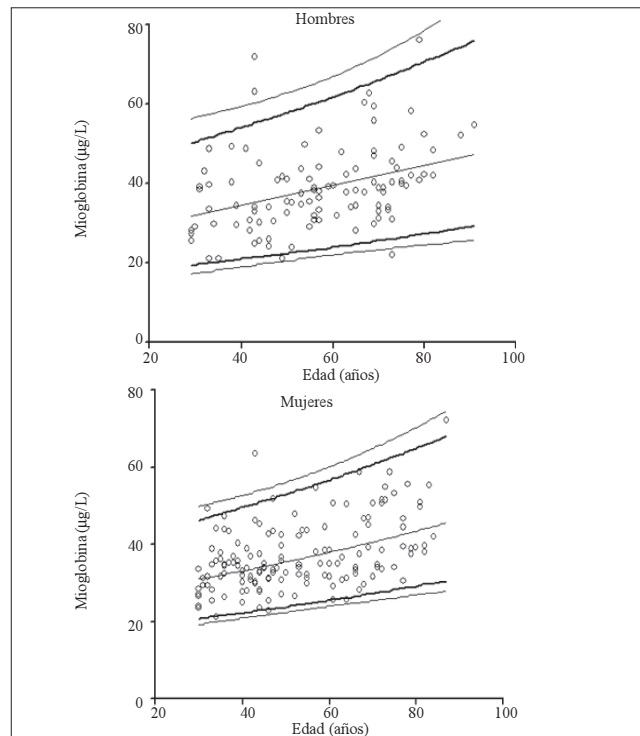
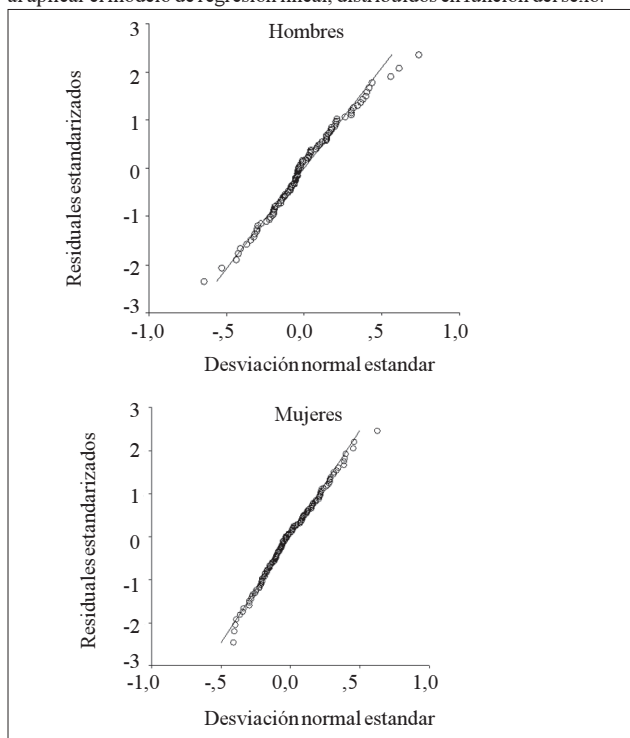


Figura 2. Distribución de los valores de mioglobina obtenidos en 104 hombres y 147 mujeres.

DISCUSIÓN

De acuerdo con la bibliografía (19,20), la mioglobina sérica presenta una moderada variación biológica, tanto intra (11,1-17,6%) como interindividual (13,8-46,6%), lo que requiere disponer de unas determinaciones analíticas lo suficientemente exactas (inexactitud $\leq 4,4-16\%$) y precisas (imprecisión $\leq 5,6-8,8\%$). Como los demás marcadores cardíacos, la mioglobina muestra un cierto grado de individualidad (índice = 0,4-0,8) que pone a prueba la utilidad de los valores de referencia convencionales como criterio de interpretación de estas magnitudes bioquímicas. Una manera de mejorar su utilidad diagnóstica es disponer de unos valores de referencia lo más ajustados posible a la edad y al sexo del paciente, lo que redundará en la mejora del valor predictivo negativo de esta prueba en la estratificación del riesgo cardiovascular.

Hasta el momento, los límites de referencia basados en modelos de regresión con la edad han sido descritos en pediatría para numerosas magnitudes bioquímicas, como aminoácidos en plasma (21) y orina (22), metabolitos (23), inmunoglobulinas (11,24) o receptor de transferrina (25) y no bioquímicos, como talla-peso (26) o datos electrocardiográficos (27). En los adultos, se han establecido límites continuos para las isoenzimas de la fosfatasa alcalina (28), enzimas cardíacas (29) y antígeno prostático específico (30). Estos procedimientos aportan como ventajas el evitar el agrupamiento arbitrario en grupos de edades y la posibilidad de establecer límites para un intervalo de edad tan estrecho como sea necesario. Incluso, estos límites podrían ser calculados en cada paciente por el sistema informático del laboratorio.

