

Variabilidad biológica de constituyentes urinarios en pacientes con diabetes mellitus tipo 1

T. Pascual Durán, J. González-Revaldería, M. de Paula Ruiz, E. Miravalles González

Resumen

Se han estudiado los componentes de la variación biológica intra e interindividual, así como de la variación analítica de los constituyentes: albúmina, creatinino, α -amilasa, isoenzima pancreática e isoenzima salival de la α -amilasa, β -N-acetilhexosaminidasa y del cociente entre las isoenzimas pancreática y salival, en la primera orina de la mañana de 47 pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (16 hombres y 31 mujeres) menores de 30 años de edad cuando comenzó su enfermedad.

Se han encontrado valores bajos de los índices de individualidad (algo mayor en el creatinino) en todos los constituyentes estudiados, lo cual indica la poca utilidad de los intervalos de referencia basados en los datos de población. En todos los casos se cumplieron los requisitos de calidad analítica.

La concentración de albúmina en orina es un marcador biológico utilizado en el diagnóstico y pronóstico de nefropatía en el paciente diabético pero, dada su variabilidad, el valor de una sola determinación es escaso. Los demás constituyentes urinarios estudiados presentan similares limitaciones según se deduce de sus datos de variación biológica.

Introducción

El estudio de la variabilidad biológica de los constituyentes bioquímicos y hematológicos ha constituido un campo de atención creciente en los últimos años. Con estos estudios se ha podido determinar qué variación poseen las magnitudes bioquímicas y hematológicas de un individuo y las de un colectivo, tanto de sanos como de enfermos crónicos. En este último caso se considera que en enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica o hipertensión arterial, se modifican los valores de algunas magnitudes bioquímicas pero se alcanza un nuevo punto homeostático alrededor del cual oscilan.

Los estudios de variación biológica permiten, además, conocer si los intervalos de referencia de un constituyente son útiles (mediante el cálculo del índice de individualidad) o es necesario hacer las comparaciones sobre valores previos de ese constituyente en cada sujeto (intervalo de referencia intraindividual) en caso de disponer de ellos. Estos estudios también permiten conocer cual es el mínimo cambio o modificación

Summary

Some urinary constituents have been proposed to monitorize the progression of diabetic nephropathy but scarce data are available about biological variation of these constituents. We have studied analytical and biological variation components (intra and interindividual) of urinary albumin, creatininium, α -amylase, pancreatic and salivary isoenzyme of α -amylase, β -N-acetylhexosaminidase, and the ratio salivary to pancreatic isoenzymes. Urine specimens (the first voided in the morning) were collected from 47 insulin-dependent diabetic patients (16 men, 31 women) diagnosed before they were 30 years old.

A low value of individuality indices has been found for these urinary constituents (with the possible exception of creatininium) which indicates that reference values based in population data are not useful. Analytical goals are fulfilled in all cases.

Urine albumin concentration is widely used in diagnosis and prognosis of diabetic nephropathy but a single determination is not useful due to its high variability. The other urinary constituents show similar limitations as could be inferred from biological variation data.

que ha de darse en el valor de una magnitud bioquímica para considerar que este cambio es significativo con una probabilidad determinada (generalmente $P < 0,05$).

Aunque los constituyentes séricos o sanguíneos han sido estudiados con detalle, existe mucha menos información sobre estos datos en orina (1-3) siendo prácticamente inexistente sobre los constituyentes urinarios en pacientes con enfermedades crónicas como la diabetes mellitus.

