

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

TESIS DOCTORAL

**CERTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MASA DE LA
ISOENZIMA 2 DE LA CREATINA-QUINASA DEL MATERIAL DE
REFERENCIA BCR 608**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Bioquímica por
MARIBEL SÁNCHEZ MANRIQUE, Licenciada en Bioquímica.**

Maribel Sánchez Manrique
Bellaterra 22 de noviembre de 2000

FRANCISCO JAVIER GELLA TOMÁS, Doctor en Farmacia y Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona y FRANCESCA CANALIAS REVERTER, Doctora en Ciencias Químicas y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona.

CERTIFICAN: que la tesis “Certificación de la concentración de masa de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa del material de referencia BCR 608”, que presenta Maribel Sánchez Manrique para optar al grado de Doctora en Bioquímica y Biología molecular, ha estado realizado bajo su dirección en el laboratorio del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona y está en condiciones de ser leída.

Bellaterra, 22 de noviembre de 2000

Dr. F. Javier Gella Tomás

Dra. Francesca Canalias Reverter

Agradecer a mis familiares más allegados, amigos y compañeros el apoyo recibido durante este periodo, así como la inestimable ayuda y colaboración de: Francesca Canalias Reverter, Francisco Javier Gella Tomás, Alex Bota i Arqué y Marc Bruguera Vilalta.

A todos los que buscan unas palabras para encabezar un trabajo como el presente.

ÍNDICE

0. <u>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</u>	1
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA CREATINA-QUINASA.....	3
1.1.1 Isoenzimas y función de la creatina-quinasa.....	3
1.1.2. Localización tisular	4
1.1.3. Creatina-quinasa sérica: isoformas y formas de masa molar elevada	6
1.1.4. Características estructurales y moleculares de la creatina-quinasa.....	8
1.2. PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA DE LA ISOENZIMA 2 DE LA CREATINA-QUINASA.....	12
1.2.1. Electroforesis.....	12
1.2.2. Procedimientos inmunoquímicos.....	14
1.2.2.1. Inmunoinhibición.....	14
1.2.2.2. Inmunoanálisis.....	16
1.2.2.3. Inmuncromatografía	18
1.3. VALOR SEMIOLÓGICO DE LOS VALORES DE CONCENTRACIÓN DE LA CREATINA-QUINASA 2.....	21
1.3.1. La creatina-quinasa 2 en el infarto agudo de miocardio	21
1.3.1.1. El infarto agudo de miocardio.....	22
1.3.1.2. Seguimiento y diagnóstico del infarto agudo de miocardio	24
1.3.1.3. Seguimiento de la reperfusión coronaria	28
1.3.1.4. Estimación del área afectada	30
1.3.1.5. Valor pronóstico.....	30
1.3.2. Aumento de la creatina-quinasa 2 no asociado al infarto agudo de miocardio.....	31
1.4. MATERIALES DE REFERENCIA Y TRAZABILIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO.....	32
1.4.1. Procedimientos de medida.....	34
1.4.2. Trazabilidad	35
1.4.3. Materiales de referencia.....	38
1.4.3.1. Clasificación de los materiales de referencia.....	39
1.4.3.2. Requisitos de los materiales de referencia.....	41
1.4.3.3. Materiales de referencia certificados y organizaciones implicadas en su preparación.....	43

2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	47
2.1. PRODUCTOS, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	47
2.2. PURIFICACIÓN DE LA CREATINA-QUINASA 2 DE MIOCARDIO HUMANO..	50
2.2.1. Obtención del extracto crudo	50
2.2.2. Precipitación con etanol.....	50
2.2.3. Purificación mediante procedimientos cromatográficos	51
2.2.3.1. Cromatografía de intercambio aniónico.....	51
2.2.3.2. Cromatografía de afinidad.....	52
2.3. MEDICIÓN DE CONCENTRACIONES CATALÍTICAS	54
2.3.1. Creatina-quinasa total	54
2.3.2. Creatina-quinasa 2	55
2.3.3. Aspartato-aminotransferasa.....	56
2.3.4. Alanina-aminotransferasa.....	58
2.3.5. L-Lactato-deshidrogenasa	59
2.3.6. Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa.....	60
2.3.7. Hexoquinasa.....	61
2.4. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MASA.....	63
2.4.1. Enzoinmunoanálisis heterogéneos	63
2.4.1.1. IMx	63
2.4.1.2. Stratus.....	64
2.4.1.3. Immulite	65
2.4.1.4. Opus Plus	66
2.4.1.5. AxSYM.....	68
2.4.1.6. Dimension.....	68
2.4.2. Luminoimunoanálisis heterogéneos	69
2.4.2.1. Elecsys	69
2.4.2.2. ACS:180.....	70
2.5. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	72
2.5.1. Absorbancia a 280 nm	72
2.5.2. Método de Coomassie	72
2.5.3. Método de Doetsch.....	72
2.5.3.1. Preparación de las soluciones y las columnas.....	73
2.5.3.2. Procedimiento de medida.....	73
2.6. PROCEDIMIENTOS ELECTROFORÉTICOS	75
2.6.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	75
2.6.1.1. Medición de la masa molar	76
2.6.2. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes	77
2.6.3. Procedimientos de revelado.....	78
2.6.3.1. Tinción de Coomassie.....	78
2.6.3.2. Revelado de la actividad catalítica.....	78
2.6.3.3. Transferencia e identificación mediante anticuerpos específicos.....	79
2.6.4. Isoelectroenfoque	80
2.6.4.1. Medición del punto isoeléctrico.....	81
2.7 ESTUDIO DE LA CONMUTABILIDAD DE LA CREATINA-QUINASA 2 PURIFICADA.....	82
2.7.1. Obtención y conservación de los especímenes	82
2.7.2. Preparación de las matrices	82
2.7.2.1. Matriz sérica.....	82

2.7.2.2. Matriz plasmática	83
2.7.2.3. Matriz sintética.....	83
2.7.3. Tratamiento estadístico de los datos	84
2.8. ASIGNACIÓN DE UN VALOR DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL PROCEDIMIENTO DE DOESTCH.....	86
2.8.1 Preparación del calibrador y de la solución de la creatina-quinasa 2 purificada.....	86
2.8.2. Laboratorios participantes	87
2.8.3. Instrucciones proporcionadas a los participantes	87
2.8.3.1. Calibración de pipetas y especificaciones instrumentales	87
2.8.3.2. Reactivos y preparación de las soluciones.....	88
2.8.3.3. Procedimiento de medida.....	89
2.8.4. Cálculo de la concentración de proteína.....	89
2.9. ASIGNACIÓN DE UN VALOR DE CONCENTRACIÓN DE MASA AL MATERIAL DE REFERENCIA BCR 608.....	91
2.9.1. Preparación del patrón líquido.....	91
2.9.2. Laboratorios participantes	92
2.9.3. Instrucciones proporcionadas a los participantes	93
2.9.3.1. Calibración de pipetas	93
2.9.3.2. Calibración del analizador	93
2.9.3.3. Reactivos y controles	94
2.9.3.4. Patrón líquido y material de referencia	94
2.9.3.5. Procedimiento de medida.....	95
2.9.4. Cálculo de la concentración de masa.....	95
2.9.5. Cálculo de la incertidumbre.....	97

3. RESULTADOS.....	99
3.1. PURIFICACIÓN DE LA CREATINA-QUINASA 2	99
3.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA CREATINA-QUINASA 2 PURIFICADA Y ANÁLISIS DE PUREZA.....	102
3.2.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	102
3.2.2. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes	103
3.2.3. Transferencia e identificación mediante anticuerpos específicos	103
3.2.4. Isoelectroenfoque.....	104
3.2.5. Obtención de las isoenzimas 1 y 3 a partir de la isoenzima 2	106
3.2.6. Medición de enzimas contaminantes	108
3.3. COMPARACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE MASA DE LA CREATINA-QUINASA 2 Y ESTUDIOS DE CONMUTABILIDAD	109
3.3.1. Comparación de inmunoanálisis.....	109
3.3.2. Estudios de conmutabilidad: efecto de la matriz	112
3.3.2.1. Conmutabilidad de las matrices.....	112
3.3.2.1.1. Matriz sérica.....	112
3.3.2.1.2. Matriz sérica dializada.....	113
3.3.2.1.3. Matriz plasmática.....	114
3.3.2.1.4. Matriz plasmática dializada.....	115
3.3.2.1.5. Matriz sintética	116
3.3.2.2. Comparación entre las matrices dializadas y sin dializar.....	117
3.3.2.3. Comparación entre las matrices sérica y plasmática dializadas y sin dializar.....	118
3.3.3. Conmutabilidad del material de referencia BCR 608	119
3.4. ASIGNACIÓN DE UN VALOR DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL PROCEDIMIENTO DE DOETSCH.....	121
3.4.1. Estudio de algunas características metrológicas del procedimiento de Doetsch.....	121
3.4.2. Medición de la concentración de proteína de una solución de albúmina ..	122
3.4.3. Medición de la concentración de proteína de una solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada.....	124
3.5. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MASA DEL MATERIAL DE REFERENCIA BCR 608	128
3.5.1. Medición de la concentración de masa utilizando los calibradores proporcionados por el fabricante	128
3.5.2. Medición de la concentración de masa mediante el patrón líquido	132
3.6. ASIGNACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE AL VALOR DE CONCENTRACIÓN DE MASA DEL MATERIAL DE REFERENCIA BCR 608	136
3.6.1. Dilución del SRM 927b.....	136
3.6.2. Asignación de un valor de concentración de proteína a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada.....	137
3.6.3. Preparación del patrón líquido.....	138
3.6.4. Asignación de un valor de concentración de masa al BCR 608.....	139
3.7. VALOR CERTIFICADO DEL MATERIAL DE REFERENCIA	141

4. <u>DISCUSIÓN</u>	143
4.1 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA CREATINA- QUINASA 2	143
4.2. COMPARACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE MASA DE LA CREATINA-QUINASA 2 Y ESTUDIOS DE CONMUTABILIDAD	145
4.2.1. Comparación de inmunoanálisis.....	145
4.2.2. Estudio de conmutabilidad: efecto de la matriz	146
4.2.3. Conmutabilidad del material de referencia BCR 608	148
4.3. CERTIFICACIÓN DE UN VALOR DE CONCENTRACIÓN DE MASA AL MATERIAL DE REFERENCIA BCR 608.....	150
4.3.1. Asignación de un valor de concentración de proteína por el procedi- miento de Doetsch.....	150
4.3.2. Medición de la concentración de masa del material de referencia BCR 608.....	152
4.3.3. Asignación de la incertidumbre asociada al valor de concentración de masa del material de referencia BCR 608	153
4.3.4. Valor certificado del material de referencia	153
4.4. UTILIDAD DEL MATERIAL DE REFERENCIA.....	155
5. <u>CONCLUSIONES</u>	157
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	159

ANEXO

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La isoenzima 2 de la creatina-quinasa cataliza la fosforilación reversible de la creatina por ATP. Principalmente se encuentra en el músculo cardiaco. Debido a su especificidad de órgano, y al desarrollo en los últimos años de distintos procedimientos de medida que permiten su cuantificación con una calidad analítica adecuada, ha sido hasta la fecha el marcador cardiaco por excelencia para el seguimiento y el diagnóstico del infarto agudo de miocardio.

En la actualidad existen un gran número de procedimientos de medida que permiten su medición, ya sea en concentración catalítica o en concentración de masa. Los procedimientos que miden concentración de masa se basan en el inmunoanálisis, es decir, en la interacción que se produce entre la creatina-quinasa 2 y anticuerpos específicos que reconocen determinados epítomos de la isoenzima. Son procedimientos con una elevada sensibilidad y especificidad analítica, sin embargo, existe una gran divergencia entre los resultados que proporcionan distintos inmunoanálisis, de ahí la necesidad de normalizar esta situación, que provoca desconfianza y confusión al clínico.

Actualmente existe un material de referencia con una concentración catalítica de creatina-quinasa 2 certificada, el BCR 608. El material de referencia se preparó a partir de creatina-quinasa 2 humana. Debido a la necesidad de un material de referencia con un valor de concentración de masa de creatina-quinasa 2, que permitiese valorar la fiabilidad analítica de los inmunoanálisis y que armonizase los resultados obtenidos en distintos laboratorios, se planteó la certificación de la concentración de masa de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa del BCR 608. No obstante, la certificación de este valor presentaba un gran inconveniente, la carencia de un procedimiento de medida de referencia basado en el inmunoanálisis.

Así pues, el objetivo del presente trabajo fue la certificación de un valor de concentración de masa de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa del material de referencia BCR 608. Por consiguiente, se desarrolló el presente trabajo en las siguientes etapas:

1. Purificación de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa a partir de tejido cardíaco humano.
2. Caracterización de la creatina-quinasa 2 purificada y análisis de su pureza, mediante el estudio de sus características moleculares y antigénicas (comparándolas con las descritas en la bibliografía), y el estudio del grado de pureza valorando la ausencia de posibles enzimas contaminantes.

3. Comparación de procedimientos de medida de la creatina-quinasa 2 basados en el inmunoanálisis.
4. Estudio de la conmutabilidad de la creatina-quinasa 2 en diversas matrices de origen humano y sintético, a la vez que se determinó la conmutabilidad de la creatina-quinasa 2 del material de referencia BCR 608.
5. Certificación de la concentración de masa de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa del material de referencia BCR 608.

Este trabajo ha sido financiado por el programa de "Standards, Measurements and Testing" (SMT) de la Unión Europea, cuyo objetivo es la preparación de materiales de referencia.

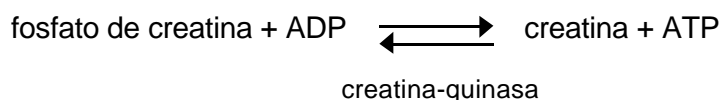
INTRODUCCIÓN

1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA CREATINA-QUINASA

1.1.1 Isoenzimas y función de la creatina-quinasa

La creatina-quinasa, ATP:creatina-*N*-fosfotransferasa (EC 2.7.3.2) es una enzima de la familia de las guanidino-fosfotransferasas (Webb y cols., 1997) clave en el metabolismo energético celular, que comprende varias isoenzimas distribuidas en tejidos donde se produce o se gasta energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP). Aunque la concentración intracelular de ATP es muy baja, la creatina-quinasa genera de forma continuada ATP a partir del fosfato de creatina en aquellos tejidos en los que existe una elevada y variable demanda energética (Walliman y cols., 1992). Además de proporcionar ATP, evita la inactivación de las ATPasas celulares por concentraciones elevadas de ADP, actúa como un transportador energético gracias a la compartimentación subcelular de sus isoenzimas, y contribuye a evitar la acidificación de la célula como consecuencia de la hidrólisis del ATP. La creatina-quinasa proporciona la energía necesaria para la motilidad de algunas células, como los espermatozoides. También interviene en la fosforilación oxidativa que tiene lugar en las mitocondrias del músculo esquelético, del corazón y del cerebro, transportando energía desde las mitocondrias al citoplasma celular.

