

## Determinación de glucosaminoglicanos en orina por un procedimiento espectrométrico. Valores de referencia para una población pediátrica

C. Colomé Mallolas, M. Quintana Berga, R.M. Puig Quintana, J. Moreno García, M.A. Vilaseca Buscà, R. Artuch Iriberrí

### Resumen

*La determinación de glucosaminoglicanos en orina es útil como cribaje de las mucopolisacaridosis. Existen diferentes procedimientos para el análisis de la excreción de glucosaminoglicanos en orina. Uno de los más aplicados es el espectrométrico que utiliza como cromógeno el 1, 9-azul de dimetilmetileno. Nuestro objetivo fue adaptar el procedimiento a nuestras condiciones de trabajo, evaluando las características metrologías del mismo. Se establecieron valores de referencia para una población pediátrica y se analizaron orinas de pacientes con mucopolisacaridosis. La calidad analítica del procedimiento fue adecuado en base a los resultados del control interno de la calidad. Los intervalos de referencia mostraron diferencias significativas según la edad y fueron similares a los encontrados por otros autores. Este procedimiento es adecuado para la detección de las mucopolisacaridosis.*

### Summary

*Urine glycosaminoglycan determination is very useful as screening procedure for mucopolysaccharidosis. Several analytical procedures for this purpose were described. Spectrophotometric procedures based on the color reaction with 1, 9-dimethylmethylen blue are the most commonly used. Our aim was the adaptation of previously described procedures to our working conditions. Metrological variables were also evaluated. Reference values for a pediatric population were established, and urine samples of patients with mucopolysaccharidosis were analyzed. Analytical quality results were adequate. Reference intervals showed significant differences according to age, and were similar as those of other authors. This procedure is useful for the detection of mucopolysaccharidosis.*

### Introducción

Los glucosaminoglicanos son unos compuestos que están presentes en diferentes tejidos (hueso, cartilago, córnea, válvulas cardiacas, vasos sanguíneos,...) y fluidos biológicos (liquido sinovial) con funciones estructurales y de protección respectivamente. Se han diferenciado siete tipos de glucosaminoglicanos. Estructuralmente son heteropolisacáridos complejos formados por unidades de disacáridos que incluyen una hexosamina (glucosamina o galactosamina) y un ácido urónico (glucurónico o idurónico). Estos monosacáridos pueden además encontrarse esterificados con grupos sulfato o acetilo.

Las mucopolisacaridosis son un conjunto de trastornos hereditarios causados por la deficiencia de enzimas lisosomales necesarios para la degradación de glucosaminoglicanos. Actualmente se conocen 10 enfermedades asociadas a defectos del metabolismo de estas moléculas. Los glucosaminoglicanos no degradados se almacenan en los lisosomas y pueden producir disfunciones de células, tejidos u órganos. Una alteración bioquímica característica de las mucopolisacaridosis es el aumento de la excreción de fragmentos de glucosaminoglicanos

en la orina: heparán sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato y condroitín sulfato A y condroitín sulfato C, en distintas proporciones dependiendo del tipo de mucopolisacaridosis. Fisiológicamente se produce excreción de condroitín sulfato A y condroitín sulfato C, así como de indicios de heparán sulfato. Es importante tener en cuenta la variación de la excreción de glucosaminoglicanos durante el desarrollo en relación inversa con la edad.

La medida de la concentración de glucosaminoglicanos en orina ha sido un procedimiento utilizado habitualmente como cribaje de las mucopolisacaridosis (1,2). Se han desarrollado diversos procedimientos hasta la actualidad: prueba de Berry, que utiliza azul de tolueno como reactivo que se une a los glucosaminoglicanos usando ácido acético como decolorante, procedimiento simple y rápido pero no cuantitativo (3, 4); prueba del cloruro de cetilpiridinio, basado en la interacción de los glucosaminoglicanos con detergentes catiónicos y posterior turbidimetría (5); prueba del "alcian blue", basado en la formación de complejos (6); prueba del ácido urónico-carbazol, previa precipitación del ácido urónico con detergentes catiónicos (7, 8); prueba del 1,9-azul de dimetilmetileno basado en la determinación espectrométrica previa unión de todos los glucosaminoglicanos a un cromógeno (9,10).

