

**Determinación de la Cistatina C como marcador de función renal en pacientes normoalbuminúricos
con Diabetes Mellitus tipo 2**

Alcívar Vásquez Juan Manuel*, Puig Gilbert Carlos Alberto*, Wong Lama Jeani*, Miguel Flor MD.**

*Estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica Santiago de Guayaquil;

**Docente Investigador, Catedrático de Medicina Interna UCSG, Médico Tratante Hospital Luis Vernaza

Resumen

Introducción.- La identificación temprana del deterioro de la función renal es crucial en los pacientes diabéticos. Clínicamente la cistatina C sérica podría ser el indicador más sensible de tasa de filtrado glomerular. **Objetivos.-** Proponer el uso de cistatina C como prueba de rutina para evaluar la función renal en pacientes diabéticos tipo 2. **Metodología.-** Se realizó un estudio transversal observacional a 115 pacientes diabéticos tipo 2 normoalbuminúricos, estableciendo la tasa de filtrado glomerular con valores de cistatina C y fórmula de Cockcroft–Gault. A aquellos con un filtrado glomerular < 60 ml/min se realizó aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas; y comparamos los resultados con el programa estadístico SPSS 17, presentando los datos en tablas de contingencia con análisis de riesgo y test de significancia de χ^2 . **Resultados.-** La tasa de filtrado glomerular obtenida con cistatina C, tuvo un valor promedio de $99 \pm 19,07$, mientras que la de Cockcroft-Gault un valor de $79,85 \pm 23,63$ reflejando mejor correlación con aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas que obtuvo un valor de $74,95 \pm 37,41$. Al relacionar los valores con el aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas, no hubo una relación significativa entre ambos parámetros ($p=0,14$). **Conclusiones.-** La tasa de filtrado glomerular con cistatina C presenta una gran dispersión en la correlación con el aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas; este hecho, junto a diversos factores que influyen en su variabilidad, y el mayor coste de su determinación, hacen poco justificable su uso para valorar función renal.

Palabras Claves.- Palabras clave: Cistatina C, Creatinina, nefropatía diabética, diabetes mellitus tipo 2, tasa de filtración glomerular, albuminuria.

Abstract

Introduction: Early identification of renal impairment is crucial in diabetic patients. The determination of cystatin C could be the most sensitive clinical marker of glomerular filtration rate (GFR) in diabetic patients.

Objectives: We propose the use of cystatin C as a routine laboratory test to assess renal function in

patients with Diabetes Mellitus. **Methods:** A transversal observational study of 115 type 2 diabetic patients

with normal albuminuria was performed. The GFR was determined with cystatin C values and the Cockcroft-

Gault Formula. Patients with GFR < 60 ml/min were further tested with the creatinine clearance in urine in

24 hours. Results were analyzed with the statistic program SPSS 17 and the data was analyzed in

contingency tables with risk analysis and χ^2 tests. **Results:** The average of GFR obtained with the

measurement of cystatin C was of $99 \pm 19,07$ and the analysis with the Cockcroft-Gault yielded an average of

$79,85 \pm 23,63$. The values obtained measuring the creatinine clearance in urine of 24 hours were

$74,95 \pm 37,41$, showing a higher correlation with the values of GFR obtained through the Cockcroft-Gault

formula than with the values obtained with the cystatin C. ($p < 0,14$) **Conclusions:** The GFR obtained with

cystatin C showed a great variability when compared with creatinine clearance in urine in 24 hours. The

analysis performed and the variability observed, in combination with the higher cost of the analysis with

cystatin C argue against the determination of the GFR through cystatin C as a routine test to determine

renal compromise in diabetic patients.

Keywords. - Cystatin C, Creatinine, diabetic nephropathy, type 2 diabetes, glomerular filtration rate, albuminuria.

Introducción

La valoración de la función renal en los pacientes diabéticos es clave para la identificación temprana y el manejo adecuado de la nefropatía diabética, pero durante las etapas iniciales su progresión es silenciosa y su detección con las pruebas de rutina es difícil. Sabiendo que, aun cuando el daño renal no se puede revertir, su deterioro puede disminuirse con la intervención temprana en el control de la presión arterial, restricción proteica en la dieta y control más estricto de la glicemia evitando complicaciones.¹⁴