Esta enfermedad tiene una prevalencia muy elevada que se calcula entre el 3 y 4 por 1000 habitantes en Europa y Estados Unidos (4). Aun siendo los estudios epidemiológicos en España muy escasos, se calcula que al menos 150000 personas padecen diabetes mellitus tipo 1 (5,6). Un tercio de estos pacientes desarrollarán nefropatía diabética, caracterizada por una eliminación elevada de proteína en orina y disminución de la filtración glomerular, terminando muchos de ellos en insuficiencia renal crónica y constituyendo un tercio de los nuevos pacientes en diálisis en Estados Unidos (7). En España se calcula en 45000 el número de pacientes que fallecerán a consecuencia de su nefropatía (8,9), de ahí el interés de identificar esta subpoblación de mayor riesgo e iniciar la intervención terapéutica lo antes posible. Hasta ahora se utiliza como indicador de nefropatía la cuantificación de la concentración de albúmina en orina («microalbuminuria»), en base a la observación, en al menos dos veces de cada tres exploraciones analíticas, de concentraciones de albúmina en orina entre 30-300 mg/24 h o 20-200 mg/min en orina de 24 h o de la noche (10).

Servicio de Bioquímica,
Hospital Universitario de Getafe,
Getafe, Madrid.
Recibido: 23-4-97.
Aceptado: 20-5-98.

Hoy día se proponen otros marcadores como: el cociente entre las isoenzimas salival y pancreática de la α -amilasa (debido a alteraciones de las cargas eléctricas que se producen en los componentes de la membrana basal glomerular, al ser la isoenzima salival aniónica y la isoenzima pancreática neutra) (11), con el fin de encontrar un indicador más precoz de nefropatía diabética, lo que junto con otros factores está contribuyendo a una disminución de la incidencia de nefropatía entre los diabéticos tipo I (12).

En este trabajo se ha estudiado la variabilidad biológica de la concentración de albúmina, creatinina, α -amilasa, isoenzimas pancreática y salival de la α -amilasa, β -N-acetilhexosaminidasa y del cociente entre las isoenzimas salival y pancreática en orina de enfermos con diabetes mellitus tipo I, con el fin de averiguar la utilidad de los intervalos de referencia, el mínimo cambio que ha de darse en cada magnitud bioquímica para considerar que ese cambio ha sido significativo ($P < 0,05$) y el cumplimiento de los objetivos analíticos (coeficiente de variación analítico menor o igual a la mitad del coeficiente de variación intraindividual).

Material y métodos

Pacientes

Se han estudiado 47 pacientes con diabetes mellitus tipo I (16 hombres y 31 mujeres) de edades comprendidas entre 12 y 53 años, con un tiempo medio de evolución desde el diagnóstico de 13,4 años (intervalo: 2-28 años). En el momento del diagnóstico todos los pacientes tenían menos de 30 años de edad. En general, no presentaban complicaciones derivadas de esta enfermedad (neuropatía, retinopatía, nefropatía). Sólo 10 pacientes (21%) presentaban hipertensión ligera y en ninguno de ellos se constató una alteración importante de la función renal (todos tenían una concentración de creatinina sérica inferior a 133 $\mu\text{mol/L}$). Durante el tiempo que duró el estudio no se modificó la situación patológica de los pacientes, constatándose por una no alteración de la exploración física ni de los resultados analíticos (glicohemoglobina).

Especímenes

Los constituyentes estudiados se analizaron en orina de la primera micción de la mañana, recogiendo una vez a la semana durante tres semanas. Las orinas se recibieron en el laboratorio durante las dos horas siguientes a su obtención. Las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

Instrumentación y procedimiento

Todas las determinaciones se llevaron a cabo el mismo día con el fin de minimizar la variabilidad analítica entre series, en un analizador BM/Hitachi 911 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), con reactivos de la misma compañía. Las concentraciones de isoenzima salival de la α -amilasa se obtuvieron por diferencia entre las concentraciones de α -amilasa y de su isoenzima pancreática.

