

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PRODUCTOS, REACTIVOS Y EQUIPOS

Los productos y reactivos utilizados fueron los siguientes:

ABBOTT DIAGNOSTICS

- Equipo para la medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 en el analizador IMx[®].
- Patrones de concentración de masa de creatina-quinasa 2 Calibrador Mode 1.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH

- Blue-Sepharosa CL 6B.
- DEAE-Sepharcel.
- Sephadex G-50.
- Patrón de baja masa molar para electroforesis.
- Patrón de punto isoeléctrico para isoelectroenfoque (pH entre 3 y 10).
- Geles de poliacrilamida Ampholine[®] PAG plate

AMICON

- Concentradores Centricon[®]-10.
- Concentradores Microcon[®]-10.
- Membranas de ultrafiltración Diaflo[®] PM-10.

BIO-RAD

- Equipo para la medición de la concentración de proteína por el método de Coomassie Bio-Rad[®] Protein assay.

BIOSYSTEMS

- Equipo para la medición de la concentración catalítica de creatina-quinasa.
- Equipo para la medición de la concentración catalítica de creatina-quinasa 2.
- Equipo para la medición de la concentración catalítica de aspartato-aminotransferasa.
- Equipo para la medición de la concentración catalítica de alanina-aminotransferasa.
- Equipo para la medición de la concentración catalítica de L-Lactato-deshidrogenasa.
- Equipo revelador de peroxidasa.
- Equipo revelador de fosfatasa alcalina.
- Microcolumnas de cromatografía.

CHIRON DIAGNOSTICS

- Equipo para la medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 en el analizador ACS 180[®].
- Calibrador de concentración de masa de creatina-quinasa 2.

DADE-BEHRING DIAGNOSTICS

- Equipo para la medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 en el analizador Stratus[®].
- Controles de concentración de masa de creatina-quinasa 2.

DPC/DIPESA

- Equipo para la medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 en el analizador Immulite[®].
- Sustrato quimioluminescente.

- Controles de concentración de masa de creatina-quinasa.

GENZYME

- Anticuerpo monoclonal contra la creatina-quinasa 3.
- Anticuerpo monoclonal contra la creatina-quinasa 1.

IRMM

- Material de referencia de creatina-quinasa 2 (BCR 608).

MEDIX BIOCHEMICA

- Anticuerpo monoclonal contra la creatina-quinasa 2.

MERCK

- Acetato de magnesio.
- Azul de bromofenol.
- Azul brillante de Coomassie R250.
- Etanol.
- 2-Mercaptoetanol.
- Tween-20.

MILLIPORE

- Membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno) Imobilon[®]-P.

NIST

- Material de referencia de albúmina sérica bovina (SRM 927b).

ROCHE DIAGNOSTICS

- Equipo para la medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 en el analizador Elecsys[®].
- Patrones de concentración de masa de creatina-quinasa 2.
- Controles de concentración de masa de creatina-quinasa 2.
- Hexoquinasa.
- Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa
- Adenosina-5'-difosfato.
- Albúmina sérica bovina.

SIGMA

- Acrilamida.
- Anticuerpo contra IgG de ratón marcado con peroxidasa.
- Anticuerpo contra IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina.
- Albúmina sérica bovina.
- Albúmina sérica humana.
- Bis-acrilamida.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS).
- N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED).

El resto de productos utilizados fueron de calidad suficiente para el estudio.

Los equipos utilizados fueron los siguientes:

ABBOTT DIAGNOSTICS

- Analizador IMx[®].

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH

- Colector de fracciones FRAC-200.
- Bomba.
- Columna XK-26.
- Fuente de electroforesis Multidrive XL[®].
- Sistema Multiphor[®] II.
- Equipo para la transferencia horizontal Novablot.

AMICON

- Celda de ultrafiltración DIAFLO[®] 8050 y 8400.

BECKMAN

- Centrifuga J2.21.
- Rotor JA.14.
- Rotor JA.20.
- Espectrómetro BECKMAN DU-7.

BIO-RAD

- Secador de geles Bio-Rad[®] Gel Dryer modelo 543.

CHIRON DIAGNOSTICS

- Analizador ACS 180[®].

CRISON

- pHmetro micropH2002.

DADE-BEHRING DIAGNOSTICS

- Analizador Stratus[®].

DPC/DIPESA

- Analizador Immulite[®].

FLUKE

- Termómetro de sonda 51 K/J.

HOEFER

- Sistema de electroforesis MIDGET 2050 LKB.

LABSYSTEMS

- Lector de microplacas multiskan RC.
- Pipeta multicanal automática.

ROCHE DIAGNOSTICS

- Analizador Elecsys[®].
- Analizador Cobas Mira[®].

2.2. PURIFICACIÓN DE LA CREATINA-QUINASA 2 DE MIOCARDIO HUMANO

La purificación de la creatina-quinasa 2 a partir de tejido miocárdico humano se realizó siguiendo el procedimiento descrito para la preparación del material de referencia de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa (BCR 608) (Gella y cols., 1998), según una modificación del procedimiento descrito inicialmente por Ritter y cols. (1981).

2.2.1. Obtención del extracto crudo

El tejido miocárdico humano se obtuvo, mediante autopsia, de individuos fallecidos que no habían sufrido ninguna alteración coronaria, ni ninguna enfermedad infecciosa o transmisible. El órgano se conservó a -20 °C hasta su utilización.

El día anterior a la purificación, el órgano se descongeló a 4 °C. Se eliminaron los vasos y las aurículas para obtener el músculo ventricular limpio. Se troceó con el bisturí y se homogeneizó con un homogeneizador Politron (Kinematika) en 2 volúmenes de tampón de homogeneización compuesto por: Tris-HCl 50 mmol/L, EDTA 0,9 mmol/L, 2-mercaptoetanol 10 mmol/L, pH 8,0.

El homogenado se agitó durante 45 minutos y se centrifugó a 30.000 x *g* durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró en lana de vidrio para eliminar la grasa restante, y se identificó como extracto crudo. Todo el proceso se realizó a 4 °C.

2.2.2. Precipitación con etanol

La precipitación con etanol se realizó en varias fases. En la primera fase, al extracto crudo se le añadió lentamente mediante un embudo de decantación etanol hasta un 50% (v/v). El proceso se realizó con agitación constante a 4 °C, durante un tiempo total de 90 minutos. La mezcla se centrifugó a 15.000 x *g* durante 15 minutos a 4 °C, recogiendo el sobrenadante y eliminando el precipitado.

En la segunda fase, al sobrenadante se le añadió etanol hasta un 70% (v/v) bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. La mezcla se centrifugó, al igual que en la fase anterior, a 15.000 x *g* durante 15 minutos a 4 °C, pero esta vez el sobrenadante fue eliminado, y el precipitado se resuspendió en el mínimo volumen posible de tampón de homogeneización.

Para finalizar, el precipitado, una vez resuspendido, se centrifugó a 30.000 x *g* durante 15 minutos a 4 °C, y el sobrenadante, que contenía la creatina-quinasa, se

dializó frente a 2 L de tampón de homogeneización durante toda una noche a 4 °C.

2.2.3. Purificación mediante procedimientos cromatográficos

La purificación de la creatina-quinasa 2 mediante procedimientos cromatográficos se realizó utilizando dos tipos de geles. En primer lugar, se utilizó un gel de intercambio aniónico (DEAE-Sephacel) gracias al cual se separó la isoenzima 2 de la isoenzima 3 y otras proteínas contaminantes, bajo unas condiciones determinadas de pH y fuerza iónica.

La obtención de la creatina-quinasa 2 pura de la fracción enriquecida se realizó mediante una cromatografía de afinidad con el gel Blue-Sepharosa CL-6B. Este gel consiste en una resina de Sepharosa CL-6B unida covalentemente a un colorante, el Cibacron Blue 3G-A. La estructura del colorante permite separar enzimas, como las quinasas, que interaccionan específicamente con el Cibacron Blue 3G-A debido a la existencia de una gran similitud estructural entre este y el ADP/ATP, o bien proteínas, como la albúmina, que se unen al gel de una manera inespecífica mediante interacciones electroestáticas e hidrofóbicas entre los residuos proteicos y el grupo aniónico aromático del colorante.

Así pues, la creatina-quinasa 2 se unía al Cibacron Blue 3G-A y se eluía inespecíficamente junto con la albúmina al incrementar la fuerza iónica del tampón de elución. La separación de las dos proteínas se realizó mediante una segunda cromatografía en el mismo gel y una elución específica con ADP. Bajo estas condiciones sólo se eluía la creatina-quinasa 2.

2.2.3.1. Cromatografía de intercambio aniónico

El dializado obtenido en la precipitación con etanol se aplicó a una columna de 2,6 x 70 cm conteniendo 300 mL de DEAE-Sephacel, previamente equilibrado con tampón de homogeneización, manteniéndose la relación de mg de proteína aplicada por mL de gel empacado entre 1,5 y 3,5. El flujo de aplicación fue de 30 mL/h.

Tras la aplicación de la muestra, la columna se lavó con 1,5 volúmenes de tampón de homogeneización a un flujo de 50 mL/h. Durante todo el proceso se recogieron fracciones de 10 mL, en las que se midió la concentración catalítica de la creatina-quinasa (apartado 2.3.1.) y la concentración de proteína por absorbancia a 280 nm (apartado 2.5.1.). Aquellas fracciones con concentración catalítica, que contenían principalmente la creatina-quinasa 3, se mezclaban y concentraban de 5 a

10 veces por ultrafiltración bajo presión de nitrógeno en una célula de agitación y con membranas Diaflo PM10 de Amicon. El concentrado se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La isoenzima 2 de la creatina-quinasa retenida en el gel se eluyó posteriormente con 4 volúmenes de un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,5 mol/L en tampón de homogeneización. El flujo de elución fue de 50 mL/h. En las fracciones recogidas se midió: la conductividad, la concentración catalítica de la creatina-quinasa y la concentración de proteína por absorbancia a 280 nm. Aquellas fracciones con actividad catalítica se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración, como se ha indicado anteriormente. El concentrado se dializó toda una noche frente a 2 L de tampón de homogeneización a pH 7,0.

Todo el proceso se realizó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.3.2. Cromatografía de afinidad

Una vez dializada la muestra, se aplicó a una columna de 2,6 x 50 cm empacada con 50 mL de Blue-Sepharosa CL-6B previamente equilibrada con el tampón de homogeneización a pH 7,0. El flujo de aplicación fue de 30 mL/h. La relación de proteína aplicada por mL de gel empacado fue de 1 mg/mL.