La cuantificación de la concentración de glucosaminoglicanos por espectrometría, utilizando como cromógeno 1,9-azul de dimetilmetileno, ha hecho posible la automatización del procedimiento para la detección de mucopolisacaridosis. Este procedimiento permite detectar el aumento de la excreción de glucosaminoglicanos en orina pero no permite distinguir distinguir el tipo de glucosaminoglicanos excretados y con ello diferenciar el tipo de mucopolisacaridosis. Sólo es posible dis-

Servei de Bioquímica, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona.

Barcelona.

Recibido: 2-12-98

Aceptado: 30-7-99



tinguir los distintos tipos de glucosaminoglicanos mediante procedimientos de separación.

Nuestro objetivo fue: a) la automatización del procedimiento analítico en nuestro laboratorio, b) el establecimiento de valores de referencia para una población pediátrica, c) la determinación de la excreción de glucosaminoglicanos en 2 pacientes afectados de mucopolisacaridosis tipo I y 1 afecto de mucopolisacaridosis tipo IV.

## Material y Métodos

### Población

Para obtener los valores de referencia de la concentración en orina de glucosaminoglicanos, se analizaron muestras de 132 pacientes pediátricos en los que se descartó la presencia de enfermedades que puedan aumentar la excreción urinaria de glucosaminoglicanos (destrucción de tejido conectivo, síndromes de mala absorción, osteomalacia, leucemia, lupus eritematoso, artritis reumática, síndrome de Marfan, diabetes, encefalitis, obesidad y microcefalia). Se distribuyeron estos pacientes en diferentes grupos de edad: 0-6 meses ( $n=24$ ), 7-12 meses ( $n=12$ ), 1-2 años ( $n=22$ ), 3-6 años ( $n=22$ ), 7-10 años ( $n=24$ ), 11-15 años ( $n=18$ ), 16-18 años ( $n=10$ ). Los diferentes grupos estaban compuestos equilibradamente por niños y niñas, aunque no se hayan descrito anteriormente diferencias significativas respecto a ambos sexos.

Además, se determinó la concentración de glucosaminoglicanos en orina de 3 pacientes diagnosticados de mucopolisacaridosis:

- 2 pacientes (6 meses y 8 meses) con enfermedad de Hurler, mucopolisacaridosis tipo I provocada por la deficiencia de la enzima  $\alpha$ -L-iduronidasa.
- 1 paciente (13 meses) con enfermedad de Morquio A, mucopolisacaridosis tipo IV provocada por la deficiencia de la enzima galactosa-6-sulfatasa.

### Procedimiento

#### Fase preanalítica

El espécimen adecuado para la determinación de glucosaminoglicanos fue orina procedente de una micción, preferiblemente la de primera hora de la mañana ya que la concentración está aumentada y se valora en relación a la concentración de creatinina. No necesitó tratamiento previo a la determinación. Las muestras se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

#### Fase analítica

Determinación espectrométrica de glucosaminoglicanos en orina con el analizador centrífugo Cobas Fara II (Roche Diagnostic Systems, Nutley, EEUU), según procedimiento descrito originariamente por Whitley et al. y Jong et al. y modificado por Prosser S. (10), adaptado a nuestras condiciones de trabajo (tabla I). Se añaden 5  $\mu\text{L}$  de muestra y 90  $\mu\text{L}$  de agua destilada a la cubeta para leer el blanco a 530 nm. Posteriormente, se añaden 300  $\mu\text{L}$  de 1,9-azul de dimetilmetileno leyendo la absorbancia cada 10 segundos. La diferencia de absorbancia entre la lectura del blanco y la lectura a los 40,5 segundos se utiliza para calcular el resultado.

Determinación espectrométrica de creatinina en orina con el analizador Cobas Mira (Roche Diagnostic Systems), según el método de Jaffé. Los resultados finales se expresaron como mg de glucosaminoglicanos/mmol de creatinina.