La creatina-quinasa cataliza la transferencia reversible del fosfato entre el ATP y la creatina. El sentido de la reacción es dependiente del pH. A pH 9,0 la reacción está desplazada hacia la fosforilación de la creatina, y a pH 6,7 hacia la formación de ATP. Como todas las quinasas, requiere de la presencia de iones Mg^{2+} para formar complejos con el ATP y el ADP. Sin embargo, otros iones metálicos como el Mn^{2+} , el Ca^{2+} , el Zn^{2+} y el Cu^{2+} inhiben la actividad enzimática.



La creatina-quinasa es un dímero formado por la combinación de dos subunidades, la subunidad B ("brain") y la subunidad M ("muscle"), de masa molar 44.500 y 43.000 g/mol, respectivamente (Perryman y cols., 1983). La subunidad B es producto de un *loci* situado en el cromosoma 14, y la M de un *loci* situado en el cromosoma 19 (Moss y Henderson, 1994). De la combinación de estas dos subunidades se obtienen tres isoenzimas citoplasmáticas: la isoenzima 1 (CK-1), formada por dos subunidades B, la isoenzima 2 (CK-2), formada por una subunidad M y otra B, y la isoenzima 3 (CK-3), formada por dos subunidades M. Se denominan así

según su movilidad electroforética hacia el ánodo de acuerdo con la recomendación de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC). La subunidad B está menos conservada que la M durante la evolución, pero conserva tanto la secuencia responsable de la interacción entre subunidades, como la de la actividad enzimática (Perryman y cols., 1983). La interacción entre las subunidades es fuerte, pero se puede conseguir su disociación reversible mediante agentes caotrópicos, como la urea y el cloruro de guanidina (Dawson y cols., 1967), concentraciones elevadas de cloruro de sodio y cloruro de litio (Couthon y cols., 1997), y mediante procesos repetidos de congelación y descongelación (Perryman y cols., 1983). Durante la diferenciación muscular se ha observado, *in vitro* e *in vivo*, la transición de la creatina-quinasa 1 a la 2, y de la creatina-quinasa 2 a la 3, siendo esta última la mayoritaria en las células musculares diferenciadas (Tras y col., 1988). Las isoenzimas de la creatina-quinasa se encuentran en el citosol de las células o asociadas con estructuras miofibrilares. La isoenzima 3 interacciona específicamente con la banda M del sarcómero miofibrilar por el extremo C-terminal de la subunidad M, donde refosforila el ADP generado por la ATPasa activadora de miosina (Eppenberger, 1994).

Existe una cuarta isoenzima de localización mitocondrial (CK-Mi) que difiere de las otras tres en cuanto a su movilidad electroforética y características antigénicas. Está formada por dos subunidades idénticas, y puede formar dímeros u octámeros con una masa molar de 86.000 y 34.0000 g/mol respectivamente (Couthon y cols., 1997). En el músculo estriado coexisten dos isoformas distintas, la “sarcomérica” y la “ubicua”, que difieren en su punto isoeléctrico. Ambas se encuentran en el espacio intermembrana mitocondrial (Wyss y cols., 1992).

1.1.2. Localización tisular

Se han realizado un gran número de estudios para determinar la distribución y la concentración tisular de las distintas isoenzimas de la creatina-quinasa.

La creatina-quinasa se encuentra principalmente en el músculo esquelético, en el músculo cardíaco y en el cerebro (Tabla 1.1.).

La isoenzima 1 se encuentra en la mayoría de los tejidos (Urdal y cols., 1983), pero se ha observado mediante experimentos de inmunohistoquímica que su expresión está restringida únicamente a un tipo celular en cada tejido. En cerebro la creatina-quinasa 1 se encuentra sólo en neuronas, en el estómago en las células

parietales, en el intestino en los enterocitos y en el sistema urogenital en las células epiteliales (Sisternans y cols., 1995).

Tejido	Concentración creatina-quinasa (U/g)	Isoenzima 3 (%)	Isoenzima 2 (%)	Isoenzima 1 (%)
Músculo esquelético	2.500	98,9	1,1	0,06
Cerebro	555	0	2,7	97,3
Músculo cardíaco	473	78,7	20,0	1,3
Recto	267	1,2	0	98,8
Estómago	190	4,3 (10)	0 (0)	95,7 (90)
Utero	115	2,3 (5-16)	0 (2-20)	97,4 (64-93)
Prostata	114	6 (34-39)	0 (2-6)	94 (59-60)
Intestino delgado	112	1,2 (11-13)	0 (7-9)	98,8 (78-80)
Riñón	32	2,8 (8-12)	0 (0)	97,2 (88-92)
Higado	0,6	0	0	100

Tabla 1.1: *Distribución de las isoenzimas de la creatina-quinasa en los diferentes tejidos humanos (Moss y Henderson, 1994).*

La isoenzima 3 se encuentra mayoritariamente en el músculo esquelético y en el músculo cardíaco, con concentraciones relativas a la concentración total de la creatina-quinasa superiores al 99% y al 70%, respectivamente (Apple, 1998).

La isoenzima 2 es la más específica de órgano. Tanto en humanos como en animales se encuentra mayoritariamente en el músculo cardíaco. También se encuentra en el músculo esquelético pero en concentraciones muy pequeñas.

Estudios realizados con corazones de pacientes fallecidos como consecuencia de un infarto agudo de miocardio han puesto de manifiesto que la concentración relativa de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa puede oscilar entre un 10-30%. Sin embargo, Ingwall y cols. demostraron mediante estudios histopatológicos, que en el músculo cardíaco de una persona sana la proporción de creatina-quinasa 2 era inferior a un 2% (Ingwall y cols., 1985). Además, también se ha descrito que el porcentaje de la isoenzima 2 en corazones de pacientes con una enfermedad crónica coronaria es superior al 20% (Voss y cols., 1995). Ensayos con corazones de cerdos post-infartados (Hoang y cols., 1997) y tejidos miocárdicos de perros que han sufrido un proceso isquémico (Mehta y cols., 1987), parecen indicar que tras el daño tisular se

produce un aumento de la expresión de la subunidad B y, por consiguiente, un aumento de la concentración de la creatina-quinasa 2.

Las alteraciones dinámicas de la concentración tisular de la creatina-quinasa 2 también han sido estudiadas en el músculo esquelético, concretamente en alteraciones como la distrofia muscular de Duchene y la insuficiencia renal crónica, y en corredores de maratón. Su concentración en pacientes que padecen distrofia muscular de Duchene es superior al 10% de la concentración total. También se observa un aumento de la concentración catalítica de dicha isoenzima, del 5,3% al 10,5%, en personas que han sido sometidas a un esfuerzo físico continuado (Apple, 1999).

1.1.3. Creatina-quinasa sérica: isoformas y formas de masa molar elevada

La concentración sérica de la creatina-quinasa y de sus isoenzimas es un reflejo de la concentración tisular y de la relación entre su liberación y su eliminación. Teniendo en cuenta que la masa muscular esquelética es 100 veces mayor que la cardíaca, y que la concentración catalítica de la creatina-quinasa es 5 veces mayor en el músculo esquelético, es de esperar que la isoenzima mayoritaria en el suero de pacientes presuntamente sanos sea la creatina-quinasa 3. El 97% de la concentración catalítica sérica de la creatina-quinasa se debe a la isoenzima 3 y el resto a la isoenzima 2. Otros órganos no contribuyen significativamente, ya sea por su baja concentración catalítica, o por su insuficiente masa (Jones y cols., 1990).

Además de las isoenzimas, en el suero se han descrito otras variantes denominadas isoformas. En los años 60, Sjovall y Voight (1964) y Kumadavalli y Watts (1968), observaron que la creatina-quinasa 3 humana se podía separar electroforéticamente en tres bandas que conservaban su actividad. Smith (1972) analizó el plasma de pacientes que habían sufrido un infarto agudo de miocardio mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, y observaron la separación de la isoenzima 3 en tres bandas, y de la isoenzima 2 en dos. Más adelante, Wevers y cols. (1977), confirmaron las observaciones de Smith, y observaron que el porcentaje de actividad de las subbandas aumentaba hacia la más anódica a medida que transcurría el tiempo desde el primer síntoma del infarto.

Estas bandas se denominaron isoformas de la isoenzima 2 y 3. Wevers y cols. (1977) propusieron la existencia de dos isoformas de la subunidad M: M1 y M2, y que la subunidad M2 se transformaba en la M1 mediante la intervención de una sustancia

termolábil presente en el suero humano. La naturaleza de la molécula responsable de la modificación permaneció desconocida hasta que George y cols. (1984) y Edwards y cols. (1984), simultánea e independientemente, demostraron que la conversión se inhibía por completo mediante un inhibidor específico de la carboxipeptidasa N.

Perryman y cols. (1984), describieron el mecanismo molecular mediante el que se producía la conversión de la isoenzima 3 (CK₃) en el suero humano: la carboxipeptidasa N hidrolizaba un residuo de lisina del extremo C-terminal de una de las dos subunidades M, y a continuación hidrolizaba el correspondiente a la otra subunidad, dando lugar a las isoformas 2 (CK₂) y 1 (CK₁), respectivamente.

Con relación a la isoenzima 2, se conoce que la isoforma tisular (CK₂) tiene un residuo de lisina en el extremo C-terminal de cada una de las dos subunidades (M y B). Aunque teóricamente podrían existir cuatro isoformas, mediante separación electroforética sólo se han conseguido detectar dos. Utilizando técnicas cromatográficas y anticuerpos monoclonales específicos contra la lisina C-terminal de la subunidad M, se han descrito tres isoformas posibles en el suero humano: la isoforma tisular, una isoforma que sólo conserva un residuo de lisina en la subunidad M, y otra isoforma carente de lisina en ambas subunidades. La razón por la cual mediante electroforesis sólo se consiguen separar dos se debe a la comigración de la forma tisular y la isoforma que aún conserva una lisina en la subunidad M (CK₂) (Adams y cols., 1993).

En la Figura 1.1. se muestra un esquema donde se describe el proceso mediante el que se originan las isoformas de la creatina-quinasa 3 y la 2.

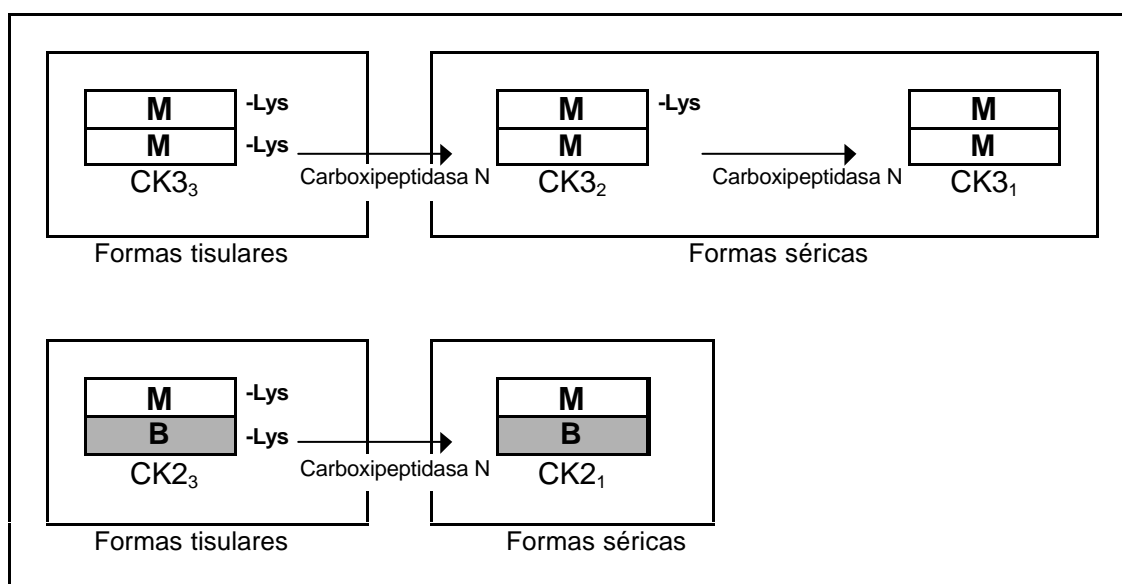


Figura 1.1: Formación de las isoformas de la creatina-quinasa 3 y la 2 en suero.

En el suero también se han descrito dos formas atípicas de masa molar elevada de la creatina-quinasa: la creatina-quinasa “macro” tipo 1, formada por inmunoglobulinas unidas a las isoenzimas 1 y 3, y cuya presencia no presenta significado clínico alguno (Bohner y cols., 1982), y la creatina-quinasa “macro” tipo 2, que es una forma oligomérica de la isoenzima mitocondrial, que aparece en sangre tras lesiones graves de las células hepáticas o cardíacas, y también en pacientes con carcinomas que han sufrido metástasis, especialmente de carácter hepático (Steins y cols., 1985).

La unión entre la creatina-quinasa y las inmunoglobulinas es de carácter reversible. Al parecer esta unión es específica, de manera que las inmunoglobulinas se unen con mayor afinidad a aquellas enzimas que son catalíticamente activas. La relación estequiométrica entre la enzima y las inmunoglobulinas es 2:1. Estos complejos provocan una disminución del 80% de su actividad catalítica, y muestran una estabilidad térmica superior (Stein y cols., 1983). Estas variantes de masa molar elevada a menudo pueden invalidar alguno de los procedimientos descritos para la medición de la creatina-quinasa 2.

En cuanto a su movilidad electroforética, la creatina-quinasa “macro” tipo 1 migra entre la isoenzima 3 y 2, y la creatina-quinasa “macro” tipo 2 se visualiza próxima al cátodo. En la Figura 1.2., se puede observar el patrón electroforético de las isoenzimas, isoformas y formas de masa molar elevada de la creatina-quinasa en suero.

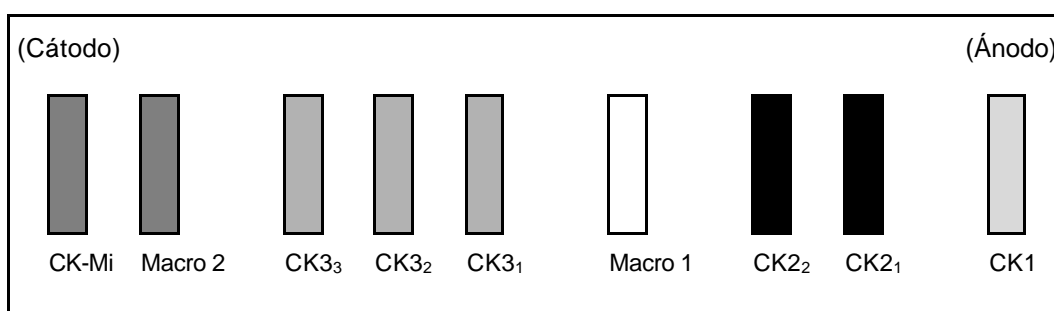


Figura 1.2: Patrón electroforético de las isoenzimas, isoformas y formas de masa molar elevada de la creatina-quinasa en suero.

1.1.4. Características estructurales y moleculares de la creatina-quinasa

La creatina-quinasa tiene una estructura compleja. Mediante la utilización de distintas técnicas experimentales se ha conseguido conocer con gran detalle su estructura tridimensional, así como los mecanismos involucrados en la reacción reversible catalizada por la enzima. En las Figuras 1.3. y 1.4. se pueden ver

detalladamente las estructuras tridimensionales de la creatina-quinasa 1 y de la subunidad M respectivamente.