La columna se lavó con 2 volúmenes de tampón a un flujo de 60 mL/h. Se recogieron fracciones de 5 mL en las que se midió la concentración catalítica de la creatina-quinasa y la concentración de proteína por absorbancia 280 nm.

La elución de la isoenzima 2 se realizó mediante 4 volúmenes de tampón con NaCl 0,3 mol/L. Las fracciones con actividad enzimática se concentraron y se dializaron toda la noche frente al tampón de homogeneización a pH 7,0.

El gel Blue-Sepharosa se regeneró para poder aplicar de nuevo la muestra. En primer lugar se lavó con 3 volúmenes de tampón de homogeneización a pH 7,0 con NaCl 3 mol/L. Seguidamente se alternaron cuatro lavados con dos tampones de diferente composición, un tampón a un pH básico compuesto por Tris-HCl 0,1 mol/L, NaCl 0,5 mol/L, pH 8,5, y otro a un pH ácido compuesto por acetato de sodio 0,1 mol/L, NaCl 0,5 mol/L, pH 4,5. Finalmente se equilibró con el tampón de homogeneización a pH 7,0.

Una vez regenerada la columna, la muestra dializada procedente de la anterior cromatografía se aplicó a un flujo de 30 mL/h. De igual modo, la columna se lavó con 2 volúmenes de tampón a un flujo de 60 mL/h, recogándose fracciones de 5 mL, en las que se midió la concentración catalítica de la creatina-quinasa y la proteína por

absorbancia a 280 nm.

Esta vez la elución de la creatina-quinasa 2 se realizó con ADP 5 mmol/L en tampón de homogeneización a pH 7,0. Se recogieron fracciones de 5 mL, en las que se midió únicamente la concentración catalítica, por que a 280 nm además de las proteína absorbía el ADP. Aquellas fracciones con actividad enzimática se mezclaron y se concentraron. El concentrado final se alicuotó, y se conservó a -80 °C.

Todo el proceso se realizó a 4 °C.

El esquema del procedimiento de purificación de la creatina-quinasa 2 se detalla en la Figura 2.1.

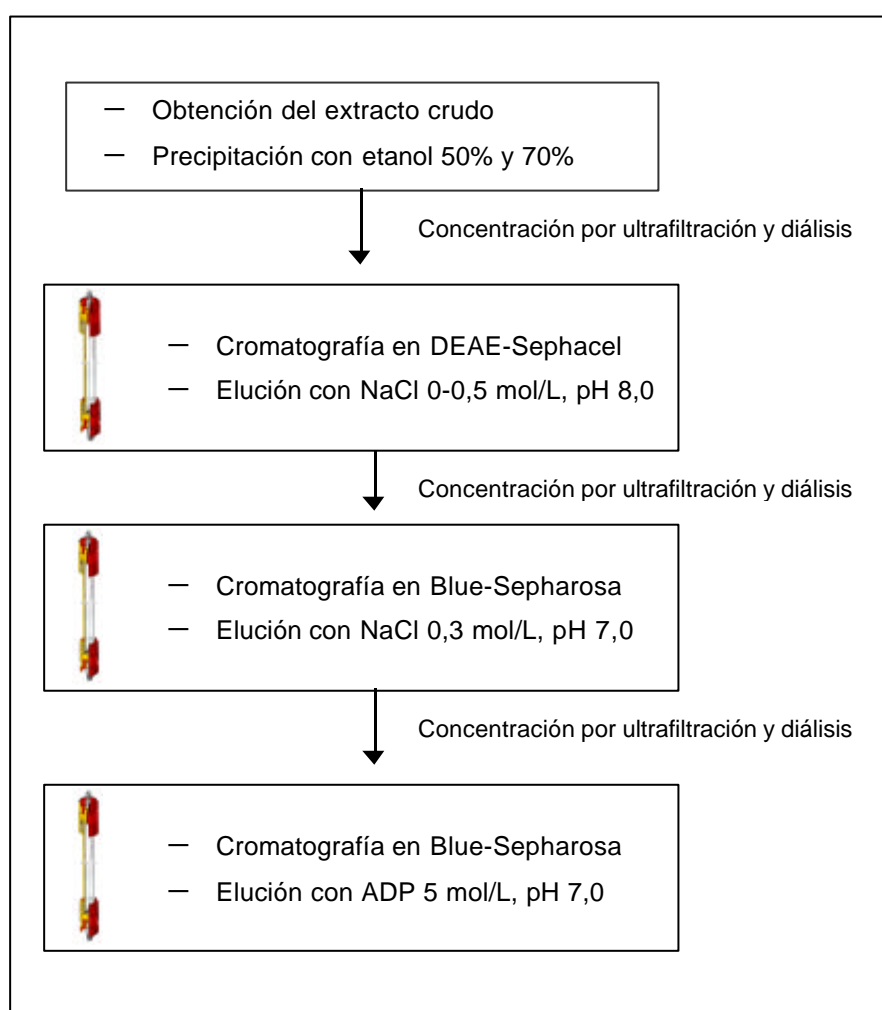


Figura 2.1: Esquema del procedimiento de purificación de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa a partir de tejido miocárdico humano.

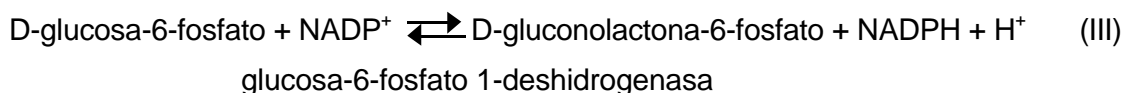
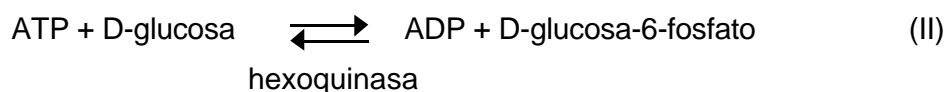
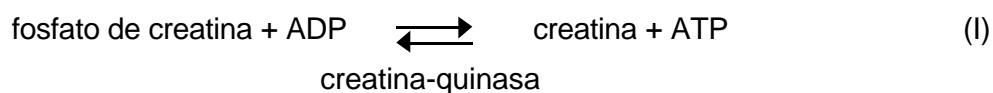
2.3. MEDICIÓN DE CONCENTRACIONES CATALÍTICAS

Todas las mediciones de concentración catalítica se realizaron a 37 °C en un analizador Cobas Mira (Roche).

2.3.1. Creatina-quinasa total

La medición de la concentración catalítica de la creatina-quinasa se realizó siguiendo el procedimiento de medida recomendado por la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) (Arenas y Gella, 1988).

El método se basa en la secuencia de tres reacciones acopladas: (I) la reacción catalizada por la creatina-quinasa, (II) la reacción auxiliar catalizada por la hexoquinasa, y (III) la reacción indicadora catalizada por la glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa, dando lugar a la formación del NADPH que se mide a 340 nm.



El equilibrio de la reacción catalizada por la creatina-quinasa está desplazado hacia la formación de creatina y ATP a valores de pH entre 6,0-7,0. Esta reacción principal es acoplada a través de la reacción auxiliar, catalizada por la hexoquinasa, a una reacción indicadora formadora de NADPH, catalizada por la glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa.

Para las mediciones se emplearon los reactivos de un equipo comercial de BioSystems, siendo la composición final del reactivo de trabajo: Imidazol 104 mmol/L, EDTA 2,08 mmol/L, acetato de magnesio 10,4 mmol/L, ADP 2,08 mmol/L, AMP 5,2 mmol/L, P1, P5-di(adenosina-5'-) pentafofosfato 10,4 μmol/L, D-glucosa 20,8 mmol/L, fosfato de creatina 31,2 mmol/L, NADP⁺ 2,08 mmol/L, N-acetilcisteína 20,8 mmol/L, hexoquinasa 52 μkat/L, glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa 34,3 μkat/L, pH 6,5.

En la Tabla 2.1. se describen las condiciones de medida utilizadas en la medición de la concentración catalítica de la creatina-quinasa.

Longitud de onda	340 nm
Paso de luz	0,6 cm
Temperatura	37 °C
Reactivo de trabajo	0,250 mL
Diluyente (agua)	0,030 mL
Muestra	0,010 mL
Tiempo de incubación	5 minutos
Intervalo de lectura	25 s
Número de lecturas	7

Tabla 2.1: Condiciones para la medición de la concentración catalítica de la creatina-quinasa.

A partir del $\Delta A/\text{min}$ obtenido en el intervalo de mediciones, se calculó la concentración catalítica, teniendo en cuenta que el coeficiente de absorción molar del NADPH a 340 nm es de $630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. El analizador realizaba automáticamente una verificación de la linealidad de la reacción.

$$\Delta A/\text{min} \times 128 = \mu\text{kat/L}$$

2.3.2. Creatina-quinasa 2

La medición de la concentración catalítica de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa se realizó por inmunoinhibición (Würzburg y cols., 1976). La subunidad M de la creatina-quinasa es inhibida por un anticuerpo específico que no afecta a la subunidad B. La concentración catalítica de la subunidad B de la isoenzima se midió, empleando las reacciones acopladas de la hexoquinasa y de la glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa descritas en el apartado anterior, a partir de la velocidad de formación del NADPH que se mide a 340 nm.

Para las mediciones se emplearon los reactivos de un equipo comercial de BioSystems, siendo la composición final del reactivo de trabajo: Anticuerpo contra la subunidad M de la creatina-quinasa capaz de inhibir $16,6 \mu\text{kat/L}$ de subunidad M humana, Imidazol 104 mmol/L , EDTA $2,08 \text{ mmol/L}$, acetato de magnesio $10,4 \text{ mmol/L}$, ADP $2,08 \text{ mmol/L}$, AMP $5,2 \text{ mmol/L}$, P1, P5-di(adenosina-5'-) pentafofato $10,4$

$\mu\text{mol/L}$, D-glucosa 20,8 mmol/L, fosfato de creatina 31,2 mmol/L, NADP^+ 2,08 mmol/L, N-acetilcisteína 20,8 mmol/L, hexoquinasa 52 $\mu\text{kat/L}$, glucosa-6-fosfato1-deshidrogenasa 34,3 $\mu\text{kat/L}$, pH 6,5.

En la Tabla 2.2 se describen las condiciones de medida utilizadas en la medición de la concentración catalítica de la creatina-quinasa 2.

Longitud de onda	340 nm
Paso de luz	0,6 cm
Temperatura	37 °C
Reactivo de trabajo	0,200 mL
Diluyente (agua)	0,020 mL
Muestra	0,008 mL
Tiempo de incubación	10 min
Intervalo de lectura	25 s
Número de lecturas	12

Tabla 2.2: Condiciones para la medición de la concentración catalítica de la creatina-quinasa 2.