Reactivos: el reactivo utilizado fue 1,9 azul de dimetilmetileno (Serva, Heidelberg, Alemania; ref. 20336). Se preparó a

**Tabla I. Programación del analizador Cobas Fara II para la determinación de glucosaminoglicanos en orina**

GENERAL		
Measurement mode	ABS	
Reaction mode	S-I-R1-A	
Calibration mode	LIN REG	
Reagent blank	REAG/DIL	
Wavelength	530	nm
Temperature	25	$^{\circ}\text{C}$
Unit	mg/L	
ANALYSIS		
S Sample volume	5	$\mu\text{L}$
Diluent	H <sub>2</sub> O	
Volume	90	$\mu\text{L}$
I Incubation	10	s
MI	5	s
R1 Reagent 1	300	$\mu\text{L}$
A Readings		
First	0,5	s
Number	5	
Interval	10	s
CALCULATION		
Reaction direction	Increase	
Calculation step A	Endpoint	
First	M1	
Last	5	
CALIBRATION		
Calibration interval	Each Run	
Number of standards	4	
STD1: 10.0000	STD2: 25.0000	
STD3: 50.0000	STD4: 100.0000	

una concentración de 0,35 mmol/L en solución amortiguadora de acetato 50 mmol/L a pH 5,6 (ácido acético y acetato de sodio, Merck, Darmstat, Alemania; ref. 100056, ref. 106268), añadiendo un 1% de etanol (v/v). Esta solución alcanza una estabilidad de cinco meses conservándose en nevera a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La solución de trabajo consistió en una dilución 1/20 de la solución de 1,9 azul de dimetilmetileno 0,35 mmol/L con solución amortiguadora de 50 mmol/L, pH 5,6. Se preparó en frío en el momento del análisis.

Patrones de calibración: se realizó un estudio comparativo de diferentes patrones disponibles en el mercado a diferentes concentraciones (10, 25, 50, 100 mg/L). Se utilizaron soluciones de condroitín sulfato A, condroitín sulfato B, condroitín sulfato C, heparán sulfato y dermatán sulfato (Sigma, St Louis, EEUU).

Método de medida: se basa en la determinación espectrométrica previa unión de los glucosaminoglicanos con el 1,9-azul de dimetilmetileno. Las lecturas de las absorbancias se realizan a 530 nm.

#### Características metrológicas

Se determinaron las siguientes variables metrológicas:

- Imprecisión mediante el cálculo de los coeficientes de variación intraserial e interserial en orina, procedente de una micción, de pacientes a diferentes concentraciones (este mismo material se ha utilizado para el control interno de la calidad).
- Límite de detección como la media de un "blanco" analizado (solución salina fisiológica) 20 veces intraserialmente más 3 desviaciones típicas.
- Intervalo analítico mediante el análisis de diferentes patrones a concentraciones conocidas.

Como control interno de la calidad se han utilizado orinas procedentes de una micción de pacientes a diferentes concentraciones.



### Estudio estadístico

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar la distribución de los resultados de la población de referencia. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar resultados de los diferentes grupos de edad y sexo, aplicando posteriormente la prueba de Mann-Whitney. Para el establecimiento de los intervalos de referencia, se realizó el cálculo de la mediana y percentiles 2,5 y 97,5.

## Resultados

### Calibración

Se realizaron pruebas con diferentes calibradores y se pudo comprobar que la elección del patrón de calibración puede variar el intervalo analítico y el intervalo de referencia (figura 1). Se eligió como patrón de calibración el condroitín sulfato C, debido a que con éste se obtiene un intervalo analítico más amplio que con los otros patrones.

### Características metroológicas

**Imprecisión:** los coeficientes de variación intraserial fueron de 4,9% (22 mg/L), mientras que los interserial fueron de 13,64% (13 mg/L), 6,92% (22 mg/L) y 4,45% (43 mg/L).

**Límite de detección:** el límite de detección que se obtuvo fue de 2,63 mg/L.

**Intervalo analítico:** el intervalo analítico determinado fue de 5-100 mg/L.

**Linealidad:** El procedimiento es lineal hasta una concentración de 100 mg/L de condroitín sulfato C.

**Valores de referencia:** Los resultados de los valores de referencia y de los pacientes diagnosticados de mucopolisacaridosis analizados se exponen en la tabla II. La prueba de Kolmogorov-Smirnov demostró que los datos no siguen una distribución gaussiana para nuestra población. Se calcularon por tanto los intervalos de referencia por medio de los percentiles 2,5 y 97,5. Se apreciaron diferencias significativas en relación con la edad ( $P < 0,05$ ), pero no con el sexo.