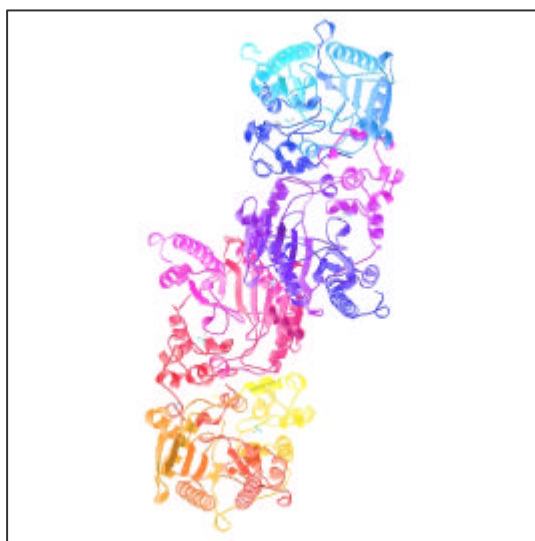


Figura 1.3: Estructura tridimensional de la creatina-quinasa 1.

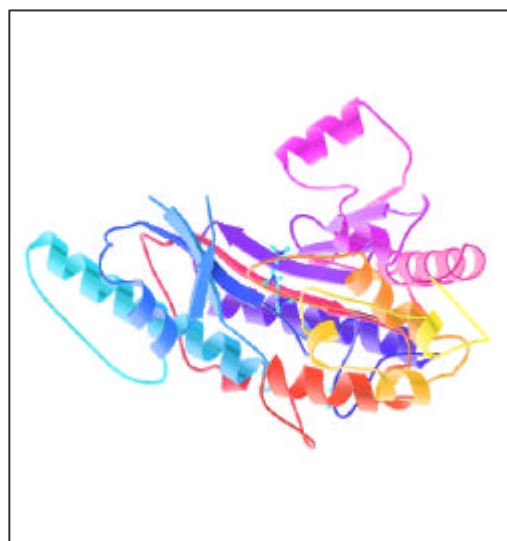


Figura 1.4: Estructura tridimensional de la subunidad M.

Las subunidades de la creatina-quinasa están formadas por dos dominios de distinto tamaño, un dominio pequeño de 112 aminoácidos (dominio I) y otro mayor de 267 aminoácidos (dominio II). El lugar de unión de los sustratos está localizado en una hendidura situada entre los dos dominios. En la Figura 1.5. se muestra un esquema de la estructura secundaria común a las distintas subunidades de la creatina-quinasa.

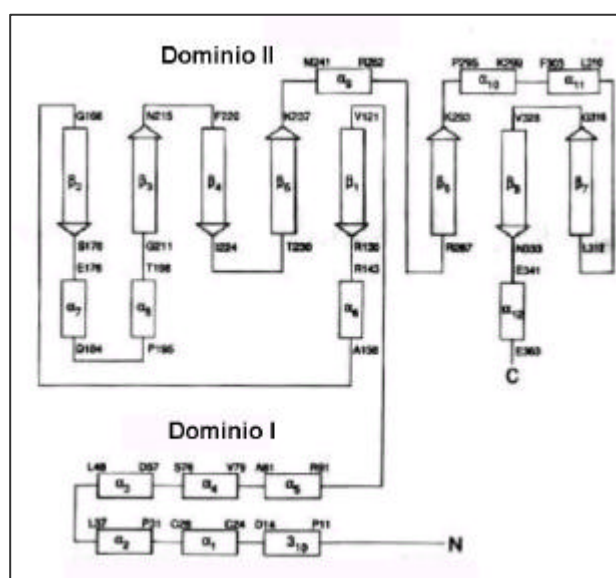


Figura 1.5: Estructura secundaria monomérica de la creatina-quinasa

La creatina-quinasa contiene seis regiones altamente conservadas formando parte de un núcleo compacto común implicado en la unión de los sustratos y su posterior catálisis, el resto de regiones son específicas de cada isoenzima. Estas están involucradas en funciones concretas, como pueden ser, en el caso de la creatina-quinasa mitocondrial, la formación del octámero o la unión de esta a la membrana mitocondrial (Fritz-Wolf y col., 1996).

Una característica común a todas las quinasas es que el agua debe excluirse del centro activo durante el estado de transición para evitar la hidrólisis de los compuestos fosfato. De manera que la unión de los sustratos induce un movimiento de los dominios relativos hacia ellos, provocando la exclusión del agua de la hendidura donde tiene lugar la unión y la catálisis (Wyss y cols., 1993).

Cada una de las subunidades posee un centro activo, pero la posibilidad de que la enzima sea estable en un estado monomérico no está muy clara. Por un lado los resultados que se han obtenido con la enzima inmovilizada parecen señalar que las subunidades tienen actividad catalítica independientemente de su asociación. En cambio, el ordenamiento asimétrico de las subunidades parece indicar que es activa siempre y cuando se encuentre en un estado dimérico (Wang y cols., 1990).

La estabilidad catalítica de la creatina-quinasa depende en gran parte de que un residuo de cisteína localizado en cada uno de los centros activos no se oxide (Nealon y cols., 1977), lo que ocurre de forma espontánea. Para evitar la oxidación se han estudiado los efectos de protectores, concretamente de agentes reductores como el glutatión, la N-acetilcisteína y el 2-mercaptoetanol. La presencia de estos compuestos minimiza las pérdidas de actividad. Cabe destacar que su papel protector se modifica en función de la temperatura y de la matriz donde se encuentra la enzima (Nealon y cols., 1977). La función que desempeña la cisteína no está muy clara. Mediante experimentos de mutagénesis dirigida se ha observado que aunque este residuo no es esencial para la unión de los sustratos o para la catálisis, si que es requerido para la unión sinérgica de estos y, gracias al aporte de su carga negativa, para alcanzar la actividad máxima de la enzima (Furter y cols., 1993).

Se conoce la existencia de varios residuos de histidina (His 61, His 92, His 186) localizados en el centro activo de la enzima y altamente conservados en la familia de las creatina-quinasas. La His 92 está situada muy cerca del lugar de unión del γ -fosfato del ATP. La His 186 es de vital importancia para que se produzca la unión del fosfato de creatina, y la His 61 estaría involucrada en la catálisis, concretamente en la transfosforilación de la creatina por ATP. Se ha postulado que este residuo podría

hallarse en un lazo flexible de la enzima permitiendo su participación directa en la catálisis (Forstner y cols., 1997).

Con el objetivo de poner en práctica un procedimiento de medida que sea capaz de determinar separadamente las isoenzimas y, concretamente, las concentraciones séricas de la isoenzima 2, se han estudiado las diferencias existentes entre las isoenzimas 3 y 2, puesto que son las mayoritarias en el suero humano. La diferencia más destacable entre ambas es que la creatina-quinasa 2 tiene mayor afinidad por el fosfato de creatina y el ADP que la creatina-quinasa 3. Esta afinidad varía en función del pH, la diferencia mayor se ha encontrado a pH 7,5 (Wong y cols., 1976).

Otra característica molecular destacable es la glicosilación de la proteína. En el músculo esquelético y en el cardíaco parte de la creatina-quinasa se halla glicosilada con manosa, galactosa y N-acetilgalactosamina (Langlois y cols., 1992). Las formas glicosiladas se asocian a una mayor energía de activación y a una pérdida de su termoestabilidad. También se ha detectado la presencia de residuos terminales de ácido siálico y sulfato que contribuyen a la estabilización de las formas glicosiladas. Las moléculas glicosiladas con galactosa como terminal son más vulnerables a la acción de enzimas proteolíticas y otros agentes agresivos, de ahí a que se atribuya a este mecanismo la pérdida de actividad de la enzima durante su liberación al torrente circulatorio

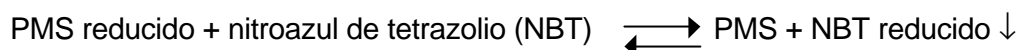
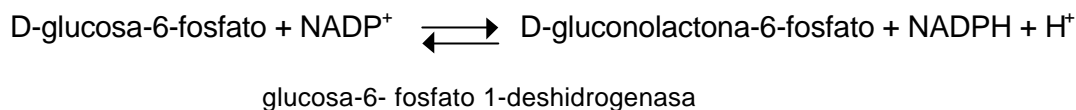
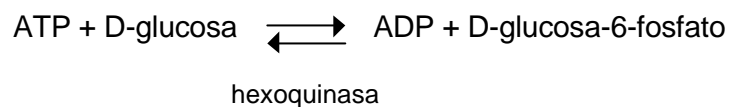
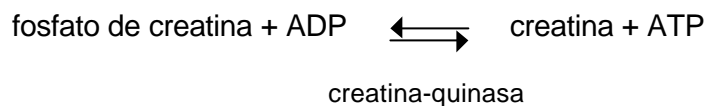
1.2. PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA DE LA ISOENZIMA 2 DE LA CREATINA-QUINASA

Los procedimientos de medida de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa se pueden dividir en tres categorías distintas: (1) electroforesis, (2) cromatografía de intercambio iónico e (3) inmunoquímicos, dentro de los cuales se encuentran la inmunoinhibición, la inmunoprecipitación, el inmunoanálisis y la inmunocromatografía. Sin embargo, los procedimientos de medida más utilizados actualmente para detectar o cuantificar la isoenzima 2 en los especímenes humanos, ya sea en concentración catalítica o de masa, son los inmunoquímicos.

1.2.1. Electroforesis

La electroforesis es el único procedimiento de medida existente que permite visualizar las isoenzimas y las formas atípicas de masa molar elevada de la creatina-quinasa.

Las principales diferencias entre los procedimientos electroforéticos descritos radican en el tipo de soporte utilizado y en el sistema de revelado y cuantificación de las bandas. La separación electroforética puede llevarse a cabo utilizando como soporte acetato de celulosa, poliacrilamida o agarosa (Trainer y Gruening, 1968; Smith, 1972; Wolf, 1974). Cabe destacar que la difusión de las bandas, una vez realizado el revelado, es menor en el acetato de celulosa que en la agarosa, sin embargo, la agarosa permite una mayor resolución. La visualización de las isoenzimas, una vez finalizado el recorrido electroforético, se efectúa mediante una reacción específica sobre el soporte utilizado, pudiendo cuantificarse por espectrometría de fluorescencia o de absorción en fase sólida. El primero se basa en la visualización de las bandas fluorescente del NADPH (Somer y cols., 1972), y el segundo introduce una reacción de óxido-reducción entre el NADPH y una sal de tetrazolio que, en presencia de metosulfato de fenacina, origina un formazán insoluble coloreado. Para ello se utilizan distintas sales, siendo una de las más comunes el nitroazul de tetrazolio, que al reaccionar con el NADPH origina un formazán color púrpura (Henrich y cols., 1981).



Aunque el primer sistema basado en la reacción fluorométrica es el recomendado por su mayor sensibilidad (Maire y cols., 1986), presenta dos tipos de interferencias: la primera debida a la adenilato-quinasa (EC 2.7.4.3) que puede dar una banda de migración más catódica respecto a la creatina-quinasa 3, pudiendo ser confundida con la creatina-quinasa “macro” tipo 2 (Lee y cols., 1994), y la segunda debido a la albúmina (Schwertner y Hawthorne, 1980), que unida a componentes de naturaleza fluorescente que se hallan en el suero (bilirrubina, benzodiacipina, antidepresivos, etc.), puede manifestarse como una banda fluorescente localizada entre la creatina-quinasa 2 y la creatina-quinasa 1 (Chuga, 1979). Por estos motivos es recomendable realizar un blanco de muestra mediante un revelado con un reactivo enzimático que carezca de fosfato de creatina (Kanemitsu, 1988).

La electroforesis presenta diversos inconvenientes: una sensibilidad analítica baja, un límite de detección que oscila entre 0,10 y 0,16 $\mu\text{kat/L}$, y una imprecisión elevada (coeficiente de variación superior al 10%). También presenta una aplicabilidad difícil en un laboratorio de urgencias, ya que es un procedimiento largo, laborioso y relativamente caro. No obstante, es el procedimiento recomendado para evidenciar las formas atípicas de masa molar elevada en los casos en los que la concentración catalítica sérica de la creatina-quinasa es elevada y no hay patología aparente que lo justifique, y en los casos en que mediante inmunoinhibición se obtiene una concentración catalítica de la isoenzima 2 superior a un 25-30% de la concentración total (Stein y cols., 1982; Griffiths, 1986; Morison y cols., 1988).

En cuanto a la medición de las isoformas de la creatina-quinasa 2, inicialmente se realizaba mediante una separación electroforética durante 2 horas y un voltaje comprendido entre 150-200 V. El aumento del voltaje disminuía el tiempo de la técnica

con la consecuente desnaturalización de la enzima debido al aumento de la temperatura. Actualmente se dispone de aparatos refrigerados capaces de realizar una separación rápida en geles de agarosa a un voltaje muy elevado (1600 V) sin dañar las isoformas de la creatina-quinasa 2. Tras la separación electroforética la medición de las isoformas se realiza mediante espectrometría de fluorescencia. Todo el proceso está automatizado proporcionando resultados en pocos minutos. El procedimiento es altamente reproducible con un rango de trabajo comprendido entre 0,03 y 0,6 $\mu\text{kat/L}$ (Apple, 1992).

1.2.2. Procedimientos inmunoquímicos

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos contra la isoenzima 2 y contra la subunidad B y la M, han contribuido al desarrollo de procedimientos capacitados para detectar y cuantificar, ya sea en concentración de masa o catalítica, pequeñas cantidades de creatina-quinasa 2.

En los complejos antígeno-anticuerpo la actividad catalítica de una enzima puede ser inhibida total o parcialmente, dependiendo de las características del anticuerpo utilizado. Los procedimientos basados en la inmunoinhibición utilizan las propiedades tanto catalíticas como antigénicas de una enzima, ya que determinan la concentración catalítica después de una preincubación con el anticuerpo. En cambio, los inmunoanálisis determinan la concentración de masa, ya que se basan únicamente en las propiedades antigénicas de la enzima, al igual que la inmunocromatografía, que es capaz, dependiendo de su complejidad, de detectar o cuantificar la creatina-quinasa 2 gracias a sus propiedades antigénicas.

1.2.2.1. Inmunoinhibición

Los primeros procedimientos desarrollados para medir la concentración catalítica de la creatina-quinasa 2 mediante la utilización de anticuerpos se basaban en principios de inmunoprecipitación. El procedimiento consistía en la precipitación de la enzima mediante anticuerpos contra la subunidad M, en un primer paso, y contra la subunidad B, en un segundo paso. La concentración de la creatina-quinasa 2 se calculaba restando de la concentración catalítica de la creatina-quinasa total, el valor de la concentración obtenido tras el primer paso de precipitación (concentración de la isoenzima 1), y el valor de la concentración tras el segundo paso de precipitación (concentración de la isoenzima 3) (Jockers-Wretou y Pfeleiderer, 1975). La

inmunoprecipitación se abandonó por su falta de practicabilidad y se sustituyó por la inmunoinhibición (Neumeier y cols. 1976).