El mejor método para valorar la función renal es la tasa de filtración glomerular, que se reduce antes de la aparición de la sintomatología, si bien su estimación es exacta mediante la administración de sustancias exógenas, estas son de difícil uso en la práctica clínica cotidiana. Actualmente se pregonan el uso de las fórmulas de Cockcroft–Gault y de MDRD para estimar la tasa de filtración glomerular, sin embargo estas fórmulas están sujetas a variables, entre ellas, peso, masa muscular, edad, sexo y raza, por otro lado, la cuantificación de sustancias endógenas como proteínas en orina y la creatinina y su aclaramiento en orina de 24 horas es lo más utilizado para valorar la tasa de filtrado glomerular (TFG). Esta última, que a pesar de su gran utilidad, presenta limitaciones por la técnica en la recolección de la muestra.¹³ La mayoría de sociedades médicas recomiendan usar los niveles de microalbuminuria para el seguimiento de la función renal en los pacientes diabéticos, sin embargo, individuos normoalbuminúricos no están exentos de desarrollarla y otros con microalbuminuria, no necesariamente están destinados a presentar nefropatía.⁵

Recientemente se ha propuesto como marcador de función renal a la cistatina C sérica. Ésta es una proteína no glicosilada producida por todas las células nucleadas del organismo; filtrada libremente por los glomérulos y es reabsorbida y metabolizada en los túbulos renales. Sus niveles séricos no se ven influenciados por el género, edad, raza ni índice de masa corporal, contrariamente a lo ocurrido con la creatinina sérica, haciendo de ésta última un parámetro insensible a leves cambios en la TFG por su amplio rango de referencia.⁹

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio transversal observacional en el periodo de Febrero a Abril del 2010, recolectando muestras de 115 pacientes voluntariamente reclutados de la Asociación de Diabéticos Hospital Rodríguez Zambrano de Manta, Hospital Verdi Cevallos Balda de Portoviejo y Hospital Regional del IESS Teodoro Maldonado Carbo de la ciudad de Guayaquil, recogiendo datos de edad, peso, sexo, antecedentes patológicos, hábitos farmacológicos y tiempo de evolución de la enfermedad.

Los criterios de inclusión fueron: individuos con antecedentes de diabetes mellitus tipo 2, confirmada clínicamente y por indicadores de laboratorio de por lo menos 2 años de evolución, de cualquier sexo, de edad entre 18 y 95 años, sin antecedentes de alguna nefropatía de base, eutiroideos y pacientes con microalbuminuria menor o igual a 20.0 ug/min.

Se excluyeron del estudio pacientes con insuficiencia renal de cualquier etiología, diabetes mellitus tipo 1, enfermedad tiroidea, enfermedad cardiovascular conocida (insuficiencia cardiaca, enfermedad valvular), edad fuera del rango de inclusión, aquellos con antecedentes de trasplante renal, neoplasias, aquellos tratados con glucocorticoides, estatinas, y obviamente fueron excluidos aquellos pacientes que se encontraban catalogados como disglucémicos.

Para el estudio se tomaron muestras de sangre y orina, se determinaron niveles de glicemia en ayunas con el método enzimático de glucosaoxidasa, creatinina sérica con el método colorimétrico de Jaffé, ambas pruebas en el analizador Hitachi 917. Se cuantificó microalbuminuria en muestra de orina al azar mediante el método de inmunoquimioluminiscencia procesado en el analizador Inmulite I. A aquellos pacientes que tuvieron niveles de microalbuminuria dentro de los rangos normales se les realizó la cuantificación de cistatina C por el método de inmunoturbidimetría potenciada con partículas en el analizador Hitachi 917; luego se calculó la tasa de filtrado glomerular según valores de cistatina C y con la fórmula de Cockcroft-Gault y a aquellos pacientes que tuvieron una tasa de filtrado glomerular < 60 ml/min, se les realizó aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas.

Se compararon y analizaron los resultados obtenidos en el programa estadístico SPSS 17 y se presentaron los datos en tablas de contingencia, test de significancia X^2 , curvas ROC, regresión lineal para correlacionar la tasa de filtrado glomerular obtenida mediante la fórmula de la cistatina C y Cockcroft-Gault con el resultado obtenido del aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas y diagramas de Caja.

Resultados

Los resultados obtenidos en el estudio muestran mayor cantidad de pacientes de sexo femenino (82,6%), en comparación a la población masculina que representó un 17,4% de los pacientes, con una significancia de 0,035 ($p < 0,05$), al igual que en ésta población el 57,4% tienen menos de 60 años. La edad promedio de los pacientes fue de $60,83 \pm 10,13$. (Tabla 1-2)

El 57,4% de los pacientes presentaron niveles elevados de glucosa. El 34,8% de los pacientes presentaron valores por encima del punto de corte en creatinina mientras el 69,6% lo hicieron para cistatina C.