La concentración de α -amilasa se midió con un método espectrofotométrico enzimático que emplea 4,6-etilideno(G_7)-p-nitrofenil(G_1)- α , D-maltoheptaósido como sustrato (ref. 9 489 160); la de isoenzima pancreática se midió por el mismo método tras inhibir la isoenzima salival con anticuerpos monoclonales (ref. 1 489 402); la de creatinina por el método de Jaffé sin desproteinización (ref. 1 040 847). La concentración de albúmina en orina se midió por inmunoturbidimetría a punto final (ref. 1 203 622) y la de β -N-acetilhexosaminidasa, me-

dante la cuantificación de la liberación de rojo de clorofenol a partir de la sal disódica del 3,3'-diclorofenolsulfoftaleína- β -N-acetilhexosaminidasa (ref. 1 087 657).

Tratamiento estadístico

La variabilidad analítica se obtuvo analizando las muestras por duplicado. Mediante técnicas de análisis de la variancia (diseño escalonado en dos etapas), se dividió la variancia total en los componentes debidos a la variancia analítica, intra e interindividual, los cuales se expresan como coeficientes de variación (CV_a , coeficiente de variación analítico; CV_i , coeficiente de variación biológica intraindividual y CV_g , coeficiente de variación biológica interindividual). El índice de individualidad (I) se calculó mediante la expresión (13):

$$I = CV_{i+a}/CV_g$$

y el índice de heterogeneidad (IH), que refleja si la variancia intraindividual muestra heterogeneidad o no, se calculó mediante la expresión (14):

$$IH = CV_{i+a}/100 (2/n-1)^{1/2}$$

El índice de heterogeneidad es el cociente del coeficiente de variación obtenido de un conjunto de variancias individuales (incluyendo variancia analítica) frente a un coeficiente de variación teórico que es $[2/(n-1)]^{1/2}$ donde n es el promedio del número de especímenes recogidos por sujeto. La desviación típica de la diferencia entre este cociente y el esperado valor de la unidad (bajo la hipótesis de no heterogeneidad) es $1/(2n)^{1/2}$ y puede concluirse que existe heterogeneidad significativa si el cociente difiere de la unidad en al menos dos desviaciones típicas. El valor obtenido se comparó frente al teórico dado por la expresión $1 + 2/(2n)^{1/2}$ donde n es el número de replicados. Si el índice de heterogeneidad calculado es menor de 1,82 (valor obtenido en nuestro caso, $n = 3$) entonces los datos de variación de los sujetos son homogéneos y es útil determinar la mínima diferencia significativa (d) que puede calcularse mediante la expresión, para $P < 0,05$:

$$d = 2,77 (CV_a^2 + CV_i^2)^{1/2}$$

Resultados

No se encontraron diferencias por sexo en ninguna de las magnitudes bioquímicas estudiadas (prueba de Mann-Whitney, tabla I). En la tabla II se muestra la media, el coeficiente de variación analítico, el coeficiente de variación intraindividual y el coeficiente de variación interindividual obtenidos para las magnitudes bioquímicas urinarias estudiadas. Asimismo, se muestran los objetivos analíticos basados en la expresión: $CV_a \leq 1/2 CV_i$ (15), junto con los índices de individualidad y heterogeneidad, la mínima diferencia significativa entre determinaciones sucesivas y el número de especímenes necesarios para asegurar que el resultado medio está dentro del intervalo de $\pm 5\%$ del punto homeostático del individuo, que viene dado por la expresión:

$$n = 1,96^2 (CV_a^2 + CV_i^2)/25$$

Como se observa, los objetivos analíticos se cumplen en todos los casos. Cuando los índices de individualidad son superiores a 1,4 los intervalos de referencia basados en una población homogénea son útiles, mientras que cuando están por debajo de 0,6 no son de utilidad y, entre estos valores, su utili-

Tabla I. Media y desviación típica diferenciada por sexo de las magnitudes biológicas estudiadas