A partir del $\Delta A/\text{min}$ obtenido en el intervalo de mediciones se calculó la concentración catalítica, teniendo en cuenta que el coeficiente de absorción molar del NADPH a 340 nm es de $630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, y que la concentración catalítica de la isoenzima 2 era el doble del valor obtenido para la subunidad B. El analizador realizaba automáticamente una verificación de la linealidad de la reacción.

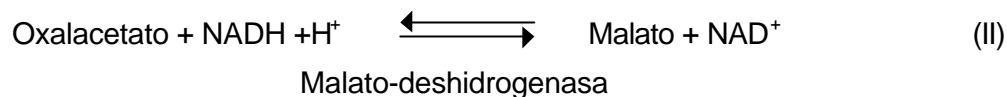
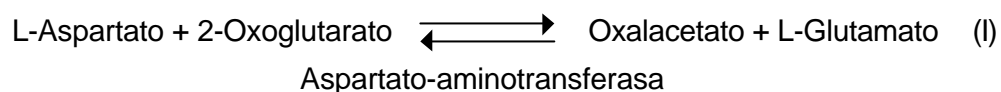
$$\Delta A/\text{min} \times 248 = \mu\text{kat/L}$$

2.3.3. Aspartato-aminotransferasa

La medición de la concentración catalítica de la aspartato-aminotransferasa se realizó siguiendo el procedimiento de medida recomendado por la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) (Gella y cols., 1987).

La aspartato-aminotransferasa cataliza (I) la transferencia del grupo amino del L-aspartato al 2-oxoglutarato, formando oxalacetato y L-glutamato. La concentración catalítica se mide empleando la reacción acoplada de la malato-deshidrogenasa que

cataliza la reducción de oxalacetato a malato (II), a partir de la velocidad de desaparición del NADH que se mide a 340 nm.



Para las mediciones se emplearon los reactivos de un equipo comercial de BioSystems, siendo la composición final del reactivo de trabajo: Tris 86,3 mmol/L, L-aspartato 258,8 mmol/L, 2-oxoglutarato 12,9 mmol/L, NADH 0,196 mmol/L, fosfato de piridoxal 98 $\mu\text{mol/L}$, malato-deshidrogenasa 7,7 $\mu\text{kat/L}$, L-lactato-deshidrogenasa 11 $\mu\text{kat/L}$, pH 7,5.

En la Tabla 2.3 se describen las condiciones de medida utilizadas en la medición de la concentración catalítica de la aspartato-aminotransferasa.

Longitud de onda	340 nm
Paso de luz	0,6 cm
Temperatura	37 °C
Reactivo de trabajo	0,100 mL
Diluyente (agua)	0,005 mL
Muestra	0,005 mL
Tiempo de incubación	2 minutos
Intervalo de lectura	25 s
Número de lecturas	7

Tabla 2.3: Condiciones para la medición de la concentración catalítica de la aspartato-aminotransferasa.

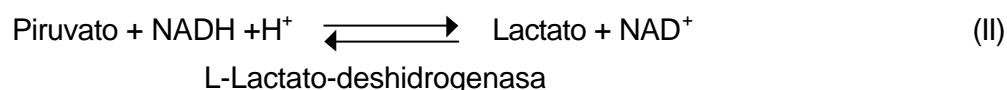
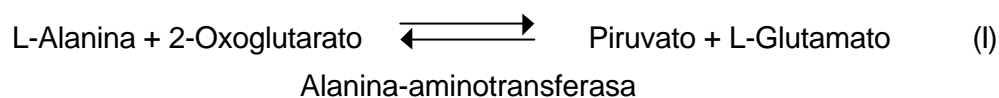
A partir del $\Delta A/\text{min}$ obtenido en el intervalo de mediciones, se calculó la concentración catalítica, teniendo en cuenta que el coeficiente de absorción molar del NADH a 340 nm es de $630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. El analizador realizaba automáticamente una verificación de la linealidad de la reacción.

$$\Delta A/\text{min} \times 97 = \mu\text{kat/L}$$

2.3.4. Alanina-aminotransferasa

La medición de la concentración catalítica de la alanina-aminotransferasa se realizó utilizando el procedimiento de medida recomendado por la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) (Gella y cols., 1987).

La alanina-aminotransferasa cataliza (I) la transferencia del grupo amino de la L-alanina al 2-oxoglutarato, formando piruvato y L-glutamato. La concentración catalítica se mide empleando la reacción acoplada de la L-lactato-deshidrogenasa que cataliza la reducción de piruvato a lactato (II), a partir de la velocidad de desaparición del NADH que se mide a 340 nm.



Para las mediciones se emplearon los reactivos de un equipo comercial de BioSystems, siendo la composición final del reactivo de trabajo: Tris 107,8 mmol/L, L-alanina 539,2 mmol/L, 2-oxoglutarato 16,2 mmol/L, NADH 0,196 mmol/L, fosfato de piridoxal 98 $\mu\text{mol/L}$, L-lactato-deshidrogenasa 22,5 $\mu\text{kat/L}$, pH 7,3.

En la Tabla 2.4. se describen las condiciones de medida utilizadas en la medición de la concentración catalítica de la alanina-aminotransferasa.

Longitud de onda	340 nm
Paso de luz	0,6 cm
Temperatura	37 °C
Reactivo de trabajo	0,100 mL
Diluyente (agua)	0,005 mL
Muestra	0,005 mL
Tiempo de incubación	2 minutos
Intervalo de lectura	25 s
Número de lecturas	7

Tabla 2.4: Condiciones para la medición de la concentración catalítica de la alanina-aminotransferasa.

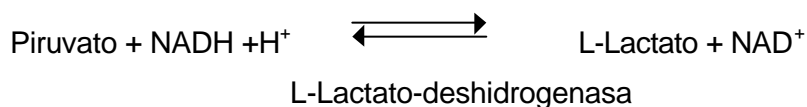
A partir del $\Delta A/\text{min}$ obtenido en el intervalo de mediciones, se calculó la concentración catalítica, teniendo en cuenta que el coeficiente de absorción molar del NADH a 340 nm es de $630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. El analizador realizaba automáticamente una verificación de la linealidad de la reacción.

$$\Delta A/\text{min} \times 97 = \mu\text{kat/L}$$

2.3.5. L-Lactato-deshidrogenasa

La medición de la concentración catalítica de la L-lactato-deshidrogenasa se realizó utilizando el procedimiento de medida recomendado por la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) (Guardià y cols., 1989).

La L-lactato-deshidrogenasa cataliza la reducción del piruvato por NADH, obteniéndose L-lactato y NAD^+ . La concentración catalítica se mide a partir de la velocidad de desaparición del NADH que se mide a 340 nm.



Para las mediciones se emplearon los reactivos de un equipo comercial de BioSystems, siendo la composición final del reactivo de trabajo: Tris 80 mmol/L, piruvato 1,6 mmol/L, NaCl 200 mmol/L, NADH 0,2 mmol/L, pH 7,2.

En la Tabla 2.5 se describen las condiciones de medida utilizadas en la medición de la concentración catalítica de la L-lactato-deshidrogenasa.

A partir del $\Delta A/\text{min}$ obtenido en el intervalo de mediciones, se calculó la concentración catalítica, teniendo en cuenta que el coeficiente de absorción molar del NADH a 340 nm es de $630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. El analizador realizaba automáticamente una verificación de la linealidad de la reacción.

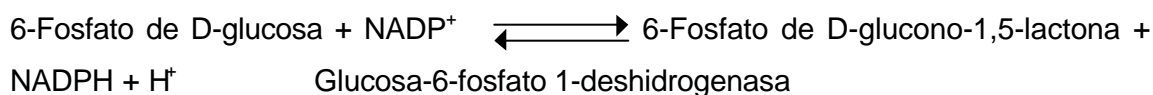
$$\Delta A/\text{min} \times 229 = \mu\text{kat/L}$$

Longitud de onda	340 nm
Paso de luz	0,6 cm
Temperatura	37 °C
Reactivo de trabajo	0,250 mL
Diluyente (agua)	0,005 mL
Muestra	0,005 mL
Tiempo de incubación	1 minutos
Intervalo de lectura	25 s
Número de lecturas	6

Tabla 2.5: Condiciones para la medición de la concentración catalítica de la L-lactato-deshidrogenasa.

2.3.6. Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa

La medición de la concentración catalítica de la glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa se realizó mediante el seguimiento de la aparición de NADPH medido a 340 nm, debido a la transformación de la 6-fosfato de D-glucosa en 6-fosfato de D-glucono-1,5-lactona por el NADP^+ (Deutsch, 1983).



Para las mediciones se prepararon las siguientes soluciones: Trietanolamina 100 mmol/L pH 7,6, acetato de sodio 200 mmol/L, NADP 30 mmol/L y 6-fosfato de D-glucosa 60 mmol/L.

El reactivo de trabajo se obtuvo a partir de la mezcla de las soluciones especificadas anteriormente, siendo la composición final: Trietanolamina 90 mmol/L, acetato de magnesio 7 mmol/L, NADP 1 mmol/L, 6-fosfato de D-glucosa 3 mmol/L, pH 7,6.

En la Tabla 2.6. se describen las condiciones de medida utilizadas en la medición de la concentración catalítica de la glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa.

Longitud de onda	340 nm
Paso de luz	0,6 cm
Temperatura	37 °C
Reactivo de trabajo	0,200 mL
Diluyente (agua)	0,005 mL
Muestra	0,005 mL
Tiempo de incubación	1 minutos
Intervalo de lectura	25 s
Número de lecturas	6

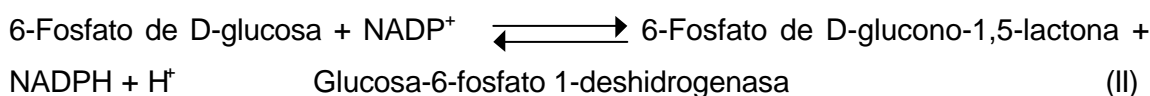
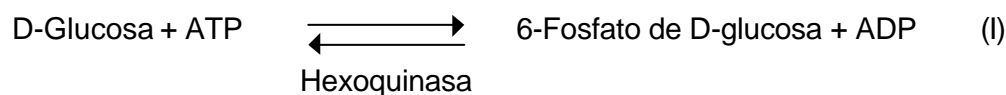
Tabla 2.6: Condiciones para la medición de la concentración catalítica de la glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa

A partir del $\Delta A/\text{min}$ obtenido en el intervalo de mediciones, se calculó la concentración catalítica, teniendo en cuenta que el coeficiente de absorción molar del NADPH a 340 nm es de $630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. El analizador realizaba automáticamente una verificación de la linealidad de la reacción.

$$\Delta A/\text{min} \times 187 = \mu\text{kat/L}$$

2.3.7. Hexoquinasa

La medición de la concentración catalítica de la hexoquinasa se realizó mediante el seguimiento de la aparición de NADPH medido a 340 nm. La hexoquinasa cataliza (I) la fosforilación de la D-glucosa a 6-fosfato de D-glucosa. La concentración catalítica se mide empleando la reacción acoplada de la glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa (II) que cataliza la oxidación de la 6-fosfato de D-glucosa a 6-fosfato de D-glucono-1,5-lactona por el NADP^+ (Bergmeyer, 1983).