Tabla I. Valores de referencia de la mioglobina sérica, distribuidos según el sexo y la edad, calculados aplicando un modelo de regresión lineal

	Concentración de mioglobina ($\mu\text{g/L}$)					
	30 años	40 años	50 años	60 años	70 años	80 años
Hombres	20-51	21-54	22-58	24-62	26-66	27-71
Mujeres	21-46	22-49	24-53	25-57	27-61	29-65

Se ha demostrado que un tamaño de muestra de 70 individuos puede ser suficiente para obtener límites de referencia válidos, supuesto que se cumplan las premisas básicas del análisis de regresión paramétrico (31). En nuestro caso, una transformación logarítmica simple fue suficiente para la normalización de las concentraciones de mioglobina, lo cual podía ser confirmado tanto por la correspondiente prueba de bondad de ajuste como por el alineamiento de los residuales estandarizados con la recta normal que se considera una prueba menos dependiente del tamaño muestral (12,14).

Por otro lado, la comparación visual de los límites calculados con las concentraciones observadas no demostró disparidades importantes y tanto la anchura de los intervalos de confianza como el número de puntos que caen fuera de los límites calculados parecen razonablemente válidos. En general, el modelo da lugar a un estrecho intervalo de referencia y a unos intervalos de confianza alrededor de los límites calculados mucho más estrechos de los que producirían los métodos clásicos, como consecuencia de la implicación del conjunto de la muestra en el modelo.

El grupo de individuos de referencia utilizado en el estudio parece ser representativo de la distribución de edades de la población que acude al servicio de urgencias del hospital. El cálculo de los valores de referencia convencionales para la concentración de mioglobina en este grupo, sin considerar la edad como covariable y de acuerdo a las recomendaciones de la IFCC (32,33), daba como resultado 21-66 $\mu\text{g/L}$ para los varones y 24-59 $\mu\text{g/L}$ para las mujeres. Estos límites resultan muy similares a los suministrados por el fabricante para su método (34), tanto para varones (<72 $\mu\text{g/L}$), como para mujeres (<58 $\mu\text{g/L}$). Frente a estos intervalos globales, se observa que los límites superiores de referencia de acuerdo al modelo lineal pueden variar hasta un 40% en el caso de los hombres y hasta un 45% en el de las mujeres, entre los individuos con edades más alejadas, una diferencia que podría llegar tener implicaciones en la toma de decisiones clínicas.

Como conclusión, el modelo de regresión de las concentraciones séricas de mioglobina en función de la edad ha aportado unos valores de referencia que han sido válidos en la práctica diaria de nuestro laboratorio. Evitar la partición en subgrupos ha dado lugar a unos límites que varían suavemente y parecen reflejar los cambios que ocurren en esta magnitud a lo largo de la vida adulta. Este procedimiento permite reducir el número de individuos necesario para obtener múltiples intervalos de referencia y evita la incoherencia de los límites calculados cuando se emplean subgrupos para las diferentes edades.