El valor promedio de creatinina fue de $0,79 \pm 0,15$ mg/dL y el de cistatina C fue de $0,88 \pm 0,19$ mg/dL, sin embargo, el punto de corte de creatinina fue superior al de cistatina C (0,84 vs 0,76 en mujeres y 0,86 vs 0,85 en hombres). (Tabla 1)

La tasa de filtrado glomerular obtenida con cistatina C, tuvo un valor promedio de $99 \pm 19,07$, y la de Cockcroft-Gault ml/min de $79,85 \pm 23,63$, mostrando esta última mejor correlación con el aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas que obtuvo un valor de $74,95 \pm 37,41$. (Tabla2)

Al realizar la comparación entre los valores medios de creatinina y cistatina C en cuanto a edad y sexo, se observaron niveles más elevados de ambas en pacientes entre los 70-79 años, la cistatina C superando a la creatinina en este grupo ($1,06 \pm 0,20$ vs $0,90 \pm 0,15$; $p < 0,001$). Se observaron valores mayores de creatinina frente a la cistatina C en la población masculina, sin que exista una diferencia significativa entre ambas ($0,86 \pm 0,12$ vs $0,95 \pm 0,10$), mientras que en las mujeres, los valores de cistatina C superaron a los valores de creatinina ($0,86 \pm 0,12$ vs $0,95 \pm 0,10$), (Gráfico 1). Sin embargo, a pesar que los valores de cistatina C fueron mayores a los valores de creatinina en la mayoría de los casos, estos se mantuvieron dentro de los valores considerados normales.

Se construyeron curvas ROC para determinar la capacidad diagnóstica de la tasa de filtrado glomerular estimada mediante las fórmulas de cistatina C y Cockcroft-Gault, donde se demostró que la fórmula de

Cockcroft-Gault presentó mayor área bajo la curva que la primera; con mayor especificidad sin presentar diferencias estadísticas.

Al relacionar los valores de la tasa de filtrado glomerular obtenida con cistatina C y el aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas, no se encontró una relación significativa entre ambos parámetros ($p=0,14$).

Tablas y gráficos

Tabla 1

Características de la población

Variables	Media	DS
Edad	60,83	10,13
Glucosa mg/dL	143,63	70,85
Creatinina mg/dL	0,79	0,15
Microalbuminuria	5,92	4,2
Cistatina C mg/L	0,88	0,19
Clearence de Creatinina	74,95	37,41
TFG Cist C ml/min/1,732	99,63	19,07
Cockroft-Gault ml/min	79,85	23,63
Peso Kg.	64,17	12,27
Talla m	1,53	0,083
IMC	27,23	4,43

Tabla 2

Valores de Cistatina y Creatinina según edad y sexo

Variables	N (115)	Cistatina C (mg/L) Media±DS	Creatinina (mg/L) Media±DS	p
Edad				
30-39	3	0,67±0,06	0,75±0,34	ns
40-49	9	0,74±0,12	0,72±0,10	ns
50-59	37	0,85±0,19	0,78±0,13	0,041
60-69	44	0,87±0,14	0,78±0,14	0,012
70-79	20	1,06±0,20	0,90±0,15	< 0,01
> = 80	2	0,95±0,03	0,74±0,11	0,28
Sexo				
Masculino	20	0,86±0,12	0,95±0,10	0,38
Femenino	95	0,88±0,20	0,76±0,14	< 0,01
Total	115	0,88±0,19	0,79±0,15	< 0,01