Constituyente urinario (unidad)	Hombres (n=16)		Mujeres (n=31)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Albúmina (mg/L)	32,6	14,6	36,9	16,4
Creatinino (mmol/L)	11,2	3,93	9,90	4,37
α -amilasa (μ kat/L)	5,10	1,77	4,52	1,75
Isoenzima pancreática (μ kat/L)	2,77	1,23	2,87	1,08
Isoenzima salival (μ kat/L)	1,52	0,62	1,65	0,95
β -N-acetil-hexosaminidasa (nkat/L)	49,5	29,7	46,2	19,8
Isoenzima salival/isoenzima pancreática (1)	0,65	0,4	0,7	0,38

Tabla II. Componentes de la variación biológica obtenidos en las magnitudes bioquímicas estudiadas

Constituyente urinario (unidad)	\bar{x}	CV_a (%)	CV_i (%)	CV_g (%)	Objetivo analítico (%)	<i>II</i>	<i>IH</i>	<i>d</i> (%)	nº especímenes*
Albúmina (mg/L)	34,6	5,66	41,9	203	21	0,21	0,48	117	275
Creatinino (mmol/L)	10,1	1,54	34,3	32,1	17,2	1,12	0,36	95	181
α -amilasa (μ kat/L)	4,58	1,81	35,4	43,6	17,7	0,85	0,37	98	193
Isoenzima pancreática (μ kat/L)	2,85	1,80	37,6	51,7	18,8	0,76	0,39	104	218
Isoenzima salival (μ kat/L)	1,62	1,71	51,1	64,3	25,5	0,82	0,53	142	402
β -N-acetil-hexosaminidasa (nkat/L)	47,9	1,96	58,5	100,3	29,2	0,60	0,61	162	526
Isoamilasa salival/isoamilasa pancreática (1)	0,67	9,68	38,5	52,6	19,2	0,91	0,48	110	242

CV_a : coeficiente de variación analítico, CV_i : coeficiente de variación biológica intraindividual, CV_g : coeficiente de variación biológica interindividual, *II*: índice de individualidad, *IH*: índice de heterogeneidad, *d*: mínima diferencia significativa; *requeridos para establecer el punto homeostático ($P < 0,05$).

dad es limitada. En el caso de las magnitudes estudiadas todos los valores del índice de individualidad se encuentran entre 0,6 y 1,4 por lo que no parece adecuado el empleo de intervalos de referencia convencionales basados en la población, sino que es más aconsejable el utilizar intervalos de referencia intraindividuales. En el caso de la albúmina en orina este hecho es más evidente.

Los valores del índice de heterogeneidad son todos inferiores a 0,7 lo cual muestra que los datos de variación de nuestros pacientes son homogéneos. Por tanto, es útil determinar la mínima diferencia significativa por el método antes indicado. En la tabla II se muestran los valores de la mínima diferencia significativa en porcentaje, necesitando cambios de alrededor del 100 % en albúmina, creatinino, α -amilasa, isoenzima pancreática de α -amilasa y cociente entre las isoenzimas salival y pancreática de α -amilasa, mientras que la isoenzima salival y β -N-acetilhexosaminidasa, son de alrededor del 150%.

Discusión

El estudio de la variabilidad biológica en un grupo de pacientes diabéticos tipo I muestra valores de variación intra e interindividual relativamente elevados. La información disponible en la bibliografía es escasa y está limitada a la concentración de albúmina en orina, encontrándose valores del coeficiente de variación intraindividual similares a los obtenidos en el presente estudio (16). En el caso de la concentración urinaria de creatinino se han descrito valores del coeficiente de variación intraindividual de alrededor del 15% en sujetos sanos y orina

de 24 horas especialmente recogida para el estudio (1), con lo que se minimizan los errores de recogida. En este trabajo se han utilizado especímenes de orina de primera hora de la mañana que tienen mayor variación que las de 24 horas (17), pero consideramos que son más útiles ya que en una situación real eliminan problemas de recogida y almacenamiento.