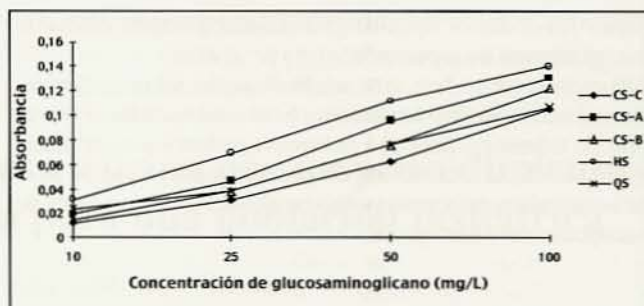


Figura 1. Absorbancia de los diferentes calibradores: condroitín sulfato A (CS-A), condroitín sulfato B (CS-B), condroitín sulfato C (CS-C), heparán sulfato (HS), queratán sulfato (QS).

## Discusión

Se han descrito distintos tipos de procedimientos de medida, cualitativos y cuantitativos, para determinar la presencia de glucosaminoglicanos en orina. El procedimiento descrito por Whitley et al. y Jong et al. utilizaba 1,9-azul de dimetilmetileno en solución amortiguadora de Tris/formato y presentaba el problema de que el reactivo era inestable. Basándonos en la comunicación realizada por Prosser S et al (10), hemos utilizado 1,9-azul de dimetilmetileno en solución amortiguadora de acetato, que presenta mayor estabilidad. No obstante, se pueden producir interferencias con las proteínas, de forma similar a la que se produce utilizando 1,9-azul de dimetilmetileno en solución amortiguadora de Tris/formato (11). Nosotros hemos adaptado a nuestras condiciones de trabajo el procedimiento del 1,9-azul de dimetilmetileno que ofrece importantes ventajas respecto a las pruebas cualitativas, como son rapidez y practicabilidad. Este procedimiento es simple, rápido (capaz de analizar 20 muestras en 5-10 minutos) y con reactivos estables y fáciles de preparar. Como magnitud de cribaje ofrece resultados y sensibilidad diagnóstica similares o superiores a los de otras magnitudes habitualmente empleadas (12). Conviene destacar que se pueden obtener resultados positivos falsos secundarios a diferentes situaciones, como destrucción del tejido conectivo, síndrome de mala absorción, osteomalacia, leucemia, lupus eritematoso, artritis reumática, síndrome de

Tabla II. Valores de referencia para una población pediátrica. Contraste con 3 pacientes con mucopolisacaridosis

	Edad						
	meses	meses	años	años	años	años	años
Valores de referencia	0-6 (n=24)	7-11 (n=12)	1-2 (n=22)	3-6 (n=22)	7-10 (n=24)	11-15 (n=18)	16-18 (n=10)
$P_{50}$	12,6	5,3	4,3	3,2	2,6	1,8	0,9
$P_{2,5-97,5}$	7,1-18	3,3-7,3	1,9-6,7	1,7-5,4	1-4,3	0,5-3,1	0,1-2,1
	Paciente 1 (Hurler)		Paciente 2 (Hurler)		Paciente 3 (Morquio)		
	(6 meses)		(8 meses)		(13 meses)		
	85,5		107		9,7		
Resultados expresados en mg glucosaminoglicanos/mmol creatinino							



Marfan, diabetes, encefalitis, obesidad y microcefalia. Así mismo se pueden obtener resultados negativos falsos en ciertos casos de la enfermedad de Morquio debido a que la excreción de queratán sulfato en pacientes con ésta enfermedad disminuye con la edad, pudiendo llegar a ser prácticamente nula a partir de la adolescencia.

La elección del patrón de calibración puede variar el intervalo analítico y el intervalo de referencia. Así, el heparán sulfato es el que produce una mayor absorbancia al unirse al cromógeno, pero su linealidad alcanza tan sólo 50 mg/L. Por otro lado, el condroitín sulfato C es el que produce una absorbancia menor pero su linealidad alcanza hasta 100 mg/L. En nuestra experiencia, es con este último patrón con el que consigue un intervalo analítico más amplio (5-100 mg/L) y con el que se obtienen valores de referencia similares a los de la bibliografía (1, 11, 13), a pesar de que en estos trabajos citados se hubiera utilizado como patrón de calibración el heparán sulfato. Además, el condroitín sulfato C es un glucosaminoglicano que se excreta fisiológicamente (14), por tanto es adecuado usar este patrón para establecer valores de referencia.

El cálculo de las diferentes características metrológicas aporta unos resultados de imprecisión que hacen a este procedimiento apto para su utilización en el laboratorio. Sólo para valores cercanos al límite superior de linealidad es conveniente diluir la muestra para poder cuantificar la excreción de glucosaminoglicanos de forma correcta.