ns: Sin diferencias significativas

Gráfico 1

Valores de Cistatina C y Creatinina según la edad

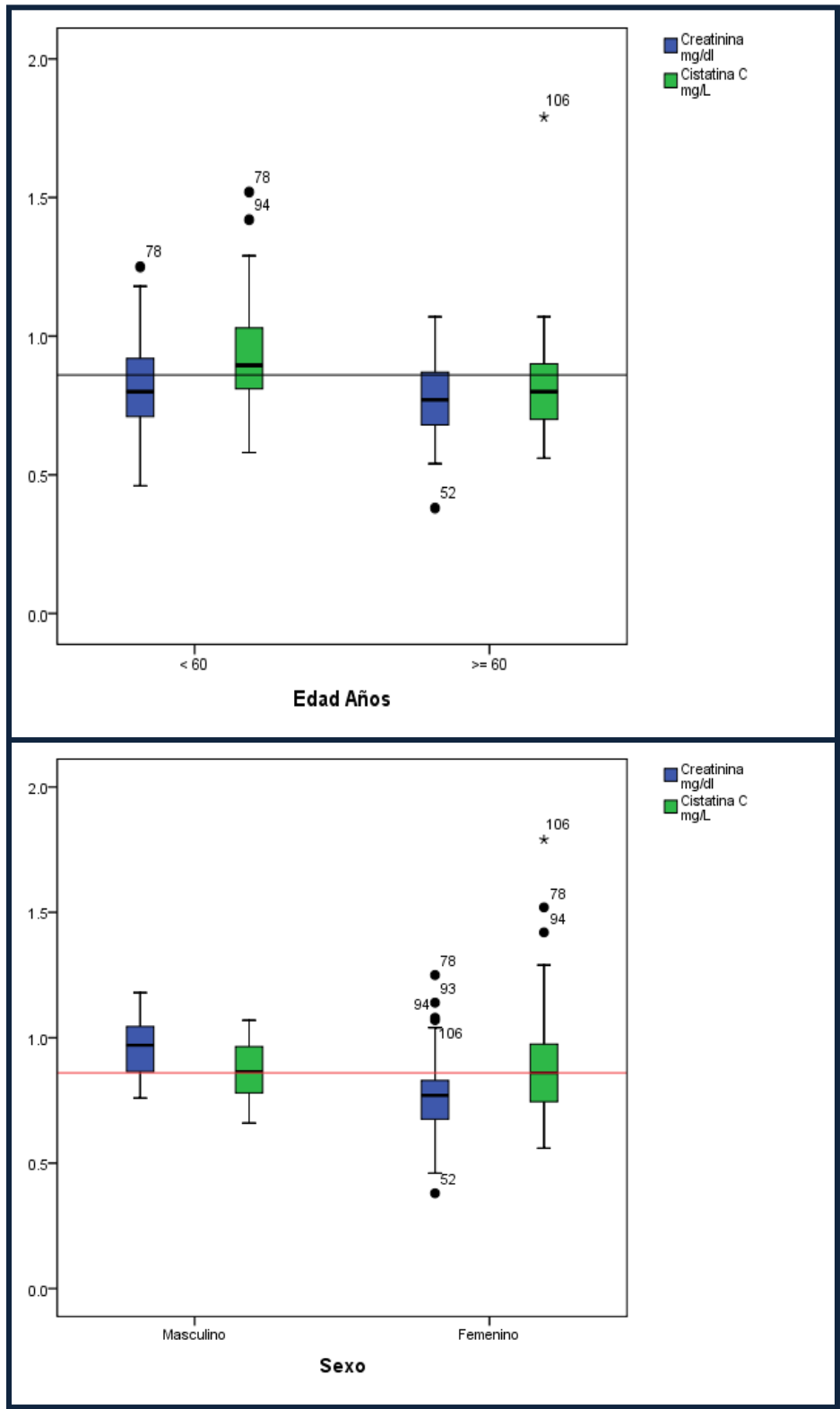
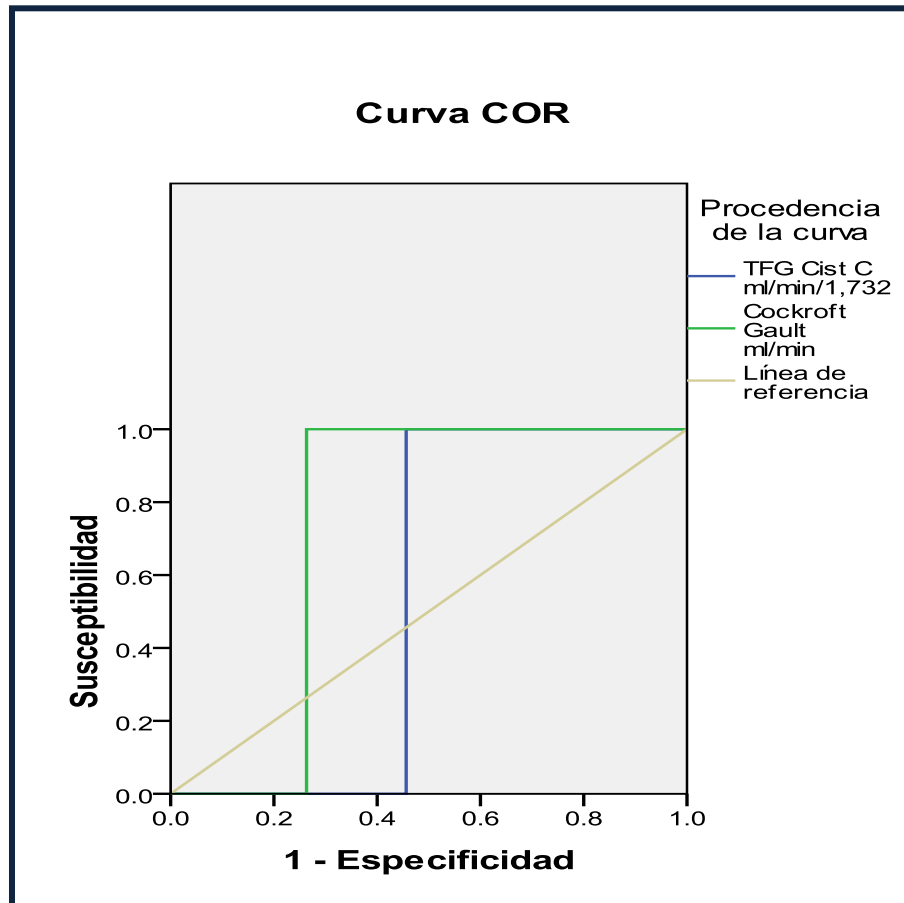