En la inmunoinhibición se utilizan anticuerpos policlonales específicos contra la subunidad M, de manera que la isoenzima 3 y la subunidad M de la isoenzima 2 son inhibidas, determinándose la concentración catalítica de la subunidad B de la isoenzima 2 y de la isoenzima 1. Teniendo en cuenta que la isoenzima 1 raramente está presente en el suero a concentraciones significativas, la concentración de la isoenzima 2 se determina duplicando la concentración catalítica obtenida (Figura 1.6.) (Würzburg, 1981).

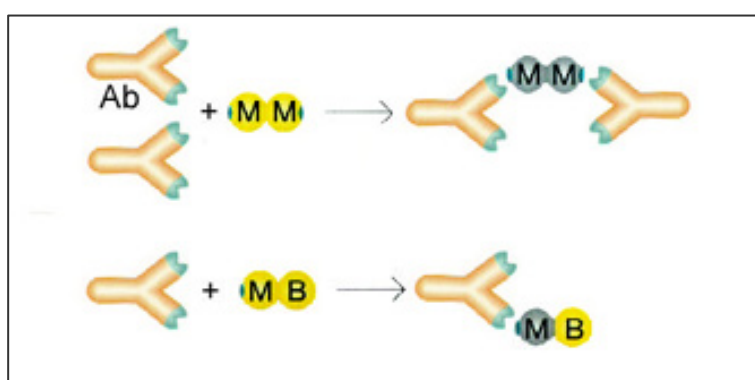


Figura 1.6: Representación de la inmunoinhibición. Ab, anticuerpo contra la subunidad M.

El factor limitante de este procedimiento lo constituyen las características del anticuerpo utilizado, estas deben ser: inhibición de la actividad de la subunidad M en menos de un minuto; siendo esta inhibición superior al 99% para la creatina-quinasa 3, y un 45-50% para la creatina-quinasa 2; y que la inhibición de la subunidad B no sea superior al 5% (Gerhardt y cols., 1979).

El procedimiento no es totalmente específico, ya que se presupone que en el espécimen a valorar no hay concentraciones significativas de la creatina-quinasa 1. Si en el espécimen existen variantes de la creatina-quinasa de masa molar elevada, se produce una sobrestimación de los resultados, pudiendo alcanzarse porcentajes de la concentración catalítica de la isoenzima 2 del orden del 40 al 50 % respecto a la concentración de la creatina-quinasa total. También la presencia de la adenilato-quinasa en el espécimen da lugar a concentraciones falsamente elevadas.

La detectabilidad del método es también crítica, ya que los valores del límite de detección son bastantes próximos a los del intervalo de referencia. Por ello, es aconsejable practicar esta determinación exclusivamente cuando las concentraciones

catalíticas de creatina-quinasa total en suero sean superiores al intervalo de referencia correspondiente.

A pesar de estas limitaciones, la inmunoinhibición es un procedimiento utilizado en muchos laboratorios para medir la isoenzima 2, ya que posee muchas ventajas: baja imprecisión (coeficiente de variación entre 2-6 %), rapidez (5-10 minutos), sencillez metodológica, fácilmente automatizable y un coste relativamente bajo (Galán, 1996).

1.2.2.2. Inmunoanálisis

A partir de 1981 aparecieron procedimientos para la medición de isoenzima 2 basados en el inmunoanálisis que medían concentración de masa ($\mu\text{g/L}$), en lugar de concentración catalítica ($\mu\text{kat/L}$), con el objetivo de mejorar la sensibilidad y la especificidad diagnósticas (Kanefusa y Shimizu, 1986).

Los inmunoanálisis son procedimientos de doble anticuerpo en los que la isoenzima 2 es inmovilizada en una matriz sólida mediante un anticuerpo específico, ya sea contra la isoenzima 2, la subunidad M o la B, y se cuantifica mediante un segundo anticuerpo específico marcado, pudiendo ser contra la isoenzima 2, la subunidad M o la B. Los complejos formados se pueden cuantificar por espectrometría de absorción, de fluorescencia o de quimioluminiscencia (Figura 1.7.).

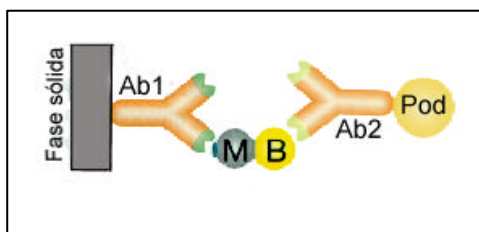


Figura 1.7: Representación del inmunoanálisis (enzimoinmunoanálisis). Ab1, anticuerpo contra la subunidad M; Ab2, anticuerpo contra la subunidad B.

En la actualidad existen un gran número de inmunoanálisis heterogéneos no competitivos comercializados para la medición de la creatina-quinasa 2, que se clasifican en enzimoinmunoanálisis y quimioluminoinmunoanálisis. La principal diferencia entre los dos métodos reside en el tipo de marcador unido al anticuerpo utilizado en la formación del sandwich. Los primeros utilizan como marcador una enzima, la peroxidasa o la fosfatasa alcalina, unida covalentemente al anticuerpo, y

que en función de la naturaleza del sustrato enzimático generará una señal colorimétrica, fluorimétrica o quimioluminiscente. Los segundos utilizan como marcador una molécula quimioluminiscente, como el ester de acridinio, o bien un marcador como el tris-(bipiridil) de rutenio (II), que genera luminiscencia mediante su oxidación en la superficie de un electrodo.

Los dos métodos pueden clasificarse a su vez atendiendo al tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal) utilizado en la formación del sandwich, que determinará la especificidad del ensayo; al tipo de fase sólida (micropartículas de látex, partículas paramagnéticas, papel de fibra de vidrio, esferas de poliestireno o esferas magnéticas) en la que se encuentra unido el anticuerpo inmovilizado; y al tipo de calibración, que puede realizarse mediante una curva master (ajuste a una curva de calibración predeterminada, mediante la medición de la concentración de la creatina quinasa 2 en dos calibradores) o mediante la generación de una curva de calibración a partir de la medición de la concentración de la isoenzima 2 en varios calibradores (Gadsden y cols., 1994).

Dependiendo de la configuración y el tipo de procedimiento, el inmunoanálisis variará en cuanto a su sensibilidad y especificidad analítica, límite de detección, valor discriminante, reproducibilidad, rapidez y coste. En la Tabla 1.2., se pueden ver las características de los inmunoanálisis comerciales más utilizados.

Existe una buena correlación entre el inmunoanálisis y la inmunoinhibición, es decir entre los métodos que miden concentración de masa y los que miden concentración catalítica (Eisenberg y cols., 1989). Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado notablemente el número de laboratorios que realizan mediciones de concentración de masa, ya que presenta diversas ventajas frente a la inmunoinhibición.

Los inmunoanálisis tienen una sensibilidad analítica muy elevada, siendo capaces de medir concentraciones por debajo de 1 $\mu\text{g/L}$, por lo que pueden detectar los pequeños cambios que se producen en la concentración sérica o plasmática de la isoenzima durante las primeras horas de un infarto (Panteghini, 1998). No se han detectado interferencias debidas a la presencia de adenilato-quinasa, de variantes de la creatina-quinasa de masa molar elevada o de la isoenzima 1 (Mao y cols., 1996). No obstante, se han descrito aumentos de la concentración de creatina-quinasa 2 medida como consecuencia de la presencia de anticuerpos heterofílicos. Los anticuerpos heterofílicos reaccionan con los anticuerpos inmovilizados y los conjugados, provocando resultados falsamente elevados. Sin embargo, la adición de

inmunoglobulinas en la mezcla de reacción permite la eliminación de esta interferencia (Vaidya y cols., 1992). Los inmunoanálisis son métodos rápidos, de fácil manejo, completamente automatizados y con una imprecisión baja.

Fabricante	Detección	Anticuerpo inmovilizado	Anticuerpo marcado
Abbott/IMx	Fluorescencia	Contra la isoenzima 2, micropartículas de latex	Contra la subunidad M, fosfatasa alcalina
Bayer/Immuno I	Colorimétrico	Contra la isoenzima 2, partículas paramagnéticas	Contra la subunidad B, fosfatasa alcalina
Becton Dickinson/Affinity	Colorimétrico	Contra la isoenzima 2, IgG contra IgG de ratón	Contra la subunidad M, peroxidasa
Behring/Opus	Fluorescencia	Contra la isoenzima 2, papel de fibra de vidrio	Contra la subunidad M, fosfatasa alcalina
Roche/Elecsys	Quimioluminiscencia	Contra la isoenzima 2, partículas paramagnéticas	Contra la isoenzima 2, tris-(bipiridil) de rutenio (II)
Chiron/ACS:180	Quimioluminiscencia	Contra la subunidad B, partículas paramagnéticas	Contra la isoenzima 2, ester de acridinio
Dade/Stratus	Fluorescencia	Contra la isoenzima 2, papel de fibra de vidrio	Contra la subunidad B, fosfatasa alcalina
Diagnostic Products/Immulite	Quimioluminiscencia	Contra la isoenzima 2, esferas	Contra la subunidad B, fosfatasa alcalina
Johnson & Johnson/Vitros	Quimioluminiscencia	Contra la subunidad B, fase sólida	Contra la isoenzima 2, peroxidasa
Organon Teknika/Auraflex	Fluorescencia	Contra la isoenzima 2, partículas paramagnéticas	Contra la subunidad B, fosfatasa alcalina
Sanofi/Access	Quimioluminiscencia	Contra la subunidad B, partículas paramagnéticas	Contra la isoenzima 2, fosfatasa alcalina
Tosoh/Aia	Fluorescencia	Contra la subunidad B, esferas magnéticas	Contra la isoenzima 2, fosfatasa alcalina

Tabla 1.2: Características de algunos inmunoanálisis comerciales, (Panteghini, 1998).

Los principales inconvenientes del inmunoanálisis radican en el coste, ya que los reactivos son caros y además se requiere de un analizador específico, y en la divergencia de los resultados obtenidos en los especímenes de pacientes con los distintos inmunoanálisis (Sánchez y cols., 1999).

1.2.2.3. Inmunocromatografía

En los últimos años se han desarrollado un gran número de procedimientos inmunocromatográficos, también conocidos como análisis junto al paciente, que pueden dividirse en cualitativos y cuantitativos. En la Tabla 1.3. se muestran algunos

de los equipos disponibles en el mercado para la medición o detección de la creatina-quinasa 2 junto a algunas de sus características más importantes.

Método	Marcador	Muestra	Valor discriminante	Procedimiento	Tiempo (min)	Señal
Icon/Hybritech	CK-2	Suero	< 2 µg/L	Cuantitativo	15-20	/
Spectral diagnostics/Cardiac STATus	CK-2	Sangre	5 µg/L	Cualitativo	15	Colorimétrico
Biosite Diagnostics /TRIAGE® CARDIAC PANEL	CK-2	Sangre	0,75 µg/L	Cuantitativo	10-15	Fluorescencia
First Medical/Alpha DX	CK CK-2	Sangre	/ /	Cuantitativo	18-25	/
Dade Behring/Stratus CS STAT	CK-2	Sangre	3,5 µg/L	Cuantitativo	13-22	Fluorescencia

Tabla 1.3: Características de algunos equipos usados en los análisis junto al paciente.

Los primeros procedimientos comerciales que surgieron eran procedimientos inmunocromatográficos con múltiples pasos (centrifugación, lavados, múltiples pipeteos, etc.) que medían la concentración de la creatina-quinasa 2 en 15-30 minutos. Posteriormente, como resultado de los avances tecnológicos, se han desarrollado procedimientos totalmente automatizados que incorporan módulos de ensayo con los reactivos necesarios para realizar la medición. La mejora de la especificidad de los anticuerpos monoclonales ha permitido el desarrollo de procedimientos más simples y precisos con límites de detección más bajos (Gerhardt y cols., 1997).

Gran parte de los análisis junto al paciente son procedimientos inmunocromatográficos de carácter cualitativo. La medición se inicia con la adición de una pequeña cantidad de sangre con anticoagulante a un módulo de reacción. El plasma es separado de los eritrocitos gracias a una membrana permeable, y difunde a lo largo de una tira reactiva. Si la concentración de la creatina-quinasa 2 es elevada, se producirá la unión de esta a distintos anticuerpos marcados presentes en el módulo de reacción formando un sandwich (anticuerpo 1/creatina-quinasa 2/anticuerpo 2). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la isoenzima 2, están marcados (1) con una molécula indicadora (oro, peroxidasa, etc.), o bien (2) con una molécula de adhesión como la biotina. Esta molécula de adhesión, que a su vez está unida al anticuerpo que forma parte del sandwich, se unirá a una molécula inmovilizada en una zona discreta de la tira reactiva, donde se visualizará la banda producida como consecuencia de la reacción inmunológica. Asimismo, también se producirá la unión de los anticuerpos

marcados con la molécula indicadora, que no forman parte del sandwich, a moléculas de creatina-quinasa 2 inmovilizadas en la tira reactiva, dando lugar a una banda coloreada (control interno). La lectura del resultado es visual, la existencia de una banda, además de la correspondiente al control interno, indica la presencia de concentraciones anormales de la isoenzima objeto de la medición. En la Figura 1.8. se muestra un esquema del procedimiento descrito.

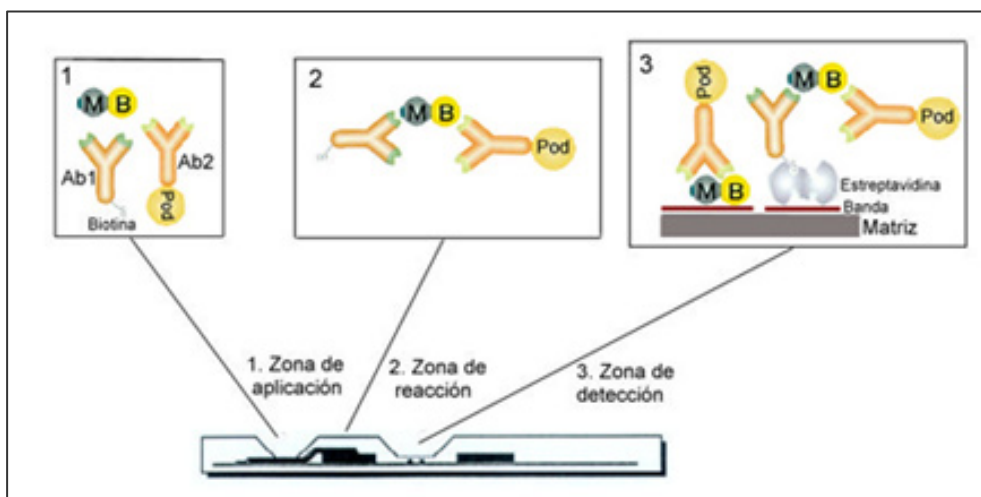


Figura 1.8: Representación de la inmunocromatografía. Ab1, anticuerpo contra la subunidad M; Ab2, anticuerpo contra la subunidad B.