Existen diferencias en la excreción de glucosaminoglicanos según la edad tal y como han observado también otros autores (11, 13), por tanto se deben establecer valores de referencia para diversos grupos de edad. Estas diferencias son mayores durante los primeros años de vida. No existen diferencias respecto a ambos sexos.

Respecto a nuestros resultados, las dos muestras de pacientes ya diagnosticados con enfermedad de Hurler, presentan valores claramente superiores al límite superior de referencia. En cuanto al paciente diagnosticado de enfermedad de Morquio el resultado no es tan elevado, habiéndose descrito en la bibliografía (11) que en esta enfermedad la concentración de glucosaminoglicanos es menor que en otras mucopolisacaridosis, como la enfermedad de Hurler. Por tanto, aunque el análisis de los glucosaminoglicanos en orina es el punto de partida del diagnóstico bioquímico de las mucopolisacaridosis, dependiendo del tipo de mucopolisacaridosis, se puede encontrar una excreción fisiológica. Además, para diagnosticar el tipo de mucopolisacaridosis es necesario identificar el tipo de glucosaminoglicanos excretado, ya que no se pueden identificar los distintos tipos presentes en la orina por medio de los procedimientos de cribaje anteriormente citados. La electroforesis en tiras de acetato de celulosa es útil para la tipificación cualitativa del heparán sulfato y el dermatán sulfato, siendo en cambio útil la cromatografía en capa fina en placas de celulosa para la detección de queratán sulfato. Una vez realizados estos estudios, el análisis de la actividad enzimática nos aportará el diagnóstico definitivo. El análisis de glucosaminoglicanos en orina se realizará como procedimiento de cribaje inicial que nos permitirá valorar la necesidad de continuar el estudio.

Correspondencia:  
C. Colomé i Mallolas  
Hospital Sant Joan de Déu  
Servei de Bioquímica  
Passeig de Sant Joan de Déu, 2  
08950 Esplugues de Llobregat.  
Barcelona

## Bibliografía

1. de Jong JGN, Heijs WMJ, Wevers RA. Mucopolysaccharidoses screening: dimethylmethylene blue versus Alcian blue. *Ann Clin Biochem* 1994; 31: 267-71.
2. Stone JE, Akhtar N, Botchway S, Pennock CA. Interaccion of 1,9-dimethylmethylene blue with glicosaminoglycans. *Ann Clin Biochem* 1994; 31: 147-52.
3. Berman ER, Vered J, Bach G. A reliable spot test for mucopolysaccharidoses. *Clin Chem* 1971; 17: 886-90.
4. Berry HK, Spinanger J. A paper spot test useful in the study of Hurler syndrome. *J Lab Clin Med* 1960; 55: 136-8.
5. Manley G, Hawksworth J. Diagnosis of Hurler's syndrome in the hospital laboratory and the determination of its genetic type. *Arch Dis Child* 1996; 41: 91-6.
6. Whiteman PD. Quantitative determination of total glycosaminoglycans in urine using alcian blue. *Biochem J* 1973; 131: 343-57.
7. Di Ferrante NM. The measurement of urinary mucopolysaccharidoses. *Anal Biochem* 1967; 21: 98-106.
8. Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* 1962; 4: 330-4.
9. Dembure PP, Drumheller JE, Barr SM, Elsas LJ. Selective urinary screening for mucopolisacchridoses. *Clin Biochem* 1990; 23: 91-6.
10. Prosser SP, Standing SJ, Taylor RP. A rapid automated method for the measurement of urinary total glycosaminoglycans. En: *Proceedings of the XVI International Congress of Clinical Chemistry*. London. July 1996: 434.
11. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 1986; 883: 173-7.
12. de Jong JGN, Wevers RA, Laarakkers C, Poorthuis BJHM. Dimethylmethylene Blue-Based spectrophotometry of Glycosaminoglycans in Untreated Urine: a Rapid Screening Procedure for Mucopolysaccharidoses. *Clin. Chem* 1989; 35: 1472-7.
13. de Jong JGN, Wevers RA, Liebrand-van Sambeek. Measuring Urinary Glycosaminoglycans in the Presence of protein: An Improved Screening Procedure for Mucopolysaccharidoses Based on Dimethylmethylene Blue. *Clin Chem* 1992; 38: 803-7.
14. Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Mc Graw-Hill Inc: New York. 7ª ed. 1995: p. 2465-94.