Gráfico 2

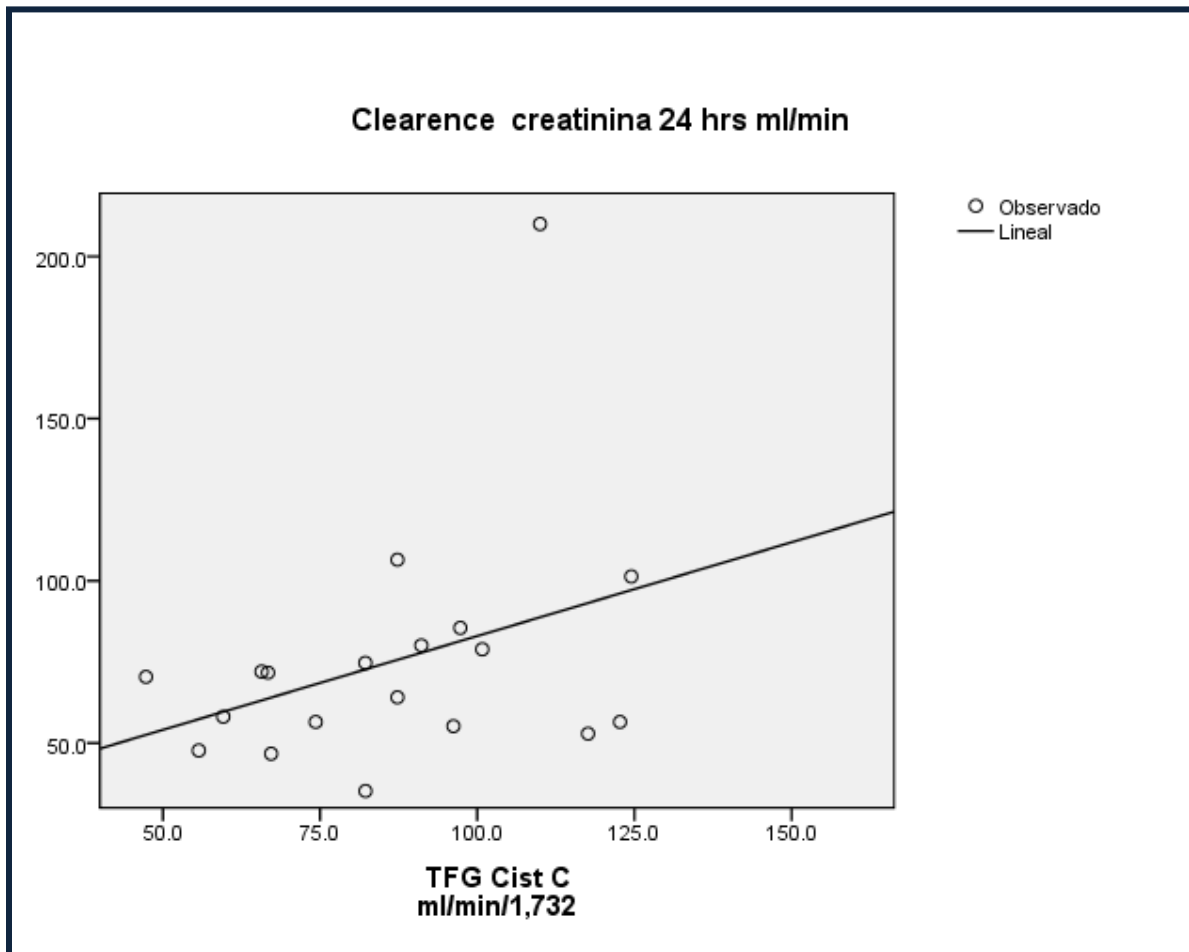
Curvas ROC de contraste entre de Cockcroft-Gault y Tasa de Filtrado Glomerular Cistatina C



Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b
.544	.047	.880
.737	.041	.416