Con objeto de eliminar la interpretación subjetiva de un resultado poco claro, muchos de los análisis junto al paciente que se han desarrollado recientemente incorporan un fotómetro o fluorímetro, dependiendo del marcaje del anticuerpo. De manera que un incremento de la intensidad de la luz o de la fluorescencia, será proporcional a la cantidad de creatina-quinasa 2 presente en el espécimen, lo que permitirá su cuantificación. Sin embargo, cabe destacar que si bien los procedimientos cuantitativos contribuyen a una mejora de la precisión del ensayo, también encarecen notablemente el procedimiento (Hudson y cols., 1999).

Los procedimientos inmunocromatográficos se pueden realizar junto al paciente por personal no perteneciente al laboratorio clínico. Estos ensayos son realizados generalmente en urgencias o en unidades de cuidados intensivos. Se ha descrito que los procedimientos existentes poseen características diagnósticas similares a los inmunoanálisis heterogéneos no competitivos. Sin embargo, existen varios puntos a resolver antes de su posible implantación, como son la falta de estandarización, el precio y la ausencia de estudios que respalden la sustitución de este tipo de procedimientos por los habituales (Plebani y Zanimotto, 1999).

1.3. VALOR SEMIOLÓGICO DE LOS VALORES DE CONCENTRACIÓN DE LA CREATINA-QUINASA 2

La creatina-quinasa 2 se encuentra en el músculo esquelético y en el músculo cardíaco, por lo tanto todas aquellas patologías que afecten a la integridad celular de estos tejidos dará lugar a un aumento de la concentración de dicha isoenzima en sangre. Sin embargo, y debido a que la isoenzima 2 se encuentra principalmente en los miocitos, la medición de su concentración sérica es utilizada básicamente como ayuda en la detección del infarto agudo de miocardio.

1.3.1. La creatina-quinasa 2 en el infarto agudo de miocardio

En 1954, un artículo publicado por La Due y cols., puso de manifiesto la utilidad de la medición de la concentración de los marcadores séricos como ayuda en el diagnóstico del infarto de miocardio. Realizaron mediciones seriadas de la concentración catalítica de la alanina-aminotransferasa en especímenes séricos de pacientes que habían sufrido un infarto agudo de miocardio, evidenciándose aumentos en la concentración catalítica de dicha enzima, por encima del límite superior del intervalo de referencia, tras pocas horas del evento, alcanzándose un pico de máxima concentración a los dos días para retornar a concentraciones normales varios días después. Aunque la medición de la alanina-aminotransferasa se utilizó ampliamente como ayuda en el diagnóstico del infarto, su falta de especificidad limitó en gran medida su uso, por lo que en años posteriores se dedicó un gran esfuerzo en buscar marcadores cardíacos con una mayor especificidad y sensibilidad diagnósticas. En 1963, Hess y cols., describieron por primera vez incrementos de la concentración catalítica en suero de la creatina-quinasa tras un infarto agudo de miocardio, y en 1966 se demostró que la medición de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa mejoraba notablemente la especificidad diagnóstica (Van der Veen y cols., 1966). Desde entonces y hasta principios de los noventa, la medición de la concentración sérica de la creatina-quinasa 2 ha sido considerada como una de las piedras angulares en el diagnóstico de dicha patología.

En la última década, la necesidad de marcadores cardíacos con una mayor especificidad y sensibilidad diagnósticas en la detección del infarto y en la evaluación de la reperfusión coronaria, ha impulsado enormemente el estudio de nuevos marcadores alternativos a la creatina-quinasa 2 y de nuevos procedimientos de medida. Actualmente, la función de los marcadores cardíacos se extiende más allá del terreno diagnóstico. Se propugna su uso para estimar el tamaño del infarto, determinar

si existe reperusión del vaso ocluido e, incluso, para establecer el pronóstico del paciente.

Conseguir una mayor precocidad en el diagnóstico, permite iniciar antes el tratamiento fibrinolítico o con angioplastia primaria y, en los casos dudosos, ganar tiempo en la búsqueda de otras alteraciones potencialmente graves, economizar medios al reducir hospitalizaciones, y una mejora en la selección de los pacientes que deben ingresar en la unidades de atención coronaria (Roberts y cols., 1994).

1.3.1.1. El infarto agudo de miocardio

Con este término se designa la necrosis miocárdica aguda de origen isquémico, secundaria generalmente a la oclusión trombótica de una arteria coronaria. Su incidencia varía ampliamente de unas comunidades a otras, oscilando entre el 0,8 y el 7,5 por 1000 habitantes y por año; existe un claro predominio entre los varones y su mayor incidencia se presenta entre los 55 y los 65 años. No sólo es una enfermedad frecuente, sino altamente letal, cuya mortalidad durante la fase aguda ha sido estimada entre el 20 y el 50% (Sanz, 1992).

La lesión histológica fundamental en el infarto de miocardio es la necrosis isquémica. Las arterias coronarias muestran en la mayoría de los casos lesiones ateromatosas obstructivas. La arteria que irriga la zona del infarto se encuentra ocluida con frecuencia por un trombo fresco y único, adherido a una placa aterosclerosa.

La rotura de la placa aterosclerosa es probablemente la circunstancia que desencadena el infarto, al exponer el colágeno subendotelial a la acción de la plaquetas y provocar su activación. La formación de agregados y la liberación de sustancias vasoactivas inducen espasmo y contribuyen a la oclusión del vaso. Todo ello, en definitiva, contribuye a la formación del trombo. Una vez producida la oclusión coronaria, la zona de miocardio irrigada por la arteria afectada padece isquémia. La necrosis se establece de forma progresiva debido en parte a la presencia de arterias colaterales que permiten cierto flujo de sangre,. Experimentalmente, tras 40 minutos de oclusión, la necrosis alcanza alrededor del 35% del miocardio irrigado por la arteria ocluida; a las 3 horas esta proporción es ya del 57%, y a las 6 horas, del 75%. Por este motivo, las intervenciones terapéuticas destinadas a evitar o reducir la necrosis deben instaurarse durante las primeras 3-4 horas de iniciados los síntomas.

En el infarto agudo de miocardio la zona de lesión inicial está a nivel del subendocardio debido probablemente a que cuando se da la oclusión coronaria, se produce una disminución más intensa en el flujo sanguíneo que irriga esta zona. La

progresión de la muerte celular se extiende desde el subendocardio hacia el subepicardio. Si el periodo de flujo lento y de aporte inadecuado de oxígeno al corazón se mantiene durante varias horas, habitualmente el infarto alcanza el epicardio. Casi siempre, esta progresión da lugar a un infarto con onda Q. Sin embargo, si el aporte inadecuado de oxígeno no dura más de una hora, la lesión puede quedar confinada básicamente al subendocardio, produciendo un infarto subendocárdico, sin onda Q. Estos pacientes permanecen en peligro y en una posición inestable, ya que la zona infartada queda rodeada por una franja de miocardio todavía viable, pero que es vulnerable frente a una lesión posterior, lo que queda evidenciado por una incidencia mayor de angina, una mayor frecuencia de reinfarcto y una mortalidad tardía más elevada, en comparación con los pacientes que sufren infartos con onda Q (DeWood y cols., 1989)

Por lo tanto, la necrosis es un fenómeno dinámico y su extensión definitiva dependerá fundamentalmente de la masa ventricular irrigada por la arteria ocluida, de la existencia de arterias colaterales, de la presencia de lesiones obstructivas en las arterias de las que parten dichas colaterales, de la posibilidad de una reperfusión miocárdica precoz por lisis espontánea o terapéutica del trombo y, en mucho menor grado, de las demandas de oxígeno del músculo isquémico (Willenson, 1989).

A nivel celular, los cambios producidos en los cardiomiocitos como consecuencia de la isquemia se pueden dividir en una primera fase reversible seguida de una fase irreversible. Segundos después de la oclusión coronaria se produce un cese del metabolismo aeróbico como consecuencia de la falta de oxígeno. Con el objetivo de mantener el suministro energético necesario para la célula comienza la glucólisis anaeróbica, las reservas de glucógeno son metabolizadas produciendo un aumento de la concentración de lactato, adenosina, inosina y otros metabolitos anaeróbicos que se acumulan en el tejido isquémico. También se produce una salida de iones, y un cese de la contracción muscular para reducir la demanda energética. La salida del potasio produce un cambio en el potencial de membrana que queda reflejado en el electrocardiograma. La acumulación intracelular continuada de partículas de carácter osmótico como el fosfato inorgánico, la creatina, intermediarios glucolíticos, protones, etc., aumenta la osmolaridad de la célula provocando una entrada de agua. Los cambios estructurales producidos en esta fase incluyen un edema del retículo sarcoplasmático, condensación e hinchazón de las mitocondrias, desaparición de los gránulos de glucógeno y condensación de la cromatina.

Un descenso prolongado y progresivo de ATP provoca un daño celular irreversible. La fase irreversible se caracteriza por: (1) una elevada disminución de los

fosfatos energéticos (fosfato de creatina, ATP), (2) una reducción importante de los nucleótidos de adenina, (3) una paralización de la glucólisis anaeróbica, (4) un descenso del pH y del contenido de glucógeno, (5) un aumento del contenido de inosina e hipoxantina, (6) un marcado aumento de la osmolaridad, básicamente debida a la acumulación de la concentración de lactato, y (7) la activación de enzimas lisosomales, como la lipoproteína lipasa, que crean un importante daño celular a través de la ruptura de la membrana. Los cambios estructurales que se observan en esta fase consisten en un edema celular y en daños en las mitocondrias y en el sarcolema. Los trastornos en este último son considerados como el punto de no retorno. Una vez se ha producido la ruptura del plasmalema, se produce la liberación de las macromoléculas intracelulares a la vez que la incorporación de elevadas cantidades de electrolitos extracelulares, como el sodio y el calcio. Más tarde aparece la morfología típica del infarto, pérdida del núcleo y un patrón de estriación (Mair, 1999).

La pérdida de los distintos constituyentes celulares se puede dividir en tres fases distintas, cada una de la cuales refleja distintos aspectos del daño celular. La primera fase se caracteriza por la salida de iones al espacio extracelular, como consecuencia de un fallo de las bombas responsables de su traslocación que mantienen un gradiente transmembrana gracias al aporte energético del ATP. En la segunda fase, se produce la salida de metabolitos, como el lactato, la adenosina y la inosina, debido a un desequilibrio metabólico. En la tercera fase, se observan importantes daños en la membrana celular que permiten la salida de macromoléculas (Hearse, 1979).

El transporte desde el líquido intersticial a la sangre del 80% de las proteínas se produce mediante su entrada directa a los capilares. El corazón es un tejido con una elevada permeabilidad y densidad capilar, lo que implica la existencia de una gran área a través de la cual las moléculas pueden entrar directamente a los capilares mediante difusión o pinocitosis. Las células endoteliales del capilar están separadas por pequeñas aberturas que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrosolubles. Además, existe un gran número de vesículas plasmalémicas que facilitan el transporte de las macromoléculas. El 20% de las proteínas restantes es transportado a la sangre a través del sistema linfático (Hermens y cols., 1998).

1.3.1.2. Seguimiento y diagnóstico del infarto agudo de miocardio

El diagnóstico del infarto agudo de miocardio se basa en los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Guillum y cols., 1984), que consiste en la

presencia de al menos dos de los siguientes criterios: (1) historia de dolor torácico de tipo isquémico, (2) cambios evolutivos en los electrocardiogramas seriados, e (3) incremento de enzimas séricas.

En la mayoría de los casos el infarto es sintomático, la manifestación más importante es el dolor intenso, opresivo y angustiante, ubicado o irradiado a la región anterior del pecho, al epigastrio, al dorso, al cuello y a las mandíbulas, de varias horas de duración, acompañado de sudoración y síntomas vagotónicos. El paciente está angustiado, pálido y sudoroso. En algunos predomina la taquicardia y en otros la braquicardia. Inicialmente el examen cardíaco presenta pocas alteraciones, más adelante puede aparecer latido anómalo de ventrículo izquierdo, 3º y 4ª ruido, galope, frotos pericárdicos o manifestaciones de alguna complicación del infarto. Sin embargo, la isquemia miocárdica, incluso cuando es prolongada, puede ser asintomática o presentarse como muerte súbita.

El estudio de Framingham (Kanel, 1987) y el estudio de múltiples factores de riesgo (Grimm y cols., 1987), indica que hasta 1 de cada 3 infartos agudos de miocardio no es reconocido ni por el enfermo ni por el médico, porque el dolor torácico es atípico o no existe. La incidencia de infarto silente de miocardio es más alta en los enfermos diabéticos y parece ser que es más frecuente en las mujeres que en los hombres.

Las alteraciones específicas que se observan en el electrocardiograma de un paciente que ha sufrido un infarto con onda Q, muestran una serie de cambios que da lugar eventualmente a una onda Q. El electrocardiograma no permite el reconocimiento con certeza del infarto agudo sin onda Q, este demuestra una depresión del segmento ST y una inversión de la onda T, y la única evolución que presenta es su retorno a la línea de base, siendo estas alteraciones cardiográficas similares a la de otros eventos cardíacos.

Cuando se considera sólo el electrocardiograma de llegada en los enfermos con dolor torácico prolongado y sin infarto previo, la eficacia diagnóstica global es del 75%. La evaluación retrospectiva de electrocardiogramas seriados, en cuyo momento puede ser ya demasiado tarde para intervenciones terapéuticas, aumenta la eficacia hasta el 94%. No obstante, el electrocardiograma puede inducir a confusiones en un mínimo del 8% de todos los infartos, y es indeterminado en un 12% adicional de enfermos. Alrededor del 50% de los enfermos con un infarto tendrán inicialmente un electrocardiograma no diagnóstico en el momento de su presentación en el departamento de urgencias (Antman y cols., 1997).

El tercer criterio utilizado es la medición de las concentraciones séricas de los marcadores cardíacos. Un marcador cardíaco ideal debería encontrarse en elevadas concentraciones en el músculo cardíaco y bajas concentraciones en plasma o suero, no encontrarse en otros tejidos o en concentraciones muy bajas, liberarse rápidamente tras el daño tisular para permitir un diagnóstico precoz, y permanecer en sangre durante el tiempo suficiente para facilitar un diagnóstico apropiado. El marcador tendría que presentar un perfil de liberación previsible, con un aumento inicial y una caída tras la desaparición de los eventos agudos, de esta manera las variaciones producidas en este perfil podrían ser indicativas de complicaciones. También debería ser estable y su concentración fácilmente medible.

Los marcadores utilizados actualmente son la creatina-quinasa, la creatina-quinasa 2, las isoformas de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa, la mioglobina, la isoenzima 1 de la L-lactato-deshidrogenasa, la isoforma cardíaca de la troponina T y la isoforma cardíaca de la troponina I. En la Tabla 1.4. se describen algunas de las características más importantes de estos marcadores cardíacos.

Marcadores cardíacos	Masa molar (g/mol)	Especificidad cardíaca	Primer aumento	Duración del aumento
Mioglobina	18.000	No	1-3 horas	12-24 horas
Creatina-quinasa total	85.000	No	4-8 horas	36-48 horas
Creatina-quinasa 2 inmunoanálisis	85.000	No	3-5 horas	24-48 horas
Isoformas de la creatina-quinasa 2	85.000	No	2-4 horas	16-24 horas
Troponina T cardíaca	37.000	Si	3-4 horas	5-10 días
Troponina I cardíaca	23.500	Si	4-6 horas	4-10 días

Tabla 1.4: Características más importantes de algunos marcadores cardíacos.