En el caso de la isoenzima pancreática de α -amilasa se han obtenido valores de los coeficientes de variación intra e intraindividuales muy similares a los descritos previamente en individuos sanos por Cummings y Fraser (18). Estos autores encontraron que la primera orina de la mañana era el espécimen de elección para esta determinación. La presencia de valores del índice de individualidad inferiores a 1 (excepto el creatinino) hace que los constituyentes estudiados tengan poca utilidad diagnóstica. El número de especímenes necesarios para conseguir que la media de los resultados esté entre $\pm 5\%$ del punto homeostático de un individuo es alto (como

cabe esperar de la variación biológica de las magnitudes bioquímicas estudiadas). En todos los casos estudiados se cumplieron los objetivos analíticos establecidos.

En el control de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 se han propuesto diversos constituyentes urinarios para monitorizar su evolución. Según nuestro estudio, en pacientes aceptablemente «bien controlados», tanto clínica como analíticamente (según se deduce de los valores de glicohemoglobina), se observa una variación biológica elevada en las magnitudes bioquímicas estudiadas, lo cual sugiere interpretar los resultados analíticos de una única determinación con reservas.

Correspondencia:
Tomás Pascual Durán
Hospital Universitario de Getafe
Servicio de Bioquímica
Ctra. de Toledo km 12,500
28905 Getafe, Madrid.

Bibliografía

- Gowans EMS, Fraser CE. Biological variation in analyte concentrations in urine of apparently healthy men and women. *Clin Chem* 1987; 33: 847-50.
- Gunn, IR. Biological variation of serum and urine creatinine clearance. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 302-3.
- Mella M, Salomone A, Spaggiardi G, Stella O, Guagnellini E. Reference values and biological variation for albumin, α_2 -microglobulin and β_2 -microglobulin in urine specimens. *Biochem Clin* 1989; 13 (suppl): 89-93.
- Farreras P, Rozman C, dirs. *Medicina Interna*. Barcelona: Ediciones Doyma, S.A., 1992.
- Figuerola D, dir. *Diabetes Mellitus*. Guía para su conocimiento y control. Barcelona: Salvat Editores, S.A., 1985.

6. Cerdán Vallejo A, Jara Albarrán A, Roderíguez Miñón JL, Pallardo Sánchez LF, dirs. Manual del diabético. Madrid: Ediciones Cea, S.A., 1985.
7. Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T. Diabetic nephropathy in type I (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia* 1983; 25: 496-501.
8. Deckert T, Poulsen JE, Larsen M. Prognosis of diabetics with diabetes onset before the age of thirty-one. I. Survival, causes of death and complications. *Diabetologia* 1978; 14: 363-70.
9. Panzran G. Mortality and survival in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1987; 30: 123-31.
10. Morgensen CE, Chacahí A, Christensen CK, et al. Microalbuminuria: an early marker of renal involvement in diabetes. *Uremia Invest* 1986; 9: 85-95.
11. Recio F, Villaamil F, Recio C, Ferrer C. Early changes in urinary amylase isoenzymes in diabetes mellitus. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 657-61.
12. Bojestig M, Arnquist H, Hermannssen F, Karlberg B, Ludvigsson J. Declining incidence of nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1994; 330: 15-8.
13. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27: 409-37.
14. Harris, EK. Distinguishing physiologic from analytic variation. *J Chronic Dis* 1970; 23: 469-88.
15. Fraser CG. Analytical goals are applicable to all. *JIFCC* 1990; 2: 84-6.
16. Feldt-Rasmussen B, Mathiesen ER. Variability of urinary albumin excretion in incipient diabetic nephropathy. *Diabetic Nephrol* 1984; 3: 101-3.
17. Ricós C, Jiménez CV, Hernández A, Simón M, Perich, C, Alvarez V, et al. Biological variations in urine samples used for analyte measurements. *Clin Chem* 1994; 40: 472-7.
18. Cummings ST, Fraser CG. Total amylase and pancreatic isoamylase in serum and urine: considerations from data on biological variation. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 335-40.