Gráfico 3

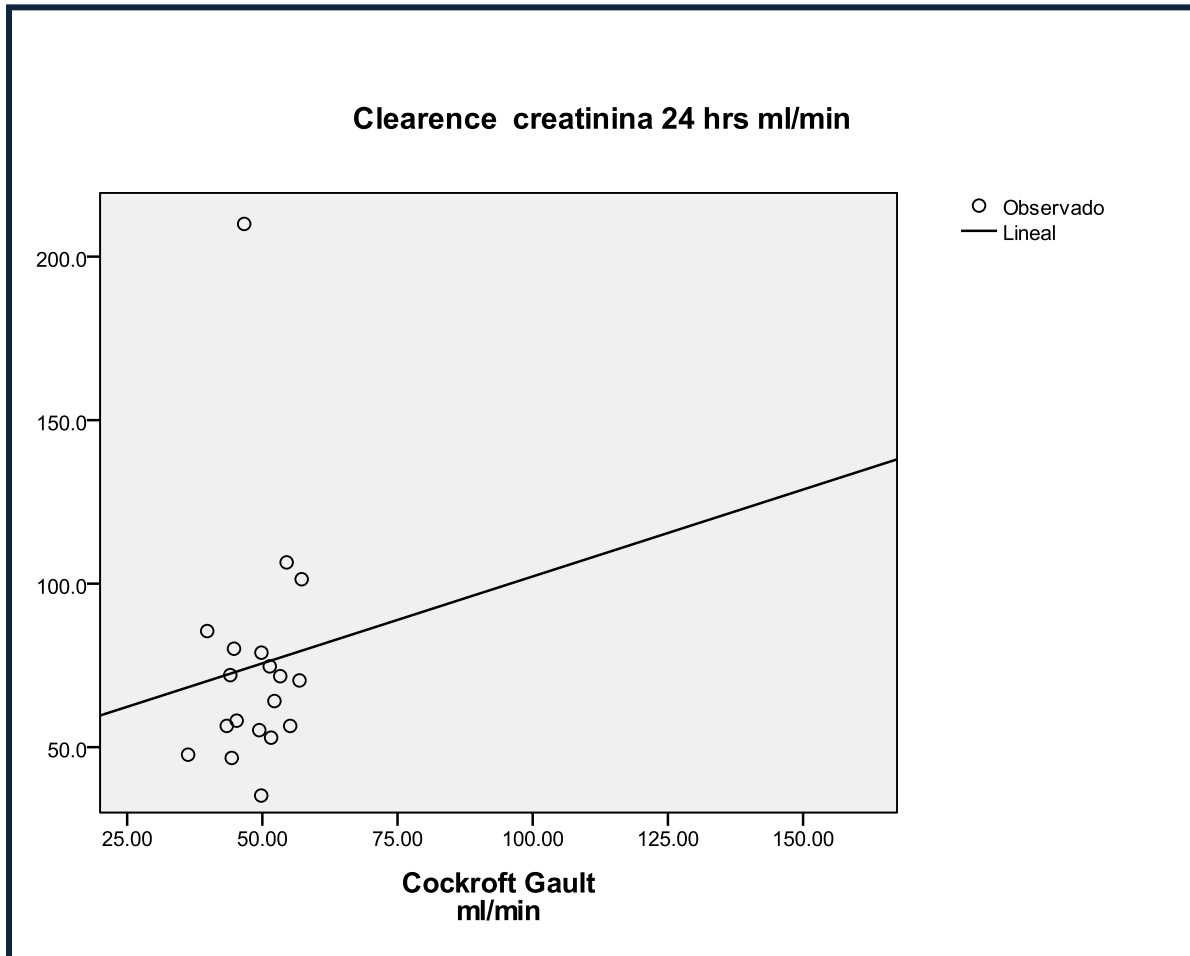
Relación entre la Tasa de Filtrado Glomerular Cistatina C y
Aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas



Clearance creatinina 24 hrs ml/min	TFG Cistatina C ml/min/1,732
74,951	86,091
37,4195	22,7315
p	0,14

Gráfico 4

Relación entre la Tasa de Filtrado Glomerular Cockcroft-Gault y
Aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas



R = 0,82

p = 0,738

Discusión

El deterioro renal en su etapa inicial cursa de manera asintomática, por lo que su detección representa un gran reto para los médicos. La tasa de filtrado glomerular es mundialmente utilizado como el parámetro de valoración de función renal en la población de riesgo, como en el caso de los pacientes diabéticos, sin embargo en la actualidad ésta se estima utilizando niveles de creatinina sérica, la cual se ve afectada por algunas variables y es insensible a pequeñas disminuciones del filtrado glomerular, alterándose recién cuando la filtración glomerular desciende al 50% su valor normal.^{17, 18, 19}

Esta limitación hace de gran necesidad buscar marcadores más sensibles como la cistatina C, que según evidencia de estudios recientes supera a la creatinina sérica en este ámbito.

Este estudio mostró una variabilidad pequeña entre los géneros para la determinación de cistatina C que no resultó significativa, por lo que concluimos que la prueba no es dependiente del género.

En cuanto a la edad, se observó niveles mayores de cistatina C a partir de los 40 años, correlacionándose a lo descrito en la literatura, mostrando los valores más elevados en sujetos mayores de 70 años por la disminución fisiológica de la función renal. A pesar de ello, la cistatina C no es una prueba cuyo valor sea dependiente de la edad.