La creatina-quinasa 2, la mioglobina y las troponinas presentan características muy diferentes relativas a la precocidad de su aumento tras la lesión miocárdica, al aumento relativo de sus concentraciones en el infarto agudo de miocardio y al tiempo que transcurre hasta que alcanzan su máxima concentración en plasma/suero y retornan a los intervalos de referencia. Estas diferencias se deben a su localización subcelular y tisular, y al tiempo de paso desde la célula al plasma.

La creatina-quinasa 2 y la mioglobina son moléculas de baja masa molar que se hallan en el citoplasma celular. Por su baja masa molar y la rapidez de su tránsito hacia la circulación, aparecen rápidamente en plasma como resultado del daño celular.

Estas proteínas se coexpresan en el músculo esquelético y en el miocardio. Como consecuencia del recambio celular normal de las células del músculo esquelético, existe normalmente en plasma un cierto intervalo de concentraciones de estas moléculas, lo que implica que hasta que una lesión miocárdica no libere suficientes moléculas como para sobrepasar estas concentraciones, no podrá ser detectado el infarto.

La troponina es un complejo de tres subunidades, asociado al filamento delgado del miocito, constituido por la troponina T, la troponina C y la troponina I. Únicamente la troponina I y la T presentan interés en el diagnóstico del infarto, ya que las formas existentes en el músculo esquelético y el miocardio están codificadas por genes diferentes y poseen estructuras suficientemente diferenciadas como para poder reconocer las isoformas cardíacas mediante inmunoanálisis (Bucher y cols., 1988). Dado el nulo o indetectable número de moléculas de troponina cardíacas que circulan en el plasma de los individuos presuntamente sanos, sus incrementos relativos sobre el valor de referencia en los casos de necrosis miocárdica, son los mayores de entre los diferentes marcadores cardíacos. Las troponinas cardíacas tienen una fracción disuelta en el citoplasma de los cardiomiocitos, lo que les confiere una precocidad semejante a moléculas citoplasmáticas como la creatina-quinasa 2 en la detección de lesiones celulares. Sin embargo, la fracción mayoritaria ligada estructuralmente al filamento delgado, sólo aparece en plasma tras lesiones celulares irreversibles y con posterioridad a las 40 horas de producirse el evento (Katus y cols., 1991). Finalmente, su persistencia en plasma tras su liberación es muy larga, lo que facilita su uso como marcadores tardíos de la necrosis miocárdica.

Como se ha indicado anteriormente, el valor del dolor torácico para el diagnóstico diferencial es limitado, y los cambios en el electrocardiograma tienen grados cambiantes de sensibilidad y de especificidad. Por lo tanto, las mediciones de las proteínas séricas indicativas de lesión miocárdica desempeñan un papel muy importante en el diagnóstico del infarto agudo de miocardio, sobre todo en aquellos pacientes con un electrocardiograma no diagnóstico o con infartos de miocardio pequeños. La determinación de la creatina-quinasa 2 constituye una prueba importante para el diagnóstico precoz de la enfermedad y es reconocida como un indicador específico de daño miocárdico.

Los incrementos séricos de la isoenzima 2 se producen entre las 3–5 horas tras la lesión miocárdica, alcanzando el máximo al cabo de las 16-20 horas para volver a la normalidad a las 48 horas. Esto es así siempre y cuando los pacientes no sean sometidos a tratamiento trombolítico.

La sensibilidad diagnóstica de la medida de masa de la creatina-quinasa 2 varía en función del tiempo transcurrido una vez se ha producido el daño cardiaco. Si la medición se realiza al cabo de las 3 horas del inicio, la sensibilidad de la medición es inferior al 30%. Entre las 3-6 horas la sensibilidad es del 58% y entre 6-9 horas es del 86%. La máxima sensibilidad diagnóstica de la medida es del 98% entre las 9-12 horas del infarto agudo de miocardio (Panteghini y cols., 1999).

La obtención de valores seriados de concentración de la creatina-quinasa y de la creatina-quinasa 2 durante las 24 horas siguientes del inicio, proporciona una mayor sensibilidad y especificidad diagnósticas del infarto agudo de miocardio. Las mediciones seriadas de la creatina-quinasa 2 realizadas a partir de las 3 horas del daño cardiaco en pacientes con electrocardiogramas no diagnósticos tienen una sensibilidad diagnóstica del 90% (Gibler y cols., 1990).

Debido a que la creatina-quinasa 2 no es específica de órgano (también se encuentra en pequeñas cantidades en el músculo esquelético), se recomienda expresar la concentración de masa como índice en relación a la concentración catalítica de la creatina-quinasa total (Wolfson y cols., 1991). Sin embargo, este índice disminuye la sensibilidad diagnóstica, ya que cuando coexiste una lesión muscular cardíaca con una esquelética se requieren concentraciones de creatina-quinasa 2 muy elevadas para poder alcanzar el porcentaje indicativo de daño cardiaco. También supone un aumento del coste económico, ya que el índice precisa de dos determinaciones analíticas.

La medición sérica o plasmática de las isoformas de la creatina-quinasa-2 proporciona un diagnóstico temprano del infarto agudo de miocardio. Esto se debe al rápido aumento que se produce en el valor del cociente entre isoforma tisular (CK_2) y la isoforma sérica (CK_1) tras la liberación de la isoforma tisular como consecuencia de la lesión cardíaca. Se ha descrito que este cociente presenta una sensibilidad y una especificidad diagnósticas del 95,7% y el 93,9% durante las primeras 6 horas del infarto (Kost y cols., 1998).

1.3.1.3. Seguimiento de la reperfusión coronaria

Mediante trombolisis endovenosa o angioplastia se puede conseguir la reperfusión de la arteria coronaria ocluida en el infarto agudo de miocardio. Aquellos pacientes en los que este tratamiento tiene éxito durante la fase precoz del infarto presentan una mayor supervivencia que aquellos que no reciben tratamiento trombolítico, o en los que el mismo fracasa (AHA Medical/Scientific Statement, 1990).

La solución más evidente para saber si se ha producido la reperfusión, es la realización de una angiografía, sin embargo, esta técnica es invasiva, no se halla exenta de peligro para los pacientes, y muchos centros sanitarios no disponen de la infraestructura necesaria para realizar exploraciones angiográficas de forma continuada y urgente. Es por ello que resulta de sumo interés disponer de métodos no invasivos que permitan conocer el resultado del tratamiento empleado para reperfundir la arteria ocluida.

La reperfusión en los infartos con onda Q produce un aumento más rápido de la creatina-quinasa y de la creatina-quinasa 2 (Figura 1.9). Se ha observado que el tiempo hasta llegar a los valores máximos de concentración catalítica de creatina-quinasa 2 y concentración de masa no difiere de forma significativa (Lee y cols. 1986).

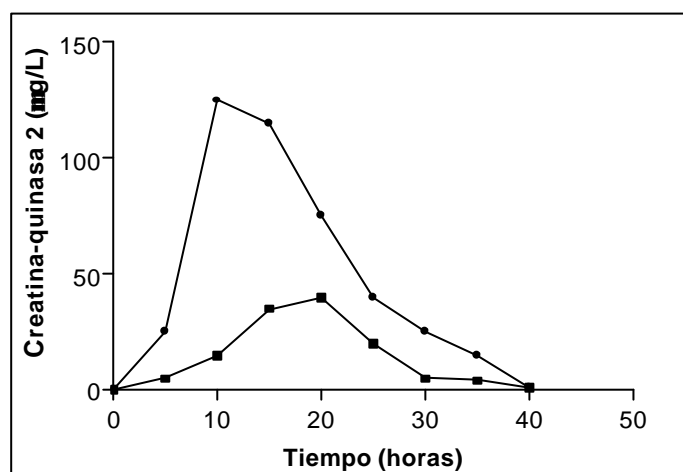


Figura 1.9: Determinación seriada de la concentración de masa de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en dos pacientes tras un infarto agudo de miocardio. Paciente tratado con terapia trombolítica (círculos); paciente tratado convencionalmente (cuadrados).

Los criterios utilizados para determinar si ha habido reperfusión del músculo cardíaco se dividen en dos grupos: medida del tiempo hasta alcanzar los valores máximos de creatina-quinasa 2, y medidas de incremento relativo de la concentración de dicha isoenzima. El tiempo hasta alcanzar los valores máximos se calcula desde el comienzo del dolor torácico, los límites de tiempo discriminatorios óptimos para la reperfusión del tejido son de 14,4 horas, con una probabilidad de clasificación correcta del 88% cuando se emplee este valor discriminatorio (Katus y cols., 1988). En cuanto al incremento relativo de la concentración, un incremento de 2,5 veces de la creatina-quinasa 2 tras 90 minutos del comienzo del tratamiento trombolítico, es indicativo de reperfusión de la arteria coronaria izquierda con una sensibilidad diagnóstica del 92%

y una especificidad diagnóstica del 100%; un incremento de 2,2 veces es indicativo de recanalización de la arteria coronaria derecha, con una sensibilidad y una especificidad diagnóstica del 85% y del 100%, respectivamente (Garabedian y cols. 1988).

1.3.1.4. Estimación del área afectada

La estimación del tamaño del área afectada tras un infarto agudo de miocardio, se puede realizar mediante la ayuda de la medición de un marcador cardiaco, siempre y cuando se conozca la cantidad liberada de éste como consecuencia del daño, y su concentración en el tejido cardiaco. El tamaño del infarto esta estrechamente relacionado con la cantidad de creatina-quinasa 2 liberada al torrente circulatorio. Por consiguiente, el área bajo la curva, obtenida a partir de la determinación seriada de su concentración, correlaciona con el tamaño del área afectada, ya que la cantidad de isoenzima liberada aumenta con el daño cardiaco. Sin embargo, como la creatina-quinasa 2 también se encuentra en el músculo esquelético, de igual forma se verá aumentada como consecuencia de aquellos incidentes que afecten a la integridad de este tejido, lo que dificulta la estimación del daño cardiaco cuando coexisten ambas lesiones. Del mismo modo, los pacientes que hayan sido sometidos a una reperfusión coronaria aparentan un daño mayor, ya que tras el tratamiento se libera una cantidad más elevada de enzima al torrente sanguíneo (Adams y cols., 1993).

1.3.1.5. Valor pronóstico

La concentración de masa de la creatina-quinasa 2 también puede proporcionar un valor pronóstico. Se ha descrito que algunos pacientes con angina inestable muestran valores de masa de creatina-quinasa 2 anormalmente fluctuantes. La angina inestable es aquella que se presenta con dolor precordial y cambios electrocardiográficos significativos, pero sin aumento significativo de la concentración catalítica de la creatina-quinasa total y de la creatina-quinasa 2. Se ha observado que aquellos pacientes con angina inestable que durante un largo periodo de tiempo presentan concentraciones de masa de creatina-quinasa 2 ligeramente superiores a su valor discriminante, tienen un riesgo importante de desarrollar un infarto agudo de miocardio durante su evolución. Consecuentemente, en este grupo de pacientes la concentración de masa de la isoenzima 2 puede proporcionar un valor pronóstico similar al de otros marcadores cardiacos no enzimáticos, como las troponinas (Panteghini M. 1998).

1.3.2. Aumento de la creatina-quinasa 2 no asociado al infarto agudo de miocardio

El aumento en la concentración de la creatina-quinasa 2 en los especímenes humanos no es exclusivo del infarto agudo de miocardio. En la Tabla 1.5. se muestran algunas de las causas que provocan un aumento de la concentración de la creatina-quinasa 2 no debida a una necrosis miocárdica. El ejercicio físico extremo puede provocar un aumento de hasta tres veces por encima del límite superior de referencia. La ingestión de alcohol en dosis elevadas y el monóxido de carbono (intoxicador de las células musculares) aumentan significativamente la concentración de la creatina-quinasa. Elevaciones persistentes de la concentración sérica se han detectado en pacientes con miopatías crónicas, secundarias probablemente a enfermedades renales o tiroideas, en las que el aclaramiento renal está disminuido (Lott y Stang, 1980).

-
- Traumatismo muscular
 - Lesión por aplastamiento
 - Quemaduras
 - Lesiones causadas por corriente eléctrica
 - Cirugía no cardíaca
 - Ejercicio físico prolongado (p.e., competiciones de maratón, esquí de fondo)
 - Insuficiencia renal crónica
 - Hipotiroidismo
 - Alcoholismo crónico
 - Hiper e hipotermia
 - Reanimación cardiopulmonar
 - Desfibrilación
 - Hipo e hipertiroidismo
-

Tabla 1.5: *Aumento de la concentración de la creatina-quinasa 2 no asociado al infarto agudo de miocardio.*

1.4. MATERIALES DE REFERENCIA Y TRAZABILIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO

Han transcurrido 100 años desde que Paul Ehrlich desarrolló un procedimiento de referencia, mediante la utilización de una material de referencia biológico altamente purificado, con el objetivo de solventar las dificultades existentes en el tratamiento de la difteria, debidas a la utilización de una antitoxina de origen animal que presentaba una elevada variabilidad cuando se utilizaba en el tratamiento de dicha enfermedad (Büttner, 1995).

Hoy en día, tanto los materiales de referencia como los procedimientos de medida de referencia son de vital importancia en la normalización y armonización de los resultados del laboratorio clínico. Debido al elevado desarrollo metodológico de las últimas décadas, actualmente se pueden medir cientos de analitos distintos mediante un gran número de procedimientos diferentes, que aportan una información de gran importancia al clínico. Sin embargo, existe una elevada discordancia entre los resultados obtenidos por distintos laboratorios al medir un mismo componente en una misma muestra, ya sea por procedimientos iguales o distintos, siendo mucho mayor cuando esta se realiza mediante procedimientos de distintas características (Tietz, 1994). La existencia de estas diferencias crea problemas cuando los pacientes son trasladados de un centro a otro, y provoca desconfianza y confusión al clínico solicitante y a los mismos facultativos del laboratorio, con la posibilidad de realizar una interpretación incorrecta de los resultados, además de la innecesaria repetición de las mediciones que comporta un gasto económico importante.

La falta de normalización se acentúa cuando se mide una proteína mediante inmunoanálisis. Estos procedimientos analíticos se caracterizan porque su especificidad depende del anticuerpo utilizado en el ensayo, ya que para medir una misma proteína se pueden utilizar anticuerpos distintos capaces de reconocer diferentes epítomos de la macromolécula (Moss y Whicher, 1995).

El objetivo de una medida (conjunto de operaciones destinadas a determinar el valor de una magnitud) consiste en la descripción de una propiedad del componente que es objeto de esta. Esta propiedad se debería poder cuantificar, en unas unidades determinadas, mediante el uso de un procedimiento de medida que permitiese el paso de la señal medida a concentración, a través del uso de calibradores de concentración conocida para esa propiedad.

Para que la medida fuese metrológicamente correcta, los valores de concentración asignados a estos calibradores deberían ser trazables al sistema de unidades empleado, actualmente el Sistema Internacional (Figura 1.10.).