Para las mediciones se prepararon las siguientes soluciones: Trietanolamina 100 mmol/L pH 7,6, acetato de sodio 200 mmol/L, NADP 30 mmol/L, glucosa 200 mmol/L, ATP 50 mmol/L y glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa 5000 μ kat/L.

El reactivo de trabajo se obtuvo a partir de la mezcla de las soluciones especificadas anteriormente, siendo la composición final: Trietanolamina 80 mmol/L, acetato de magnesio 10 mmol/L, NADP 1,5 mmol/L, glucosa 10 mmol/L, glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa 50 μ kat/L, pH 7,6.

En la Tabla 2.7. se describen las condiciones de medida utilizadas en la medición de la concentración catalítica de la hexoquinasa.

Longitud de onda	340 nm
Paso de luz	0,6 cm
Temperatura	37 °C
Reactivo de trabajo	0,200 mL
Diluyente (agua)	0,005 mL
Muestra	0,005 mL
Tiempo de incubación	1 minutos
Intervalo de lectura	25 s
Número de lecturas	6

Tabla 2.7: *Condiciones para la medición de la concentración catalítica de la hexoquinasa.*

A partir del $\Delta A/\text{min}$ obtenido en el intervalo de mediciones, se calculó la concentración catalítica, teniendo en cuenta que el coeficiente de absorción molar del NADPH a 340 nm es de 630 $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. El analizador realizaba automáticamente una verificación de la linealidad de la reacción.

$$\Delta A/\text{min} \times 187 = \mu\text{kat/L}$$

2.4. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MASA

La medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 se realizó mediante distintos inmunoanálisis heterogéneos comerciales. Para el estudio comparativo, la determinación de la conmutabilidad del material de referencia BCR 608 y el estudio del efecto matriz, se utilizaron cinco procedimientos. Sin embargo, para la certificación de la concentración de masa del BCR 608 se utilizaron siete. Todos ellos se describen detalladamente a continuación.

2.4.1. Enzimoimmunoanálisis heterogéneos

2.4.1.1. IMx

El IMx[®] de Abbott Diagnostics es un analizador automático que permite realizar mediciones basadas en el enzimoimmunoanálisis microparticulado. La enzima marcadora es la fosfatasa alcalina, la fase sólida a la que va unido el anticuerpo específico contra la isoenzima 2 de la creatina-quinasa son micropartículas de látex, y la separación se produce utilizando una matriz de fibra de vidrio. Los reactivos utilizados formaban parte del equipo comercial de Abbott Diagnostics. En la Figura 2.2. se pueden ver detalladamente las distintas partes de un módulo de reacción.

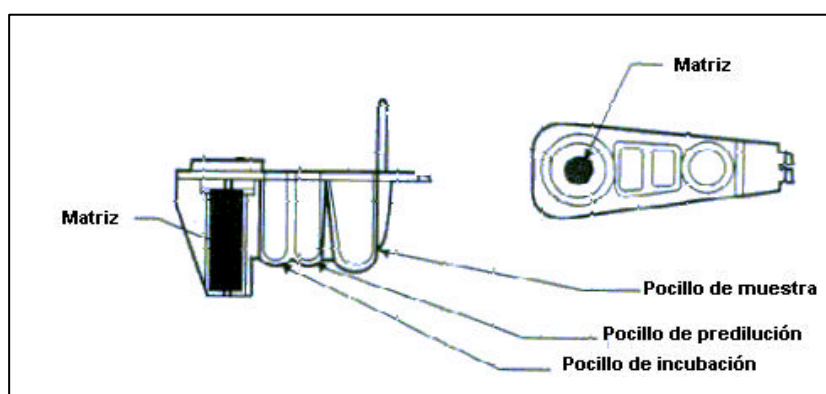


Figura 2.2: Módulo de reacción del analizador IMx^â.

La reacción se iniciaba con la mezcla de las micropartículas recubiertas del anticuerpo monoclonal contra la isoenzima 2 de la creatina-quinasa y la muestra. Tras una incubación, se producía la unión, formándose un complejo anticuerpo-antígeno. La mezcla de reacción se transfería a la matriz a cuyas fibras de vidrio se unían

irreversiblemente las micropartículas. La matriz se lavaba para eliminar los materiales no unidos, y el anticuerpo monoclonal contra la subunidad B de la creatina-quinasa conjugado con fosfatasa alcalina, se dispensaba sobre esta, y se unía al complejo anticuerpo-antígeno. Tras un último lavado de la matriz, se añadía el sustrato fosfato de 4-metilumbeliferol, y el producto fluorescente se medía a una longitud de onda de 448 nm.

A partir del análisis por duplicado de los calibradores proporcionados por el fabricante, se generaba una recta de calibración que relacionaba la fluorescencia medida con la concentración en $\mu\text{g/L}$.

El espécimen recomendado por el fabricante para la medición de la creatina-quinasa 2 es el suero o bien el plasma con heparina de sodio o EDTA-sales de tripotasio.

2.4.1.2. Stratus

El Stratus[®] de Dade-Behring es un analizador automático para enzimo-inmunoanálisis fluorimétricos de partición radial. Utiliza como enzima marcadora la fosfatasa alcalina y el sustrato es el fosfato de 4-metilumbeliferol. Para realizar el proceso analítico emplea tabletas de plástico que contienen en su centro un filtro de fibra de vidrio, que es la matriz en la que se encuentran inmobilizados los anticuerpos contra la isoenzima 2 a través de su unión con un anticuerpo dirigido contra el fragmento Fc de las inmunoglobulinas (Figura 2.3). La separación de las fracciones ligada y simple se produce por elución radial y la detección por cinética de fluorescencia.



Figura 2.3: Fundamento del inmunoanálisis de la creatina-quinasa 2 de Stratus.

La muestra se pipeteaba en la zona central de una tableta de plástico donde se encontraba inmovilizado en un papel de fibra de vidrio un anticuerpo monoclonal contra la isoenzima 2 de la creatina-quinasa. Tras la incubación, se añadía en la parte central de la zona de reacción, un anticuerpo monoclonal contra la subunidad B de la creatina-quinasa conjugado con fosfatasa alcalina. Durante esta incubación, el anticuerpo marcado se unía a la creatina-quinasa 2, que a su vez, estaba unida al anticuerpo inmovilizado. El anticuerpo marcado no ligado se eliminaba del campo de visión del analizador por elución radial mediante la aplicación de una solución de lavado que contenía el sustrato fluorogénico. La concentración catalítica de la fosfatasa alcalina conjugada con el segundo anticuerpo ligado al complejo inmovilizado, se valoraba mediante un sistema óptico que controlaba la velocidad de reacción mediante la fluorescencia de la superficie frontal.

A partir del análisis por duplicado de los calibradores proporcionados por el fabricante, se generaba una recta de calibración que relacionaba la fluorescencia medida con la concentración en $\mu\text{g/L}$.

El espécimen recomendado por el fabricante para la medición de la creatina-quinasa 2 es el suero.

2.4.1.3. Immulite

El Immulite[®] de DPC/Dipesa es un analizador de acceso aleatorio para enzimoanálisis con detección por quimioluminiscencia. Emplea como enzima marcadora la fosfatasa alcalina y como sustrato quimioluminiscente el dioxetano. Como fase sólida utiliza una bola de poliestireno introducida en un tubo diseñado especialmente, y la centrifugación como método de separación de las fracciones ligada y libre (Figura 2.4)

La medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa se realizó de acuerdo con el protocolo especificado por el fabricante. En primer lugar, se mezclaban simultáneamente en el tubo de reacción, la muestra, el anticuerpo monoclonal contra la isoenzima 2 de la creatina-quinasa inmovilizado en la fase sólida y el anticuerpo monoclonal contra la subunidad B de la creatina-quinasa conjugado con fosfatasa alcalina, y se realizaba una incubación de la mezcla durante 30 minutos a 37 °C con agitación intermitente. Durante este periodo de tiempo, el anticuerpo marcado se unía a la creatina-quinasa 2, que a su vez, se unía al anticuerpo inmovilizado. Tras la incubación, los tubos de reacción se centrifugaban sobre su eje longitudinal, de manera que se extraía la muestra y el reactivo que no había reaccionado. A

continuación se realizaban varios lavados, se añadía el sustrato quimioluminiscente de la enzima, se incubaba 10 minutos y se medía la señal.

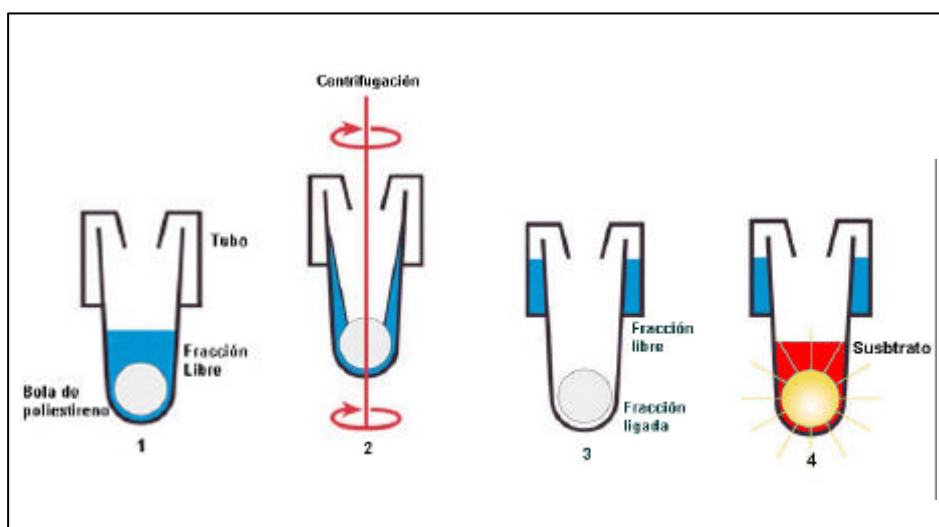


Figura 2.4: Esquema de la separación de la fracción ligada y libre para el inmunoanálisis Immulite.