En cuanto a los niveles de creatinina sérica, éstos mostraron similitud en todas las edades, aumentando levemente en pacientes entre 70 y 80 años y una ligera disminución en los pacientes mayores de 80 años con una media mayor en el sexo masculino. Esto corrobora lo descrito en otros estudios, que mencionan que la creatinina sérica varía de acuerdo a la edad, género y masa muscular, y no es una prueba sensible para detectar pequeñas disminuciones de la tasa de filtrado glomerular en pacientes asintomáticos.^{20, 21}

Estudios sugieren que la concentración sérica de cistatina C tiene buena correlación con el aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas, método que está sujeto a las imprecisiones de la técnica de recolección y diversas interferencias analíticas, lo que ha precipitado la realización de diversas investigaciones en los

últimos años valorando este nuevo marcador renal, sin embargo, en este estudio dichos valores no presentaron una correlación significativa.^{22, 23}

Respecto a trabajos con pacientes diabéticos, la mayoría diabéticos tipo 2, los estudios son controvertidos. Entre otros Mussap y cols. comentan la mayor especificidad de la cistatina C en la evaluación de la función renal, resaltando la falta de precisión de los marcadores tradicionales en la detección de cambios tempranos del filtrado glomerular y en la monitorización del curso de la nefropatía diabética, en esta investigación se presentaron valores de especificidad para cistatina C de 61%, mientras que la creatinina presentó una especificidad de 85%, resultando más conveniente, lo que se puede apreciar claramente en la Curva ROC; sin embargo ninguna de las dos presentaron buena sensibilidad. (Gráfico 2).¹

Los resultados del presente estudio demuestran que, aunque libre de influencias por la edad, sexo, la tasa de filtrado glomerular con cistatina C presenta una gran dispersión en la correlación con el aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas. Este hecho, unido a la incertidumbre de los factores que influyen en su variabilidad, y el mayor coste de su determinación, hacen poco justificable su uso como estimador del filtrado glomerular, contrastando con lo expuesto por Murray que indica que la monitorización de los valores de cistatina C en pacientes de riesgo podría anticiparse en uno o 2 días a la creatinina en el diagnóstico de fracaso renal agudo y frenar su progresión.^{8, 16}

Las limitaciones que presenta nuestro estudio son el uso de IECAs de nuestros pacientes, ya que existen trabajos que mencionan que estos fármacos producen alteración de los niveles de cistatina C en pacientes. Lamentablemente nuestra población de estudio fueron pacientes diabéticos; de los cuales algunos de ellos tomaban algún fármaco de este grupo, como las guías clínicas de la diabetes lo refieren, además muchos de ellos eran hipertensos y en nuestro medio el uso de Enalapril, por su bajo costo, está entre los medicamentos de elección para esta patología, no tanto así en otros países donde se realizaron estudios con cistatina C en diabéticos que recibían otra clase de antihipertensivos; por lo tanto, concluimos que se debe realizar estudios con una mayor muestra y tomar en consideración el uso de fármacos IECAs y la

influencia de éstos en la valoración de la tasa de filtrado glomerular con la cistatina C, otra limitación importante de nuestro estudio fue el tiempo en el que se realizó ya que lo ideal sería realizar un seguimiento de nuestros pacientes, con determinaciones seriadas de cistatina C sérica, y así valorar adecuadamente su comportamiento cuando empieza a declinar la función renal.

Bibliografia

1. Mussap M, Dalla Vestra M, Fioretto P, Saller A, Varagnola M, Nosadini R, Plebani M. Cystatin C is more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients, *Kidney Int*, 2002; 61: 1453 – 1461.
2. Roos J, Doust J, Tett S, Kirkpatrick C; Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children-A meta-analysis; *Clinical Biochemistry* 40; 383-391, 2007.
3. Bruce A. Perkins, Robert G. Nelson, Betsy E.P. Ostrander, Kristina L. Blouch, Andrzej S. Krolewski, Bryan D. Myers, and James H. Warram; Detection of Renal Function Decline in Patients with Diabetes and Normal or Elevated GFR by Serial Measurements of Serum Cystatin C Concentration: Results of a 4-Year Follow-Up Study; *J Am Soc Nephrol* 16: 1404–1412, 2005.
4. Fricker M, Wiesli P, Brandle M, Schwegler B, Schmid C. Impact of thyroid function on serum cystatin C. *Kidney Int* 2003; 63: 1944-7.
5. Rodolfo L. Borgesa, Andréa H. Hirotaa, Beata M.R. Quintob, Arthur B. Ribeirob, Maria T. Zanellaa, Marcelo C. Batista; Is Cystatin C a Useful Marker in the Detection of Diabetic Kidney Disease? *Nephrology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil Nephron Clin Pract* 2010;114:c127-c134 (DOI: 10.1159/000254385)
6. Herget-Rosenthal S, Bökenkamp A, Hofmann W; How to estimate GFR – serum creatinine, serum cystatin C or equations?; *Clinical Biochemistry*, 40, 2007, 153-161.
7. R. A. Chudleigh & R. L. Ollerton & G. Dunseath & R. Peter & J. N. Harvey & S. Luzio & D. R. Owens. Use of cystatin C-based estimations of glomerular filtration rate in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* (2009) 52:1274–1278 DOI 10.1007/s00125-009-1379-7