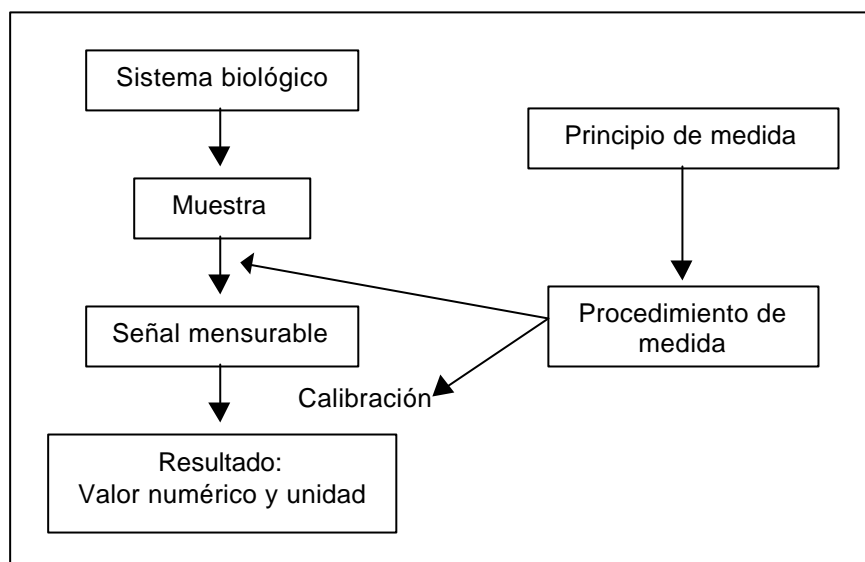


Figura 1.10: *Medición de una magnitud de un sistema biológico.*

Las mediciones realizadas en el laboratorio clínico están sujetas a un error. La definición de error se basa en el supuesto de que existe un valor verdadero de la magnitud que se mide. Sin embargo, este es un concepto teórico, puesto que no puede ser determinado experimentalmente con exactitud, por este motivo se recomienda utilizar el concepto de valor convencionalmente verdadero, que es el obtenido con un procedimiento de medida definitivo o el asignado a un material de referencia. El valor convencionalmente verdadero es el valor atribuido a un magnitud particular y del que se acepta, algunas veces por convenio, que tiene una incertidumbre apropiada para su uso.

La normalización y armonización de los resultados del laboratorio clínico se consigue mediante el establecimiento de un sistema metrológico normalizado, que incluye el uso de procedimientos de medida definitivos, de referencia y recomendados, y el uso de patrones con propiedades conocidas o definidas (patrones primarios o materiales de referencia). Este sistema metrológico mundial uniforme está formado por una serie de conceptos interrelacionados entre sí: trazabilidad, incertidumbre, calibración, procedimiento de medida y material de referencia (Westgard y Klee, 1994), tal y como se muestra en la Figura 1.11.

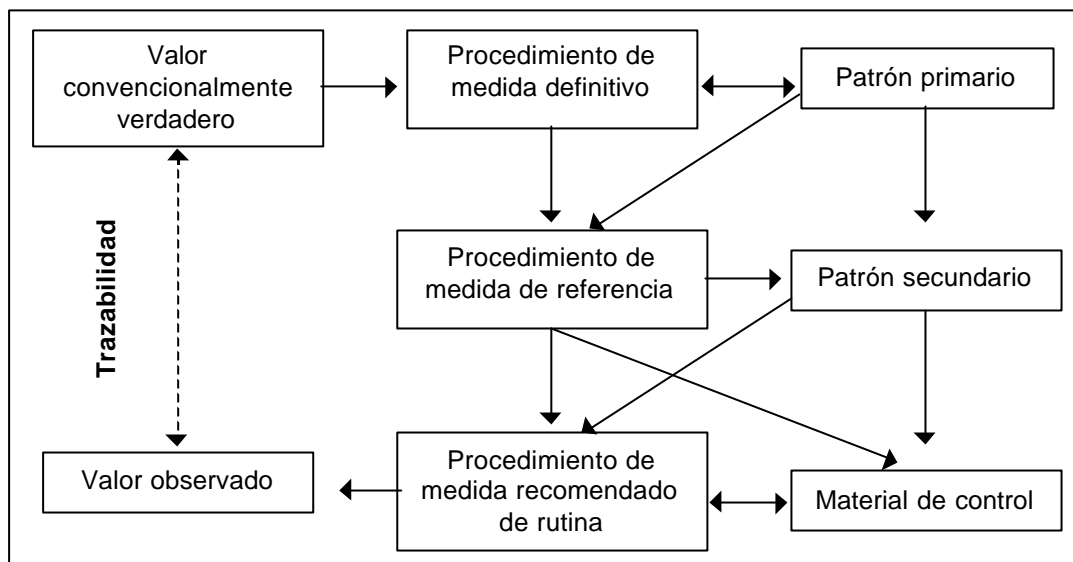


Figura 1.11: Sistema metrológico y sus interrelaciones.

1.4.1. Procedimientos de medida

Un procedimiento de medida es un conjunto de operaciones, descritas de forma suficientemente detallada, que se utilizan para la ejecución de mediciones particulares según un método dado.

Los procedimientos de medida definitivos son aquellos que tienen la máxima calidad metrológica para la medición de una magnitud particular. El valor medio obtenido de múltiples repeticiones se considera la mejor aproximación al valor convencionalmente verdadero. Se utilizan para la evaluación de procedimientos de medida de referencia y para asignar valores a materiales de referencia.

Los procedimientos de medida de referencia son definidos por la Organización Internacional de Normalización (ISO) como *aquellos que han sido exhaustivamente investigados, que describen de forma clara y exacta las condiciones necesarias y los procedimientos para la medición de una o varias propiedades, que han mostrado tener una veracidad y una precisión adecuadas, que pueden ser utilizados para asesorar sobre la exactitud de otros procedimientos de medida de la misma propiedad. Se utilizan para asignar valores y caracterizar un material de referencia.* Es decir, los procedimientos de medida de referencia se utilizan para asignar valores a materiales de referencia secundarios y a controles, y para la evaluación de los procedimientos de medida recomendados de rutina, que son los que se usan habitualmente en el laboratorio para medir magnitudes biológicas.

Un procedimiento de rutina recomendado, es un procedimiento recomendado por sociedades científicas basado en los mismos principios que los procedimientos de referencia y validados respecto a ellos, pero que han de sufrir ligeras modificaciones respecto a este, para que puedan ser utilizados como procedimientos de rutina en el laboratorio. La aceptación de procedimientos de medida recomendados por diferentes sociedades científicas nacionales ha permitido el alcance de grandes avances en el camino de la estandarización (Stamm, 1979).

Un procedimiento de medida de rutina es aquel que se utiliza en el laboratorio para realizar un gran número de medidas individuales. Normalmente la medida la se realiza mediante un analizador capaz de producir resultados con una elevada precisión, pero no necesariamente exactos (Uriano y Gravatt, 1977). Presentan una inexactitud, imprecisión y especificidad adecuadas para su uso en el laboratorio clínico.

1.4.2. Trazabilidad

Según el vocabulario internacional de los términos fundamentales y generales en metrología (Centro Español de Metrología, 1994), la trazabilidad *es la propiedad del resultado de una medida o del valor de un patrón que permite relacionarlo con los patrones adecuados, generalmente nacionales o internacionales, mediante una cadena ininterrumpida de comparaciones que tienen una incertidumbre determinada.*

Las cadenas de trazabilidad pueden tener pocos o muchos pasos entre el resultado de la muestra y el patrón principal. Además, este último puede ser de diversos tipos, aunque idealmente debería existir solamente un patrón principal con aceptación internacional y máxima garantías en la veracidad de su valor asignado.

Hay dos tipos de trazabilidad metrológica (Figura 1.12.). El valor de la magnitud determinado en la muestra es trazable al patrón secundario empleado. Asimismo, el valor del patrón secundario es trazable a un patrón primario o a un material de referencia internacional. El valor del patrón primario es trazable a la definición de la unidad SI de la magnitud, mientras que el material de referencia internacional lo es a una unidad arbitraria.

La trazabilidad debe preverse antes de iniciar la medición de una magnitud. Cada patrón con su valor asignado debe servir para asignar el valor del patrón de nivel metrológico inmediato inferior mediante el procedimiento de medida adecuado. El valor asignado a un patrón debe tener asociada una incertidumbre de los patrones y los procedimientos de medida de los niveles superiores de la jerarquía metrológica.

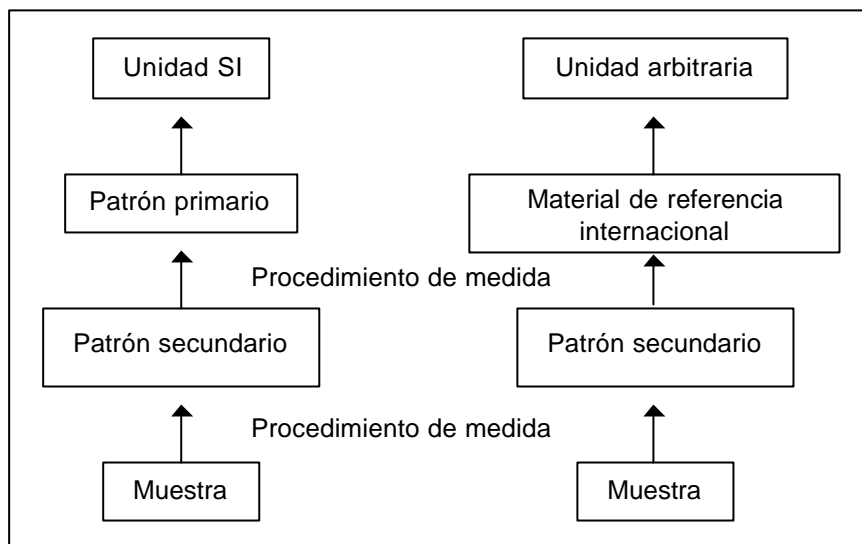


Figura 1.12: Esquema de dos maneras de conseguir la trazabilidad metrológica.

Para seguir la cadena de trazabilidad deben utilizarse protocolos de transferencia, que consisten en una descripción detallada de cómo asignar el valor de una magnitud a un material de referencia utilizando una secuencia específica de procedimientos de medida en los que la calibración se realiza mediante materiales de referencia de jerarquía metrológica superior.

Cabe destacar, que los fabricantes de los reactivos y los calibradores (patrones) utilizados en los procedimientos de medida de rutina, tienen una gran responsabilidad en asegurar la cadena de trazabilidad. Ellos son los responsables de que el valor asignado a sus patrones sea trazable al material de referencia correspondiente de mayor nivel, y que esta trazabilidad sea establecida mediante el uso de protocolos de transferencia. No obstante, el uso de patrones trazables suministrados por los fabricantes no garantiza que los resultados obtenidos en el laboratorio sean trazables al valor convencionalmente verdadero, hasta que cada una de las etapas de la cadena haya sido verificada.

En la Figura 1.13., se muestra entre líneas discontinuas, la zona correspondiente a las etapas que son responsabilidad directa del fabricante en la jerarquía de la calibración. La parte superior es competencia de la organización implicada en la preparación del material de referencia, y la parte inferior es responsabilidad del laboratorio clínico donde se realiza la medición del analito correspondiente.

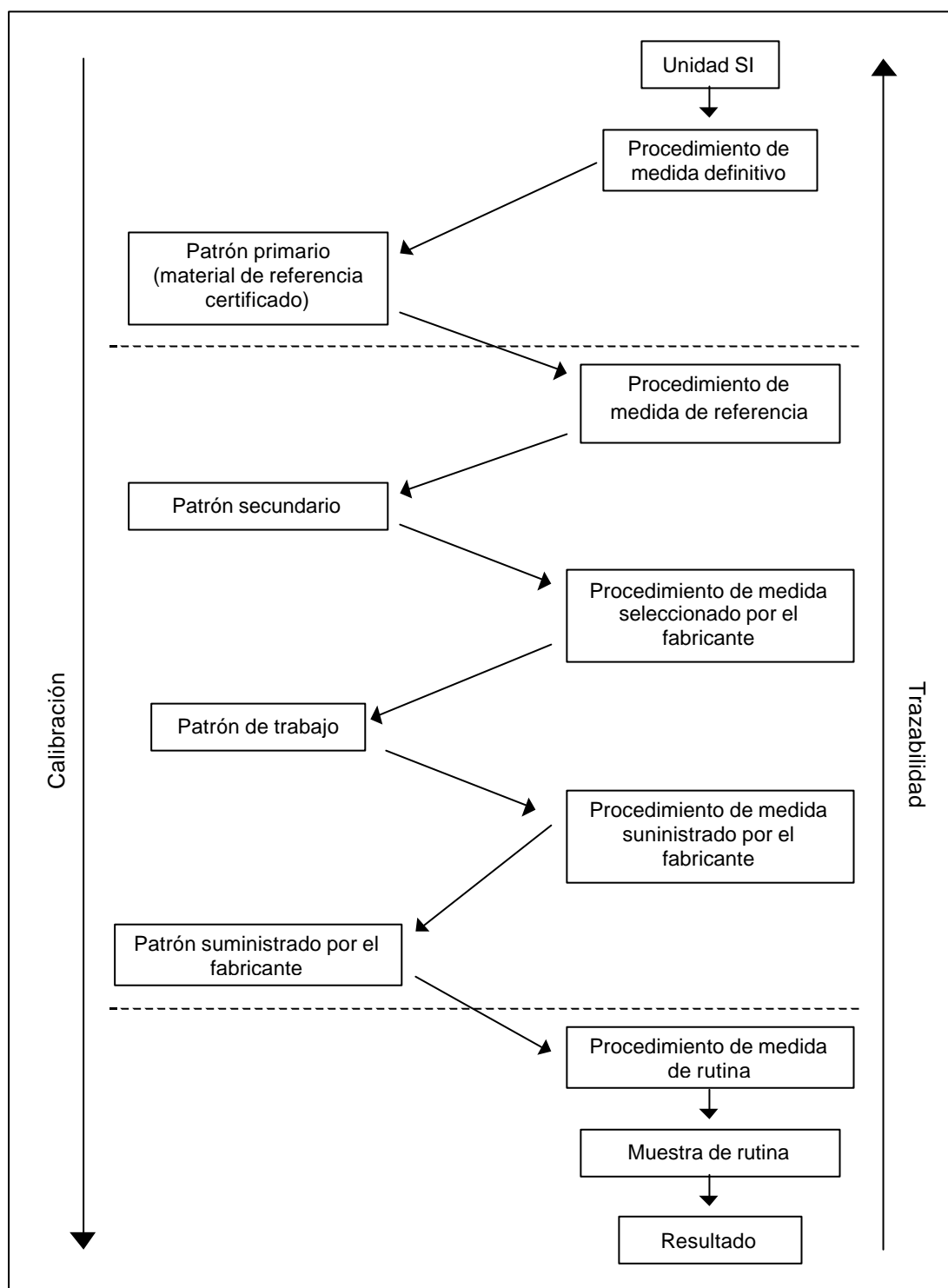


Figura 1.13: Jerarquía de la calibración.