Agradecimientos

La colaboración del personal técnico y de enfermería del Laboratorio de Bioquímica, al cual deseamos hacer constar nuestro agradecimiento, ha sido fundamental para la realización del estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Panteghini M. Current concepts in standardization of cardiac marker immunoassays. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:3-8.
- Panteghini M, Linsinger T, WU AH, Dati F, Apple FS, Christenson RH, et al. Standardization of immunoassays for measurement of myoglobin in serum. Phase I: evaluation of candidate secondary reference materials. *Clin Chim Acta* 2004;341:65-72.
- Sauret JM, Marinides G, Wang GK. Rhabdomyolysis. *Am Fam Physician* 2002;65:907-12.
- Watanabe T. Rhabdomyolysis and acute renal failure in children. *Pediatr Nephrol* 2001;16:1072-5.
- Targoff IN. Laboratory testing in the diagnosis and management of idiopathic inflammatory myopathies. *Rheum Dis Clin North Am* 2002;28:859-90.
- Penttila I, Penttila K, Rantanen T. Laboratory diagnosis of patients with acute chest pain. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:187-97.
- Beuerle JR, Azzazy HM, Styba G, Duh SH, Christenson RH. Characteristics of myoglobin, carbonic anhydrase III and the myoglobin/carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise, and myocardial infarction patients. *Clin Chim Acta* 2000;294:115-28.
- Pasceri V, Andreotti F, Maseri A. Clinical markers of thrombolytic success. *Eur Heart J* 1996;17(supplE):35-41.
- Pelsters MMAL, Chapelle JP, Knapen M, Vermeer C, Muijtjens AMM, Hermens WT, et al. Influence of age and sex and day-to-day and within-day biological variation on plasma concentrations of fatty acid-binding protein and myoglobin in healthy subjects. *Clin Chem* 1999; 45:441-3.
- Górski J, Hemens WT, Borawski J, Mysliwiec M, Glatz JFC. Increased fatty acid-binding protein concentration in plasma of patients with chronic renal failure. *Clin Chem* 1997;43:193-5.
- Isaacs D, Altman DG, Tidmarsh CE, Valman HB, Webster ADB. Serum immunoglobulin concentrations in preschool children measured by laser nephelometry: reference ranges for IgG, IgA, IgM. *J Clin Pathol* 1983; 36: 1193-6.
- Royston P. Constructing time-specific reference ranges. *Stat Med* 1991;10:675-90.
- Virtanen A, Kairisto V, Irjala K, Rajamaki A, Uusipaikka E. Regression-based reference limits and their reliability: example on hemoglobin during the first year of life. *Clin Chem* 1998;44:327-35.
- Altman DG. Construction of age-related reference centiles using absolute residuals. *Stat Med* 1993;12:917-24.
- Aitkin M. Modelling variance heterogeneity in normal regression using GLIM. *Appl Statist* 1987;36:332-9.
- Healy MJR, Rasbash J. Distribution-free estimation of age-related centiles. *Ann Human Biol* 1988;15:17-22.
- Duchame GR, Gannoun A, Guertin MC, Jéquier JC. Reference values obtained by kernel-based estimation of quantile regressions. *Biometrics* 1995;51:1105-16.
- Burnett RW. Accurate estimation of standard deviation for quantitative methods used in clinical chemistry. *Clin Chem* 1975;21:1935-8.
- Panteghini M, Pagani F. Biological variation of myoglobin in serum. *Clin Chem* 1997;43:2435.
- Ross SM, Fraser CG. Biological variation of cardiac markers: analytical and clinical considerations. *Ann Clin Biochem* 1998;34:80-4.
- Lepage N, McDonald N, Dallaire L, Lambert M. Age-specific distribution of plasma amino acid concentrations in a healthy pediatric population. *Clin Chem* 1997;43:2397-402.
- Venta R, Prieto B, Alvarez FV. Regression-based reference limits for urinary amino acids in a pediatric population. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:383-90.
- Burrit MF, Slockbower JM, Forsman RW, Offord KP, Bergstralh EJ, Smithson WA. Pediatric reference intervals for 19 biological variables in healthy children. *Mayo Clin Proc* 1990;65:329-36.
- Irjala K, Koskinen P, Icen A, Palosuo T. Reference intervals for immunoglobulins IgA, IgG, and IgM, in serum in adults and in children aged 6 months to 14 years. *Scand J Clin Lab Invest* 1990;50:573-7.
- Suominen P, Virtanen A, Lehtonen-Veromaa M, Heinonen O, Salmi TT, Alanen M, et al. Regression-based reference limits for serum transferrin receptor in children 6 months to 16 years of age. *Clin Chem* 2001;47:935-7.

26. Martins SJ, Menezes RC. A mathematical approach for estimating reference values for weight-for-age, weight-for-height and height-for-age. *Growth Dev Aging* 1997;61:3-10.
27. Rijnbeek PR, Witsenburg M, Hess J, Kors JA. Continuous age-dependent normal limits for pediatric electrocardiogram. *J Electrocardiol* 2000;33:199-201.
28. Gonchoroff DG, Branum EL, Cedel SL, Riggs BL, O'Brien JF. Clinical evaluation of high-performance affinity chromatography for the separation of bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chim Acta* 1991;199:43-50.
29. Kairisto V, Hänenin HP, Leino A, Pulkki K, Peltola O, Nantö V. Generation of reference values for cardiac enzymes from hospital admission laboratory data. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32:789-96.
30. Anderson JR, Strickland D, Corbin D, Byrnes JA, Zweiback E. Age-specific reference ranges for serum prostate-specific antigen. *Urology* 1995;46:54-7.
31. Virtanen A, Kairisto V, Uusipaikka E. Regression-based reference limits: determination of sufficient sample size. *Clin Chem* 1998;44:2353-8.
32. International federation for Clinical Chemistry. Expert panel of theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:749-60.
33. Queralto JM, Antoja F, Cortés M, Doménech MV, Ferrer P, Fuentes J et al. Producción y utilización de valores de referencia. *Quim Clin* 1987;6:49-68.
34. Heil W, Koberstein R, Zawta R. Reference ranges for adults and children. 8th ed. Mannheim: Roche Diagnostics;2004, pp. 54-5.

Correspondencia:

Rafael Venta
Laboratorio de Bioquímica
Hospital San Agustín
Camino de Heros 4
33400 Avilés (Asturias)
rafael.venta@sespa.princast.es