8. Departments of Nephrology, Thoracic and Cardiovascular Surgery, and Endocrinology, University Hospital; Essen, Germany; and Institute for Medical Informatics, Biometry and Epidemiology, Medical School, University Duisburg-Essen, Germany. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int.* 2004;66:1115-22
9. F. J. Cepeda, E. Fernández, A. Pobes y L. M. Baños. Utilidad de la cistatina C en el ámbito hospitalario. Comparación con los distintos métodos de valoración renal. Servicio de Nefrología. Hospital de Cabueñes (SESPA). Gijón. *NEFROLOGÍA*. Volumen 27. Número 2. 2007
10. Neil V. McNamara, Roger Chen, Margaret R. Janu, Phillip Bwititi, George Car, ; Markus Seibel. Early renal failure detection by cystatin C in Type 2 diabetes mellitus: varying patterns of renal analyte expression. *Pathology* (April 2009) 41(3), pp. 269–275
11. Brad C. Astor, Andrew S. Levey, Lesley A. Stevens, Frederick Van Lente, Elizabeth Selvin, and Josef Coresh Method of Glomerular Filtration Rate Estimation Affects Prediction of Mortality Risk. *J Am Soc Nephrol* 20: 2214–2222, 2009. doi: 10.1681/ASN.2008090980
12. R. Font, M. Prats, C. Gutiérrez, A. Bardají, M. Lalana, J. Marsillach, J. Camps, A. Martínez Vea ¿Existe relación entre los niveles de cistatina C y el estado inflamatorio, el estrés oxidativo y otros factores de riesgo cardiovascular en pacientes no diabéticos con enfermedad renal crónica? *Nefrología* 2009;29(3):228-235.
13. Peter P. Reese and Harold I. Feldman More Evidence that Cystatin C Predicts Mortality Better than Creatinine. *J Am Soc Nephrol* 20: 2088–2090, 2009. doi: 10.1681/ASN.2009080832
14. Néstor Fontseré, Vicens Esteve, Ana Saurina, Mónica Pou, The Search for a New Marker of Renal Function in Older Patients with Chronic Kidney Disease Stages 3–4: Usefulness of Cystatin C-Based Equations *Nephron Clin Pract* 2009;112:c164–c170
15. John W. Graves, MD Diagnosis and Management of Chronic Kidney Disease *Mayo Clin Proc.* 2008;83(9):1064-1069

16. Murray PT, Le Gall JR, Dos Reis Miranda D, Pinsky MR, Testa C. Physiological end-points (efficacy) for acute renal failure. *Curr Opin Crit Care*. 2002;8:519-25.
17. National Kidney Foundation K/DOQI: Clinical Practise Guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 39: S1-200, 2002.
18. Harmoinen A, Lehtimäki T, Korpela M, Turjanmaa, Saha H: Diagnostic accuracies of plasma creatinine, cystatin C, and glomerular filtration rate calculated by the Cockcroft-Gault and Levey. *Clin Chem* 49; 7: 1223-1226, 2003.
19. Wasen E, Isohao R, Mattila K, Vahlberg T, Kivela S L, Irjala K: Serum cystatin C in the aged: relationships with health status. *Am J Kidney Dis* 42: 36-43, 2003.
20. Finney H, Newman DJ, Thakker H, Fell JM, Price CP. Reference ranges for plasma Cystatin C and Creatinine measurements in premature infants, neonates, and older children. *Arch Dis Child* 2000; 82: 71-74.
21. Martin S, Prevot A, Mosing D, Werner D, van Melle G, Guignard J-P. Glomerular filtration rate: Measure creatinine and height rather than Cystatin C. *Acta Paediatr* 2003; 92: 1052-1057.
22. Hoek FJ, Kemperman FA, Krediet RT: A comparison between cystatin C, plasma reatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant* 18 (10): 2024-31, 2003.
23. Jovanovic D, Krstivojevic P, Obradovic I, Durdevic V, Dukanovic L: Serum cystatin C and beta2-microglobulin as markers of glomerular filtration rate. *Ren Fail* 25 (1): 123-33, 2003.
24. Buysschaert M, Joudi I, Wallemacq P, Michel P. Hermans: Perfomance of serum Cystatin C versus serum Creatinine in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* Vol 16; 4: 1320- 1321, 2003.
25. Christensson AG, Grubb AO, Nilsson JA, Norrgren K, Sterner G, Sundkvist G: Serum cystatin C advantageous compared with serum creatinine in the detection of mild but not severe diabetic nephropathy. *J Intern Med* 256 (6): 510-8, 2004.