A partir del análisis por cuadruplicado de los calibradores proporcionados por el fabricante, se ajustaba la curva que relacionaba la lectura de quimioluminiscencia medida con la concentración en $\mu\text{g/L}$.

El espécimen recomendado por el fabricante para la medición de la creatina-quinasa 2 es el suero o bien el plasma con heparina de sodio o EDTA-sales de tripotasio.

2.4.1.4. Opus Plus

El Opus[®] Plus de Dade-Behring es un sistema para enzimoanálisis heterogéneo sin fluidos. Emplea una tecnología unidosis en la que todos los reactivos están incluidos en unos cartuchos. La fase sólida es de fibra de vidrio y la separación de las fracciones ligada y libre se produce por capilaridad (Figura 2.5.). La enzima marcadora es la fosfatasa alcalina y el sustrato enzimático el fosfato de 4-metilumbeliferol con detección por fluorescencia. Los analizadores Opus rompen de forma automática las hojas selladoras cuando se pipetea los reactivos durante el ensayo.

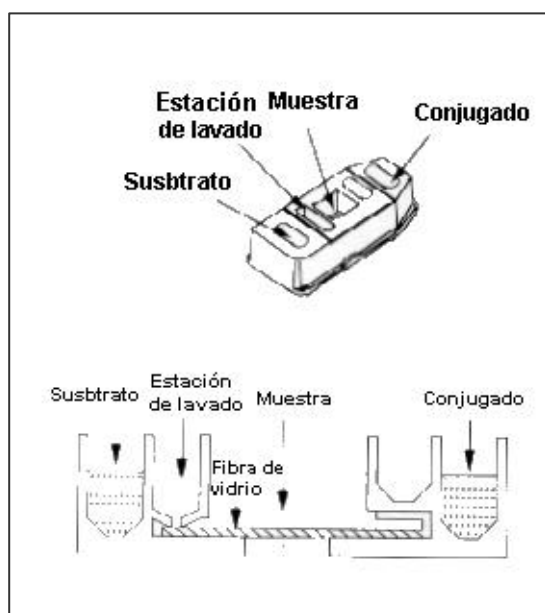


Figura 2.5: Cartucho de reactivos usado en el inmunoanálisis Opus Plus.

La medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 se realizó de acuerdo con el protocolo especificado por el fabricante. El analizador Opus pipeteaba la muestra y la suministraba, a través del puerto de suministro del módulo de ensayo, dentro de la fibra de vidrio donde se encontraba inmovilizado el anticuerpo monoclonal contra la isoenzima 2. Durante la primera incubación (3 minutos) se producía la unión de la creatina-quinasa 2 y el anticuerpo. Después de la incubación, el instrumento pipeteaba la solución que contenía el anticuerpo policlonal contra la subunidad M de la creatina-quinasa conjugado con fosfatasa alcalina, de uno de los pocillos sellados dentro de la fibra de vidrio. Durante una segunda incubación de 7 minutos, el anticuerpo marcado con la enzima reaccionaba con la isoenzima 2 unida para completar el complejo anticuerpo/antígeno/anticuerpo marcado con enzima. Para finalizar, la solución lavadora/sustrato eliminaba el anticuerpo marcado no unido. La cantidad de creatina-quinasa 2 presente en la muestra se medía mediante la fluorescencia generada durante 4 minutos.

A partir del análisis por duplicado de los calibradores proporcionados por el fabricante, se generaba la curva que relacionaba la lectura de fluorescencia medida con la concentración en $\mu\text{g/L}$.

El espécimen recomendado por el fabricante para la medición de la creatina-quinasa 2 es el suero o bien el plasma con heparina de sodio.

2.4.1.5. AxSYM

El AxSYM[®] de Abbott Diagnostics es un analizador automático que trabaja con la misma metodología que el IMx. Al igual que este permite realizar mediciones mediante enzimoimmunoanálisis microparticulado. La enzima marcadora es la fosfatasa alcalina, la fase sólida a la que va unido el anticuerpo específico contra la isoenzima 2 de la creatina-quinasa son micropartículas de látex, y la separación se produce utilizando una matriz de fibra de vidrio. Los reactivos utilizados también forman parte del equipo comercial de Abbott Diagnostics.

La reacción se iniciaba con la mezcla de las micropartículas recubiertas del anticuerpo monoclonal contra la isoenzima 2 de la creatina-quinasa y la muestra. Tras una incubación se producía la unión, formándose un complejo anticuerpo-antígeno. La mezcla de reacción, juntamente con una alícuota del diluyente, se transfería a la celdilla con matriz a cuyas fibras de vidrio se unían irreversiblemente las micropartículas. La matriz se lavaba para eliminar los materiales no unidos, y el anticuerpo monoclonal contra la creatina-quinasa 2 conjugado con fosfatasa alcalina se dispensaba sobre esta uniéndose al complejo anticuerpo-antígeno. Tras un último lavado de la matriz, para eliminar las partículas no unidas, se añadía el sustrato fosfato de 4-metilumbeliferol, y se medía el producto fluorescente.

A partir del análisis por duplicado de los calibradores proporcionados por el fabricante, se generaba una recta de calibración que relacionaba la fluorescencia medida con la concentración en $\mu\text{g/L}$.

El espécimen recomendado por el fabricante para la medición de la creatina-quinasa 2 es el suero o bien el plasma.

2.4.1.6. Dimension

El Dimension[®] RxL de Dade-Behring es un analizador con un módulo adicional integrado que permite la realización de inmunoanálisis heterogéneos de alta sensibilidad basados en partículas de dióxido de cromo. La fase sólida son partículas de dióxido de cromo recubiertas con anticuerpos monoclonales contra la subunidad B. La enzima marcadora es la β -galactosidasa y el sustrato enzimático es el clorofenol rojo- β -galactopiranosido, con detección por espectrometría de absorción.

La medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 se realizó de acuerdo con el protocolo especificado por el fabricante. La muestra se incubaba con partículas de dióxido de cromo recubiertas con anticuerpos monoclonales contra la

subunidad B, y con anticuerpos monoclonales contra la isoenzima 2 unidos a la β -galactosidasa. Durante el periodo de incubación correspondiente se formaba el complejo anticuerpo/antígeno/anticuerpo marcado con enzima. El conjugado no unido se separaba de la mezcla de reacción mediante una separación magnética y un lavado. A continuación se añadía el substrato cromogénico que al hidrolizarse debido a la acción de la β -galactosidasa liberaba un cromógeno que absorbía a 577 nm. La velocidad de aparición color era directamente proporcional a la concentración de creatina-quinasa 2 presente en la muestra.

A partir del análisis por duplicado de los calibradores proporcionados por el fabricante, se generaba una recta de calibración que relacionaba la absorbancia medida con la concentración en $\mu\text{g/L}$.

El espécimen recomendado por el fabricante para la medición de la creatina-quinasa 2 es el suero o bien el plasma con EDTA, heparina de sodio o heparina de litio.

2.4.2. Luminoanálisis heterogéneos

2.4.2.1. Elecsys

El Elecsys[®] de Roche Diagnostics es un analizador para la medición de quimioluminiscencia. La fase sólida son unas micropartículas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina que permiten la adhesión de la biotina que está unida al primer anticuerpo. El segundo anticuerpo está marcado con quelato de rutenio que, mediante una reacción electroquímica sobre la superficie de un electrodo, genera una señal quimioluminiscente. La separación de las micropartículas se realiza mediante un imán (Figura 2.6).

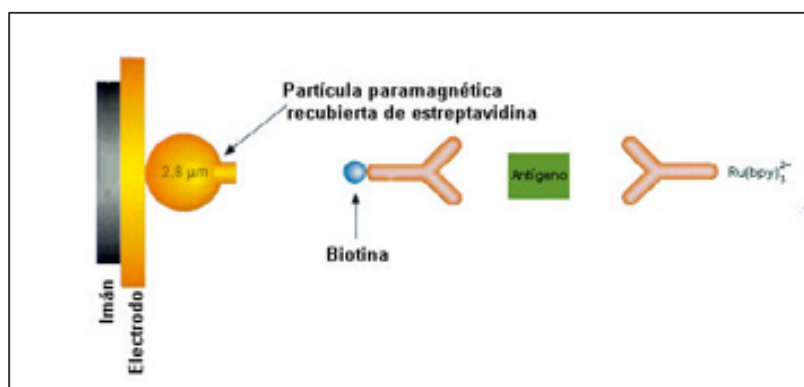


Figura 2.6: Fundamento del inmunoanálisis para la medición de la creatina-quinasa 2 de Elecsys.

La medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 de las muestras se realizó de acuerdo con el protocolo especificado por el fabricante. En primer lugar se realizaba una incubación de una mezcla que contenía la muestra, un anticuerpo monoclonal biotinilado específico contra la isoenzima 2 y un anticuerpo monoclonal específico contra la isoenzima 2 marcado con quelato de rutenio. Seguidamente, se incorporaban micropartículas recubiertas de estreptavidina a las que se unían los complejos formados durante la incubación anterior por la interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción se trasladaba a la célula de lectura, donde las micropartículas se fijaban temporalmente a la superficie del electrodo por magnetismo, y los elementos no fijados se eliminaban por la adición de la solución lavadora. Al aplicar una corriente eléctrica definida se producía una reacción quimioluminiscente, cuya emisión de luz a 620 nm se medía directamente con un fotomultiplicador.

A partir del análisis por duplicado de los calibradores proporcionados por el fabricante, se ajustaba la curva que relacionaba la quimioluminiscencia medida con la concentración en $\mu\text{g/L}$.

El espécimen recomendado por el fabricante para la medición de la creatina-quinasa 2 es el suero o bien el plasma con heparina de sodio, EDTA-sales de tripotasio o citrato de sodio.

2.4.2.2. ACS:180

El ACS:180 de Chiron Diagnostics es un analizador de acceso aleatorio que utiliza como marcaje quimioluminiscente un éster de acridinio, y micropartículas paramagnéticas como fase sólida para la separación.

La medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 se realizó de acuerdo con el protocolo especificado por el fabricante. La medición se inició con la dispensación en una cubeta, de la muestra y el anticuerpo específico monoclonal contra la isoenzima 2 marcado con éster de acridinio. Tras una incubación de 5 minutos a 37 °C, se añadió la fase sólida que contenía un anticuerpo monoclonal contra la isoenzima 2 acoplado covalentemente a partículas paramagnéticas, y la mezcla se incubó 2,5 minutos a 37 °C. Posteriormente, se secuestraron las partículas magnéticas en el tubo por la activación del imán, se aspiró el líquido y se lavó dos veces mediante la dispensación de agua desionizada. Para finalizar, se añadieron los reactivos responsables de la oxidación del éster de acridinio dando lugar a la señal quimioluminiscente que se midió a 430 nm.

A partir del análisis por duplicado de los calibradores proporcionados por el fabricante, se ajustaba la curva que relacionaba la lectura de quimioluminiscencia medida con la concentración en $\mu\text{g/L}$.

El espécimen recomendado por el fabricante para la medición de la creatinaquinasa 2 es el suero o bien el plasma con heparina de sodio.

2.5. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La medición de la concentración de proteína se realizó mediante tres procedimientos basados en distintos métodos de medida. La absorbancia a 280 nm se utilizó para el seguimiento de la concentración de proteína de las fracciones obtenidas durante la purificación de la enzima. El método de Coomassie se utilizó para la medición de la concentración de las muestras obtenidas durante las distintas etapas de la purificación, y el método de Doestch se utilizó para la asignación de un valor de concentración de proteína a la solución de la creatina-quinasa 2 purificada.

2.5.1. Absorbancia a 280 nm

La mayoría de proteínas presentan una banda de absorción máxima a 280 nm atribuida al grupo fenólico de la tirosina y al grupo indólico del triptofano. Puesto que el contenido de estos dos aminoácidos varía considerablemente de proteína a proteína, se consideró arbitrariamente que una unidad de absorbancia correspondía a una concentración de 1 g/L. Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrómetro DU-7 de Beckman.

2.5.2. Método de Coomassie

Este método es una modificación del método descrito por Bradford (1976). Se basa en el cambio que se produce en el máximo de absorbancia (465-595 nm) de una solución ácida de azul brillante de Coomassie G250, cuando se produce la unión entre el colorante y las proteínas. La unión a proteína se produce mediante la interacción electrostática entre los grupos del ácido sulfónico del colorante y los residuos de arginina de las proteínas.

La medición de la concentración de proteína se realizó en microplaca, con el equipo comercial suministrado por Bio-Rad, utilizando como patrón una solución de albúmina sérica bovina de 1,2 g/L. La absorbancia a 595 nm se midió con un lector de placas Labsystems Multiscan RC.

2.5.3. Método de Doetsch

El método de Doestch (Doestch y Gadsden, 1973) combina la sensibilidad del método de Lowry y la especificidad del método de Biuret. Las sustancias interferentes

son eliminadas mediante una primera cromatografía en gel filtración, tras la cromatografía, los iones cobre se unen a los enlaces peptídicos (-RCH-CO-NH) por la reacción del Biuret. El cobre no unido a proteína se elimina gracias a una segunda cromatografía en gel filtración, previamente neutralizada con hidróxido de sodio, y el complejo proteína-cobre eluido se mide colorimétricamente a 440 nm, gracias a la reacción que se produce entre el cobre unido a proteína y el dietilcarbamato de sodio.

La concentración de proteína de la muestra se determinó utilizando como calibrador una dilución del material de referencia certificado de albúmina sérica bovina SRM 927b.

2.5.3.1. Preparación de las soluciones y las columnas

La composición de las soluciones de trabajo utilizadas era la siguiente:

- Solución I: Hidróxido de sodio 0,1 mol/L.
- Solución II: Potasio-sodio tartrato 213 mmol/L, hidróxido de sodio 1,0 mol/L, sulfato de cobre 60 mmol/L, yoduro de potasio 30 mmol/L.
- Solución III: Dietilcarbamato de sodio 9 mmol/L.

Las columnas de gel filtración se prepararon una vez se había hidratado el gel Sephadex G-50. La hidratación se realizó mediante su adición a una solución de azida de sodio 0,2 g/L en una proporción de 50 g de gel por litro de solución, manteniéndose bajo agitación suave durante un tiempo total de 2 h. Seguidamente se dosificó a una serie de columnas (0,92 cm de diámetro), el volumen necesario de gel para que la altura de la resina una vez sedimentada estuviese comprendida entre 48-50 mm. Se dejó sedimentar durante unas 3 h y se conservaron a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.

2.5.3.2. Procedimiento de medida

El procedimiento mediante el cual se midió la concentración de proteína se describe a continuación:

1. Se destapó la parte superior de una columna y después la parte inferior, y se dejó eluir totalmente la solución.
2. Se pipetearon 0,5 mL de muestra o calibrador y se dejaron eluir totalmente.
3. Se añadió 1 mL de agua destilada y se recogió el eluido.

4. Se adicionaron 0,25 mL de solución II al eluido, se mezcló vigorosamente y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Se tomó otra columna y se realizó el procedimiento descrito en el paso 1.
6. Se añadieron 5 mL de solución I y se dejaron eluir totalmente. Este paso se realizó a la vez que la incubación, ya que los dos tenían la misma duración.
7. Se aplicaron 0,50 mL de la mezcla de reacción obtenida en el paso 4 a la columna y se dejaron eluir.
8. Se adicionó 1 mL de solución I y se recogió el eluido.
9. Al eluido recogido se le añadió 1 mL de solución III, se mezcló vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
10. Tras la incubación se midió la absorbancia a 440 nm frente a un blanco de reactivo formado por solución III y agua destilada.

Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrómetro DU-7 de Beckman.

2.6. PROCEDIMIENTOS ELECTROFORÉTICOS

Los procedimientos electroforéticos se utilizaron para seguir las distintas etapas de purificación y para determinar el grado de pureza de la creatina-quinasa 2 purificada.

2.6.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli en 1970, basado en un sistema discontinuo de soluciones amortiguadoras, en un aparato de electroforesis MIDGET 2050 LKB (Amersham Pharmacia Biotech).

La electroforesis consta de dos geles, el de “resolución” con 1,37 mol/L de acrilamida y 17,3 mmol/L de bis-acrilamida, y el de “empacamiento” con 0,54 mol/L de acrilamida y 7 mmol/L de bis-acrilamida. La polimerización de los geles, iniciada por el persulfato de amonio y catalizada por el N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), se realizó entre una placa de vidrio y una placa de óxido de aluminio de 10,2 x 8,2 cm, obteniéndose un gel de 0,75 mm de grosor.

Los dos geles se prepararon a partir de las siguientes soluciones:

Solución 1: Acrilamida 4,11 mol/L y bis-acrilamida 52 mmol/L.

Solución 2: Tris-HCl 1,5 mmol/L, pH 8,8.

Solución 3: Tris-HCl 0,5 mmol/L, pH 6,8.

Solución 4: Dodecil sulfato de sodio 34,7 mmol/L.

El gel de “resolución” se preparó mezclando 5 mL de solución 1, 3,75 mL de solución 2, 0,15 mL de solución 4, 6 mL de agua destilada y 0,005 mL de TEMED. Se desgasificó, mediante una bomba de vacío, y se añadieron 0,075 mL de persulfato de amonio 0,44 mol/L. Finalmente, 3,5 mL de la mezcla se transfirieron al espacio existente entre las dos placas, evitando la formación de burbujas que pudiesen dificultar la migración de las proteínas, y se añadieron 1,5 mL de agua destilada para facilitar el proceso de polimerización, que duró unos 60 minutos.

El gel de “empacamiento” se preparó mezclando 1,33 mL de solución 1, 2,5 mL de solución 3, 0,1 mL de solución 4, 6 mL de agua destilada y 0,01 mL de TEMED. Se desgasificó, mediante una bomba de vacío, y se añadieron 0,050 mL de persulfato de amonio 0,44 mol/L. La mezcla se transfirió al espacio que quedaba entre las dos placas, una vez eliminada el agua, y se insertó un peine de aplicación para 10

muestras evitando la formación de burbujas.

Las muestras se prepararon ajustando la concentración de proteína, que previamente había sido medida por el método de Coomassie (2.5.2.), entre 0,5 y 1,5 g/L. Estas se mezclaron v/v con el tampón de muestra que contenía 250 mL/L de solución 3, 400 mL/L de solución 4, 200 mL/L de glicerol 99 %, 500 mg/L de azul de bromofenol, 100 mL/L de 2-mercaptoetanol y 50 mL/L de agua destilada. Se hirvieron durante 5 minutos, se enfriaron, se centrifugaron, y finalmente se aplicaron 10 μ L de la mezcla al gel con ayuda de una pipeta Hamilton. El patrón de proteínas de baja masa molar, una vez reconstituido con 0,2 mL de agua destilada, se trató igual que las muestras.

Las cubas superior e inferior del aparato de electroforesis contenían tampón Tris-HCl 24,7 mmol/L, glicina 0,19 mol/L y solución 4 10 mL/L. La electroforesis se desarrolló durante 45 minutos a un voltaje de 500 V, una potencia de 15 W y una intensidad de 40 mA. Finalizado el recorrido, se procedió a la tinción del gel por el método detallado en el apartado 2.6.3.1.

2.6.1.1. Medición de la masa molar

La medición de la masa molar de las distintas subunidades de la creatina-quinasa 2 se realizó mediante una migración electroforética en condiciones desnaturalizantes (apartado 2.6.1.) y una posterior tinción inespecífica por Coomassie (apartado 2.6.3.1.). Este tipo de electroforesis permite la medición de la masa molar de las proteínas gracias a su movilidad electroforética comparándola con las de una serie de proteínas patrón de masa molar conocida. Como patrón se utilizó el equipo de calibración de baja masa molar de Amersham Pharmacia Biotech.

La movilidad electroforética (R_f) se calculó como la distancia que la proteína había migrado desde el origen, en relación a la distancia desde el origen al frente de migración. En la Tabla 2.8. se describe la masa molar de las proteínas que formaban parte del patrón utilizado y su movilidad electroforética.

La masa molar de las dos subunidades de la creatina-quinasa 2 se determinó mediante la interpolación de sus R_f a la recta de calibración obtenida a partir de la representación del R_f y el logaritmo de la masa molar de las proteínas patrón.

Proteína marcadora	Masa molar (g/mol)	Rf
Fosforilasa b	94.000	0,21
Albúmina sérica bovina	67.000	0,34
Ovoalbúmina	43.000	0,49
Anhidrasa carbónica	30.000	0,70
Inhibidor tripsina	20.100	0,86
α -Lactoalbúmina	14.400	1,00

Tabla 2.8: *Composición, masa molar y movilidad electroforética de las proteínas patrón.*

2.6.2. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes se realizó en un aparato de electroforesis MIDGET 2050 LKB.