La cadena de trazabilidad puede romperse a causa de los factores que se describen en la Tabla 1.6. (Büttner, 1995).

- Insuficiente definición de la magnitud a medir en las muestras humanas.
- Dificultad de la obtención de patrones primarios.
- Heterogeneidad del componente del patrón (enzimas, anticuerpos y glicoproteínas).
- Diferente especificidad y selectividad de los procedimientos de medida pudiendo invalidar la conmutabilidad del patrón (procedimientos inmunoquímicos).
- Distinta microheterogeneidad individual del componente en las muestras humanas.
- Distinta composición de la matriz del patrón y de las muestras humanas.
- Modificación física o química de la muestra durante la medición.
- Aplicación incorrecta de los sistemas de medida de rutina por parte del laboratorio.

Tabla 1.6: Factores que pueden causar la ruptura de la cadena de trazabilidad.

Actualmente en el laboratorio clínico se pueden dar las siguientes situaciones en cuanto a la trazabilidad del resultado de una medida. Un primer grupo de analitos que tienen definidos procedimientos de medida de referencia y materiales de referencia certificados. En estos casos es posible la trazabilidad a una unidad SI. Un segundo grupo que no tienen procedimiento de medida de referencia pero si material de referencia, en estos casos no es posible la trazabilidad a unidades SI. Un tercer grupo que no tiene material de referencia pero sí procedimiento de medida de referencia, tampoco es posible la trazabilidad a unidades SI. Finalmente un cuarto grupo lo constituyen la mayoría de analitos que no tienen procedimiento de medida de referencia ni material de referencia, en estos casos el fabricante o el laboratorio clínico pueden preparar su propio patrón o procedimiento de medida.

1.4.3. Materiales de referencia

La homogenización de resultados se puede conseguir a través del uso de un mismo procedimiento de medida normalizado con un material de referencia común.

La ISO en su Guía 30: 1992 define material de referencia como aquel *material o compuesto químico del cual una o más propiedades son suficientemente homogéneas y bien definidas para utilizarlo en la calibración de un instrumento, la*

evaluación de un procedimiento de medida o la asignación de valores a otros materiales.

De acuerdo con esta definición, los materiales de referencia deberían tener valores de concentración asignados bajo unas condiciones determinadas con la incertidumbre correspondiente. Estos valores podrían ser utilizados como valores convencionalmente verdaderos para evaluar la exactitud y la veracidad de los procedimientos de rutina.

La normalización de resultados en los procedimientos de inmunoanálisis presenta una gran dificultad. Actualmente existen una gran variedad de inmunoanálisis capaces de cuantificar la misma molécula mediante el uso de distintos reactivos y métodos de medida. Una mejora sustancial en la homogenización de resultados se puede conseguir mediante el uso de materiales de referencia. Sin embargo, cabe destacar que la utilización de este tipo de materiales no garantiza la total armonización de resultados entre laboratorios que utilicen distintos procedimientos de medida (Jeffcoate, 1991).

1.4.3.1. Clasificación de los materiales de referencia

A partir de la definición de material de referencia, pueden considerarse diversos tipos de materiales de referencia que se clasifican de distintas formas según el criterio utilizado:

Según la aplicación, distinguimos entre:

- Material de calibración: se utiliza para calibrar un sistema de medida.
- Material de control: se utiliza en la evaluación de un procedimiento de medida, especialmente para establecer el error sistemático y la imprecisión, y para el control de la calidad de los resultados de medida.
- Patrón: se utiliza para asignar un valor a otros materiales.

Según la jerarquía metrológica, distinguimos entre:

- Patrón primario: se define como un material que ha sido designado, o es ampliamente aceptado, como poseedor de las mejores cualidades metrológicas, cuyo valor es aceptado sin necesidad de referirlo a otros patrones de la misma magnitud, en un contexto específico.

- Patrón secundario: los valores de sus magnitudes se asignan mediante un procedimiento de medida definitivo o de referencia, calibrando con un patrón primario. Es frecuente que se trate de materiales con matriz biológica, con una composición molecular compleja que no puede ser completamente caracterizada.
- Patrón con valor dependiente de un procedimiento: se trata de un material que posee unas magnitudes cuyos valores dependen del procedimiento usado para medirlas. En algunos casos pueden desempeñar un papel metrológico equivalente al de un patrón primario. Sus valores no poseen trazabilidad respecto a los de los materiales de referencia primarios o secundarios, pero pueden poseerla respecto a los de otro material del mismo tipo y de mayor rango. Un ejemplo característico son los materiales con enzimas a los que se ha asignado un valor de concentración catalítica.

Según el ámbito que se pretende dar a su utilización se dividen en:

- Patrón nacional o regional: diversos países, a través de organizaciones públicas o sociedades científicas, han establecido sistemas de la calidad para los laboratorios clínicos que incluyen materiales de referencia para asegurar la trazabilidad de las mediciones en su ámbito geográfico o de su influencia política. Es el caso del National Institute of Standards and Technology (NIST) de Estados Unidos o de la Oficina Comunitaria de Referencia (BCR) en la Unión Europea.
- Patrón internacional: los prepara alguna organización internacional con la finalidad de hacer compatible la trazabilidad de las mediciones entre los distintos países. Es el caso de los materiales biológicos de la OMS.

Según la fiabilidad de los valores declarados se pueden encontrar:

- Material de referencia con valor certificado: se acompaña de un certificado emitido por el organismo responsable de su preparación, en el que consta el valor obtenido de la magnitud considerada y su incertidumbre mediante un procedimiento adecuado.
- Material de referencia con valor asignado: el valor ha sido establecido de forma arbitraria por convenio (por ejemplo, los materiales de referencia biológicos de la OMS), mediante evidencias preliminares o de forma menos

rigurosa que el certificado (por ejemplo, los materiales de control valorados suministrados comercialmente y algunos materiales de calibración).

1.4.3.2. Requisitos de los materiales de referencia

Los materiales de referencia han de cumplir una serie de requisitos técnicos para que puedan ser considerados como tales. Estos requisitos son: composición, homogeneidad, estabilidad y commutabilidad (Guía ISO 30, 1992).

- Composición: Un material de referencia puede ser un compuesto químico puro o una mezcla, en forma sólida o líquido. Su composición puede estar completamente definida o ser parcialmente desconocida, como sucede con los materiales biológicos. El origen puede ser orgánico, inorgánico o biológico, y en este caso animal, humano u obtenido mediante técnicas de biología molecular. Los de origen biológico normalmente requieren una purificación previa, lo que obliga posteriormente a investigar las posibles impurezas. La matriz puede ser sintética, semisintética, o natural; en el caso de que sea sintética o semisintética, es indispensable que no cause interferencias (efecto matriz).
- Homogeneidad: Es un requisito indispensable que el material de referencia sea de estructura o composición uniforme respecto a una o más magnitudes. Las mediciones realizadas en muestras tomadas en diferentes partes del material han de proporcionar valores comprendidos dentro de los límites de incertidumbre apropiadamente fijados. Los materiales de referencia pueden ser clasificados respecto al grado de su homogeneidad como muy homogéneos (variabilidad de una unidad de material a otra indetectable), muy inhomogéneos (variabilidad del material causa más importante de la incertidumbre) y moderadamente homogéneos (variabilidad del material de la misma magnitud que el error de la medida) (Marchandise y Colinet, 1983).
- Estabilidad: Es la capacidad de un material de mantener el valor de una magnitud dentro de unos límites establecidos cuando se conserva en unas condiciones determinadas y durante un período de tiempo previamente establecido. Este periodo puede ser más o menos largo dependiendo de la utilización del material; en los materiales biológicos de aplicación en el laboratorio clínico suelen ser de 8-10 años. Si el material no es estable a lo largo del tiempo, limitará su uso en aquellos controles de calidad a largo plazo. Para predecir la estabilidad en periodos

de tiempo largos se realizan estudios de estabilidad acelerada, comprobando también los resultados en tiempo real (Moss, 1994).

- Conmutabilidad: Debido a la falta de exactitud de los procedimientos de medida, a los numerosos componentes potencialmente interferentes que pueden contener las muestras biológicas y a su heterogeneidad, la trazabilidad de los resultados respecto a los patrones primarios queda comprometida. Por tanto, uno de los requisitos de los materiales de referencia es la conmutabilidad, que se define *como la capacidad de un material de tener la misma relación numérica entre los resultados de las mediciones realizadas con un determinado grupo de procedimientos de medida, que la relación obtenida cuando los mismos procedimientos se aplican a los tipos de materiales para los que han sido propuestos*. Es decir, el material ha de comportarse de forma similar a las muestras humanas para determinados procedimientos de medida (Moss, 1997).

La conmutabilidad se refiere siempre a un determinado número de procedimientos de medida, que debe comprender como mínimo dos procedimientos distintos. En este contexto el “material” es un material de referencia del que quiere verificarse su conmutabilidad y “los tipos de material” corresponden a un determinado número de muestras humanas, de individuos sanos y de pacientes con alguna alteración cuyo efecto sobre la magnitud en estudio sea conocido, de esta forma se cubre un amplio rango de valores de la magnitud. Por lo tanto, la conmutabilidad es una propiedad tanto del componente que reside en el material de referencia, como del componente que se encuentra en las muestras de origen humano (Moss y Whicher, 1995).

La falta de conmutabilidad entre el material de referencia y los especímenes humanos puede ser debida al efecto matriz, es decir a la diferente composición de ambas matrices, o al componente que se quiere medir, ya que este puede presentar características diferentes a las del que se encuentra en las muestras humanas debido a su origen (ej.: animal, recombinante) o a la falta de heterogeneidad (ej.: isoformas, isoenzimas) (Franzini y Ceriotti, 1998).

En la Tabla 1.7. se muestran algunas de las características esenciales para asegurar y determinar la conmutabilidad de un material de referencia.

- Las propiedades del material han de ser lo mas similares a las del componente en su matriz natural.
- Los procedimientos de medida escogidos para la verificación de la conmutabilidad del material tienen que tener idéntica, o muy parecida, especificidad para el componente. Si existe procedimiento de referencia se escogerá este y el de rutina.
- La relación numérica entre los valores de los resultados obtenidos con los dos procedimientos de medida ha de ser constante, dentro de los límites del error experimental, para todas las de muestras.

Tabla 1.7: *Características esenciales para asegurar y determinar la conmutabilidad de un material de referencia.*

1.4.3.3. Materiales de referencia certificados y organizaciones implicadas en su preparación

Según la Guía 30:1992 de la ISO, un material de referencia certificado se define como *un material de referencia acompañado de un certificado, del cual una o más de sus propiedades tiene un valor que ha sido certificado mediante un procedimiento de medida que permite establecer su trazabilidad, y cada valor certificado viene acompañado de una incertidumbre con un nivel de confianza.*

Los materiales de referencia certificados los preparan organizaciones de carácter nacional, plurinacional o internacional con responsabilidad de las mediciones del laboratorio clínico. La condición para certificar un material de referencia es la disposición de un lote de la calidad adecuada y que cumpla con los requisitos de estabilidad, homogeneidad y conmutabilidad.

Un aspecto crítico en la preparación de los materiales de referencia certificados es la obtención del valor certificado. Siempre que sea posible, este ha de ser la mejor estimación posible del valor verdadero, obtenido, por ejemplo, empleando un procedimiento de medida definitivo. Cuando no existe procedimiento definitivo, como es el caso de los inmunoanálisis y las mediciones de enzimas, se acepta utilizar uno o varios procedimientos de exactitud equivalente con la debida fiabilidad para obtener un valor verdadero de forma consensuada, denominado valor de consenso, y que corresponde a la media de los valores obtenidos en un estudio entre los laboratorios después de la eliminación de los valores estadísticamente diferentes o aberrantes. También puede darse el caso de que el valor dependa del procedimiento de medida utilizado (Gella y Canalias, 1998). En cualquier caso, el certificado ha de contener una información amplia en relación a los procedimientos utilizados y a los criterios estadísticos aplicados para obtener el valor certificado.

En cuanto a la preparación de los materiales de referencia certificados, existen diversas organizaciones nacionales e internacionales implicadas:

- Organización Mundial de la Salud (OMS). En 1924 se creó el Comité de Expertos en Normalización Biológica (ECBS), que más tarde fue acogido por la OMS con la finalidad de supervisar la preparación de los materiales de referencia internacionales (IRM) o patrones internacionales (IS). Los depositarios de estos productos son diversos laboratorios establecidos en varios países, que se encargan de distribuirlos a las instituciones nacionales y a la industria, pero no a laboratorios individuales. Estos materiales tienen un valor asignado de forma arbitraria, expresado en unidades internacionales de la OMS.
- Oficina Comunitaria de Referencia (BCR). Es el organismo de la Unión Europea encargado de la preparación de materiales de referencia certificados (BCR). Se creó en 1973 con la finalidad de armonizar las mediciones entre los laboratorios de distintos países de la Unión Europea. Actualmente el Instituto de Materiales y Mediciones de Referencia (IRMM) es el depositario y encargado de la distribución de los materiales de referencia. En la Tabla 1.8. se muestran algunos materiales de referencia certificados distribuidos por el IRMM de la Comunidad de Europea.

Descripción	Código	Valor certificado
Apolipoproteína A-I	BCR-393	1,06 ± 0,05 g/L
Apolipoproteína A-II	BCR-394	0,321 ± 0,019 g/L
Tiroglobulina	BCR-457	0,324 ± 0,018 g/L
α_1 -Fetoproteína	BCR-486	100 ± 9 μ g
Calicreína (antígeno específico de la prostata)	BCR-613	70,8 ± 6,2 μ g
Creatina-quinasa 1	BCR-299	5,42 ± 0,17 μ kat/L
γ -Glutamyltransferasa	BCR-319	1,447 ± 0,035 μ kat/L
Fosfatasa alcalina	BCR-371	4,23 ± 0,10 μ kat/L
L-lactato-deshidrogenasa 1	BCR-404	10,7 ± 0,5 μ kat/L
Fosfatasa ácida prostática	BCR-410	0,466 ± 0,012 μ kat/L
Alanina-aminotransferasa	BCR-426	2,14 ± 0,05 μ kat/L
α -Amilasa pancreatica	BCR-476	9,25 ± 0,17 μ kat/L
Creatina-quinasa 2	BCR-608	1,12 ± 0,03 μ kat/L

Tabla 1.8: Algunos materiales de referencia certificados distribuidos por el Instituto de Materiales y Mediciones de Referencia (IRMM).

- National Institute of Standards and Technology (NIST). Fue creado en 1901 en Estados Unidos para la producción y custodia de patrones. Prepara materiales de referencia certificados (SRM), y los denominados NIST Traceable Standard Reference Materials (NTRSM). Diferentes organizaciones preparan materiales de referencia por encargo del NIST, después este les da el visto bueno y los convierte en NTRSM. De esta forma se pueden preparar en mayor cantidad y el precio no es tan elevado.

Otros organismos implicados en la preparación de materiales de referencia son: el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), el Center for Disease Control (CDC) y el College of American Pathologists (CAP), los tres de los Estados Unidos; y el National Institute of Biological Standard and Control (NIBSC) de Gran Bretaña, que distribuye materiales de la OMS y prepara algunos propios.