La electroforesis constaba de dos geles, el de “resolución” y el de “empacamiento” con las mismas proporciones de acrilamida y bis-acrilamida que en la electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Los dos geles se prepararon a partir de las soluciones I, II, y III utilizadas en la preparación de los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

El gel de “resolución” se preparó mezclando 5 mL de solución 1, 3,75 mL de solución 2, 6,15 mL de agua destilada y 0,005 mL de TEMED. Se desgasificó, mediante una bomba de vacío, y se añadieron 0,075 mL de persulfato de amonio 0,44 mol/L. Finalmente, 3,5 mL de la mezcla se transfirieron al espacio existente entre las dos placas, evitando la formación de burbujas, y se añadieron 1,5 mL agua destilada para facilitar el proceso de polimerización que duró unos 60 minutos.

El gel de “empacamiento” se preparó mezclando 0,665 mL de solución 1, 2,5 mL de solución 3, 3,05 mL de agua destilada y 0,005 mL de TEMED. Se desgasificó, mediante una bomba de vacío, y se añadió 0,050 mL de persulfato de amonio 0,44 mol/L. La mezcla se transfirió al espacio que quedaba entre las dos placas, una vez se había eliminada el agua, y se insertó un peine de aplicación para 10 muestras evitando la formación de burbujas.

Las muestras se prepararon ajustando la concentración de proteína, que previamente había sido medida por el método de Coomassie (apartado 2.6.2.), entre 0,5 y 1,5 g/L. Se mezclaron v/v con el tampón de muestra que contenía 250 mL/L de solución 3, 200 mL/L de glicerol 99% y 500 mg/L de azul de bromofenol. El volumen de muestra aplicado fue de 0,01 mL.

Las cubas superior e inferior del aparato de electroforesis contenían tampón Tris-HCl 24,7 mmol/L y glicina 0,19 mol/L. La electroforesis se desarrolló a un voltaje de 500 V, una potencia de 15 W y una intensidad de 25 mA. El tiempo de migración fue de 1 h y 40 minutos.

Una vez finalizada la electroforesis se procedió al revelado del gel por los métodos detallados en el apartado 2.6.3.

2.6.3. Procedimientos de revelado

El revelado de los geles de electroforesis se realizó mediante una tinción de proteínas inespecífica (tinción de Coomassie) y mediante un revelado de la actividad catalítica de la creatina-quinasa. También se realizó la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF e identificación posterior mediante anticuerpos específicos contra la creatina-quinasa 2 o contra alguna de sus subunidades.

2.6.3.1. Tinción de Coomassie

La tinción de Coomassie de los geles de poliacrilamida se realizó sumergiéndolos en una solución compuesta por azul brillante de Coomassie R250 1,25 g/L, metanol 500 mL/L y ácido acético 100 mL/L. Los geles se dejaron en esta solución unas 12 h. Transcurrido este tiempo, se sumergieron en una solución formada por 500 mL/L de metanol, 100 mL/L de ácido acético y 10 mL/L de glicerol 99%. Se mantuvieron en agitación, y la solución se fue renovando hasta conseguir un fondo transparente.

Finalizada la decoloración, los geles se cubrieron con una membrana de celofán y se sometieron a un proceso de secado por calor y vacío en un secador de geles 543 de Bio-Rad durante 2 h.

2.6.3.2. Revelado de la actividad catalítica

Después de una separación electroforética en condiciones no desnaturalizantes (apartado 2.6.2.), el gel se colocó sobre una placa de vidrio, se lavó con agua destilada, y se añadieron cuidadosamente 1,5 mL del reactivo de trabajo utilizado para la medición de la concentración catalítica de la creatina-quinasa total (apartado 2.3.1.). El reactivo se repartió homogéneamente por toda la superficie del gel. La placa de vidrio se introdujo en una cámara húmeda y se incubó durante 30

minutos a 37 °C.

La visualización de las bandas correspondientes a las diferentes isoenzimas de la creatina-quinasa se realizó con la ayuda de un transiluminador que comprendía la región ultravioleta.

2.6.3.3. Transferencia e identificación mediante anticuerpos específicos

Tras una electroforesis en condiciones no desnaturizantes (apartado 2.6.2.), se realizó una transferencia semiseca de las proteínas a una membrana de fluoruro de polovinilidina (PVDF) (Immobilon-P de Millipore), usando el equipo Novablot de Amersham Pharmacia Biotech.

Para la preparación de la unidad de transferencia se recortaron varios papeles de filtro y la membrana de PVDF del mismo tamaño que el gel de electroforesis, para asegurar que la corriente sólo pasaba a través de él. La membrana se mantuvo en remojo en una solución de etanol durante 10 minutos, y se introdujo junto a los papeles de filtro, en la solución de transferencia compuesta por glicina 39 mmol/L, Tris-HCl 48 mmol/L, dodecil sulfato de sodio 1,3 mmol/L y metanol 4,94 mol/L, pH 8,3. Se colocaron 9 papeles de filtro en el centro de la placa anódica, sobre estos se colocó la membrana, el gel y otros 9 papeles de filtro. Todo el proceso se realizó evitando la formación de burbujas entre las diferentes capas. Para finalizar, el conjunto se tapó con la placa catódica.

Una vez preparada la unidad de transferencia, las proteínas fueron transferidas bajo las siguientes condiciones: 65,6 mA, 50 V y 15 W, durante 1,5 h.

Finalizado el proceso de transferencia se procedió al revelado de las bandas proteicas con anticuerpos específicos. Este revelado se basa en un método inmunoquímico, en el que el antígeno a detectar, inmovilizado en la membrana, se une a un primer anticuerpo específico, y el inmunocomplejo formado es detectado con la ayuda de un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente dirigido contra el primero.

Antes de incubar la membrana con el primer anticuerpo, se sumergió en una solución de bloqueo compuesta por Tris-HCl 10 mmol/L, NaCl 154 mmol/L, Tween-20 0,1% y albúmina sérica bovina 0,4 mmol/L, pH 9,0. Tras el bloqueo, la membrana se incubó durante 90 minutos con el primer anticuerpo monoclonal específico diluido en tampón de lavado compuesto por Tris-HCl 10 mmol/L, NaCl 154 mmol/L, Tween-20 0,1 %, pH 9,0, que podía estar dirigido contra la isoenzima 2, contra la subunidad B o contra la subunidad M.

Una vez acabada la incubación, la membrana se sometió a tres lavados de 5 minutos con tampón de lavado. Tras el lavado, se realizó una segunda incubación con el segundo anticuerpo contra inmunoglobulina G de ratón marcado con peroxidasa diluido en tampón de lavado, durante 90 minutos, bajo agitación constante, y protegido de la luz.

Para finalizar, la membrana se volvió a someter a tres lavados de 5 minutos con tampón de lavado. Tras esta operación se procedió a su revelado con el reactivo revelador de peroxidasa, la composición del cual era la siguiente: tampón fosfato de potasio 150 mmol/L, peróxido de hidrógeno 2,94 mol/L y diaminobenzidina 0,7 mmol/L. Inmediatamente después de la aparición de las bandas, como consecuencia de la oxidación de la diaminobenzidina por la acción de la peroxidasa dando lugar a un producto coloreado insoluble, la reacción se paró con la adición de agua destilada.

2.6.4. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque se realizó en placas de poliacrilamida con una composición de 50 g/L de acrilamida y de 30 g/L de bis-acrilamida, de 245 x 110 x 1 mm, que se suministran polimerizadas con el anfólito incluido. Se seleccionó el intervalo de pH de 3,5 a 10,0. Se aplicaron entre 10 y 20 μ L de muestra que contenían aproximadamente 5 μ g de proteína. Todo el procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante en un instrumento Multiphor II de Amersham Pharmacia Biotech. Las condiciones del isoelectroenfoque fueron las siguientes: 1500 V, 50 mA y 30 W (constante) durante 90 minutos, manteniendo la temperatura a 4 °C.

Una vez finalizado el enfoque se procedió a la tinción de la placa de poliacrilamida. Previamente se fijaron las proteínas con solución fijadora de ácido tricloroacético 100 mL/L y ácido sulfosalicílico 50 g/L durante 30 minutos. Tras un lavado con una solución decolorante formada por etanol 250 mL y ácido acético 80 mL/L, se tiñó el gel sumergiéndolo durante 60 minutos a 37 °C, en una solución compuesta por 1,15 g/L de azul de Coomassie brillante R250 en solución decolorante. Por último, la placa se mantuvo en la solución decolorante hasta que el fondo quedó transparente, y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se cubrió con una membrana de celofán.

2.6.4.1. Medición del punto isoeléctrico

La medición del punto isoeléctrico de la creatina-quinasa 2 se realizó mediante isoelectroenfoque, empleando como patrones de pl el equipo de calibración de Amersham Pharmacia Biotech que comprendían proteínas con un intervalo de pl de 3 a 10.

En la Tabla 2.9. se describen las proteínas que constituían el patrón con sus respectivos pl y la distancia de migración al cátodo.

Proteína	pl	Distancia de migración (cm)
Tripsinógeno	9,30	0,3
Lentil-lectina básica	8,65	0,6
Lentil-lectina intermedia	8,45	1,0
Lentil-lectina ácida	8,15	1,9
Mioglobina básica	7,35	2,5
Mioglobina ácida	6,85	2,7
Anhidrasa carbónica B humana	6,55	4,0
Anhidrasa carbónica B bovina	5,85	4,3
β -Lactoglobulina A	5,20	5,0
Inhibidor tripsina	4,55	5,3
Glucano 1,4- α -glucosidasa	3,50	5,5

Tabla 2.9: Composición, pl y distancia de migración de las proteínas patrón.

La determinación del punto isoeléctrico de las proteínas problema se realizó mediante la interpolación de la distancia de migración de la banda al cátodo, a la recta de calibración obtenida mediante la representación de la distancia de migración al cátodo de las distintas proteínas patrón frente a sus respectivos pl.

2.7 ESTUDIO DE LA CONMUTABILIDAD DE LA CREATINA-QUINASA 2 PURIFICADA

Se realizó un estudio de la conmutabilidad de la creatina-quinasa 2 purificada en distintas matrices de origen humano o sintético mediante la medición de su concentración de masa en varios inmunoanálisis comerciales.

2.7.1. Obtención y conservación de los especímenes

Los especímenes que se utilizaron en el estudio comparativo fueron plasmas, ya que la medición de la isoenzima se realiza principalmente en el laboratorio de urgencias.

Los especímenes se obtuvieron en el laboratorio de Urgencias de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge y en el laboratorio de Urgencias del Hospital Clínic de Barcelona. Se utilizaron heparina de sodio y EDTA sal de tripotasio como anticoagulantes. En cada espécimen se midió la concentración catalítica de la creatina-quinasa total y la concentración de la isoenzima 2 mediante inmunoinhibición.

Se seleccionaron aquellos especímenes con una concentración de la isoenzima 2 superior a 0,42 $\mu\text{kat/L}$, no hemolizados. Se identificaron, se alicuotaron y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

2.7.2. Preparación de las matrices

Las matrices se prepararon con el objetivo de estudiar su efecto en la medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2.

Las diferentes matrices se prepararon a partir de una dilución previa de la solución de la creatina-quinasa 2 purificada. La dilución se realizó en una solución que tenía la misma composición que la matriz del material de referencia BCR 608. Estaba compuesta por PIPES 25 mmol/L, ADP 2 mmol/L, NaCl 154 mmol/L, 2-mercaptoetanol 5 mmol/L y albúmina sérica humana 50 g/L, pH 7,2. Se pipetearon 0,037 mL de creatina-quinasa 2 purificada, y se añadieron a 5 mL de la solución anterior.

2.7.2.1. Matriz sérica

La matriz sérica y la matriz sérica dializada se prepararon a partir de una mezcla de sueros con un volumen final de 25 mL. Previamente se midió la

concentración catalítica de la creatina-quinasa total de la mezcla, obteniéndose un valor de 0,65 $\mu\text{kat/L}$. La mezcla se dividió en dos partes iguales, y una de ellas se dializó frente a 2 L de una solución de NaCl 9 g/L.

A 5 mL de la mezcla de sueros se añadieron 0,05 mL de la dilución de la solución de la creatina-quinasa 2 purificada, realizándose el mismo procedimiento para la mezcla de sueros dializados.

De la matriz sérica y la matriz sérica dializada se prepararon 5 alícuotas de 1 mL cada una, se identificaron y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

2.7.2.2. Matriz plasmática

La matriz plasmática y la matriz plasmática dializada se prepararon a partir de una mezcla de plasmas, que llevaban como anticoagulante heparina de sodio, con un volumen final de 25 mL. Previamente se midió la concentración catalítica de la creatina-quinasa total de la mezcla, obteniéndose un valor de 2,25 $\mu\text{kat/L}$. La mezcla se dividió en dos partes iguales, y una de ellas se dializó frente a 2 L de una solución de NaCl 9 g/L.

A 5 mL de la mezcla de plasmas se añadieron 0,05 mL de la dilución de la solución de la creatina-quinasa 2 purificada, realizándose el mismo procedimiento para la mezcla de plasmas dializados.

De la matriz plasmática y la matriz plasmática dializada se prepararon 5 alícuotas de 1 mL cada una, se identificaron y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

2.7.2.3. Matriz sintética

La matriz sintética tenía una composición idéntica a la utilizada en la dilución previa de la solución de la creatina-quinasa 2 purificada. A 5 mL de la solución se añadieron 0,05 mL de la dilución de la solución de la creatina-quinasa 2 purificada.

De la matriz sintética se prepararon 5 alícuotas de 1 mL, se identificaron y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

En la Figura 2.7. se puede ver un esquema en el que se describen los pasos principales de la preparación de las distintas matrices.

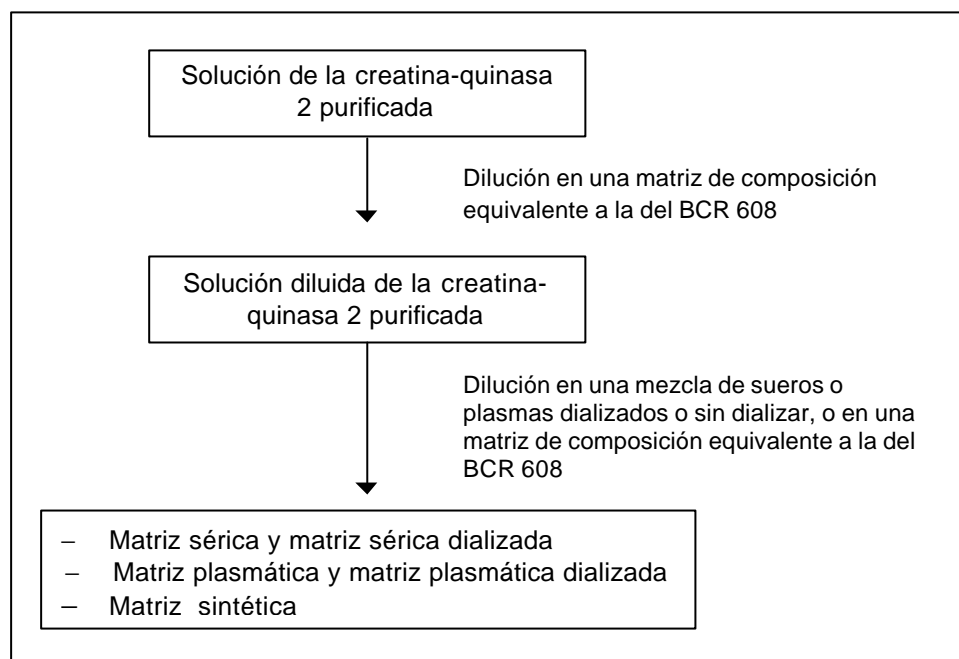


Figura 2.7: Pasos principales de la preparación de las distintas matrices.

2.7.3. Tratamiento estadístico de los datos

La comparación de los diferentes métodos utilizados para la medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2, y el estudio de la conmutabilidad del material de referencia y de las distintas matrices, se realizó mediante la regresión lineal no paramétrica de Passing y Bablok (1983). Se escogió este tipo de regresión por su solidez. Las condiciones para su aplicación son la existencia de una relación lineal entre los dos métodos a comparar, y que los resultados de ambos se distribuyan de forma continua. La heterocedasticidad no afecta a este tipo de regresión y la estimación de la recta de regresión es independiente de la asignación a los ejes (x) e (y) a cada método analítico.

En el método de Passing y Bablok el tamaño mínimo necesario de la muestra depende de diversos factores: la imprecisión de los procedimientos de medida, y la desviación de la distribución de los datos. La obtención del tamaño mínimo óptimo es bastante laboriosa obteniéndose un número aproximado, por lo que la utilización de 100 especímenes diferentes representativos de todo el intervalo analítico es válida para todos los casos.

El número de replicados que es preciso efectuar con cada procedimiento dependerá del coeficiente de variación; en aquellos procedimientos en que el coeficiente de variación varía en función de la concentración de la muestra, hay que

considerar el mayor que se observa a lo largo de todo el intervalo analítico. Si los coeficientes de variación de ambos métodos son iguales o diferentes pero inferiores al 7%, sólo se necesita efectuar un replicado por cada espécimen con cada procedimiento. En la Tabla 2.10. se describen los coeficientes de variación, obtenidos con dos concentraciones de masa de creatina-quinasa 2 distintas, proporcionados por fabricantes de cada uno de los inmunoanálisis. Puesto que las imprecisiones de los distintos procedimientos eran inferiores al 7% sólo se midió un replicado de cada espécimen mediante cada inmunoanálisis.

	Media (µg/L)	Intraserial	Interserial	Total
		CV(%)	CV(%)	CV(%)
Stratus	5,32	3,8	6,0	6,0
	56,81	3,1	3,1	4,4
ACS 180	3,77	2,5	/	3,5
	197,84	2,6	/	3,3
Elecsys	4,72	3,9	/	4,6
	65,50	3,5	/	4,4
IMx	4,50	5,1	4,9	7,1
	117,20	3,2	3,0	4,0
Immulite	15,00	5,1	5,0	/
	306,00	3,3	3,9	/

Tabla 2.10: Imprecisiones obtenidas con dos concentraciones de creatina-quinasa 2 proporcionadas por los fabricantes.

Tras la medición de la creatina-quinasa 2 en los especímenes y una vez confirmada la existencia de una relación lineal entre los dos métodos a comparar, se compararon los valores de concentración obtenidos para cada pareja de inmunoanálisis empleando el programa informático “Astute, Statistics add-in for Microsoft® Excel”. Con este procedimiento de regresión se obtuvo una estimación de la pendiente (b) y de la ordenada en el origen (a) de la recta de regresión ($y = a + bx$) definida por los datos introducidos, y el respectivo intervalo de confianza del 95%.

Un material se considera conmutable con los especímenes humanos respecto a dos métodos comparados, si el resultado del cociente obtenido a partir de la concentración medida del material por un método (x) y la correspondiente por el otro método (y) se encuentra dentro de la región del 95% de confianza de la pendiente de la ecuación definida por la comparación de los dos métodos.

2.8. ASIGNACIÓN DE UN VALOR DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL PROCEDIMIENTO DE DOESTCH

La asignación de un valor de concentración de proteína a la creatina-quinasa 2 purificada por el procedimiento de Doestch se llevó a cabo mediante una campaña en la que participaron cinco laboratorios de distintos países. Los participantes midieron por duplicado en tres días diferentes la concentración de proteína, utilizando como calibrador una dilución del material de referencia SRM 927b del NIST con un valor certificado de concentración de proteína. A cada participante se le enviaron tres viales que contenían 3 mL de calibrador, tres viales con 1,5 mL de creatina-quinasa 2 purificada y un total de 26 columnas de gel filtración. También se les proporcionaron las instrucciones necesarias que describían el procedimiento de medida a seguir, así como un formulario a rellenar con los datos obtenidos.

2.8.1 Preparación del calibrador y de la solución de la creatina-quinasa 2 purificada

Tanto el calibrador como la solución de la creatina-quinasa 2 purificada se diluyeron previamente con el objetivo de que la concentración de proteína estuviera dentro del intervalo de medida del procedimiento.

En un matraz aforado (clase DIN A) de 250 mL previamente tarado, se pesaron 1,7707 g del SRM 927b con una concentración certificada de $72,01 \pm 0,33$ g/L y una densidad de $1,021 \pm 0,007$ g/mL (incertidumbre al 95% de confianza). A continuación se enrasó el recipiente cuidadosamente con una solución de azida de sodio 1 g/L. Una vez finalizada esta operación se prepararon alícuotas de 3 mL en viales de vidrio de 5 mL, que se taparon y se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

La solución de la isoenzima se obtuvo mediante la adición de 2 mL de la solución de la creatina-quinasa 2 purificada a un matraz de 25 mL, que posteriormente se enrasó con la misma solución en la que se hallaba la enzima (Tris-HCl 50 mmol/L, EDTA 0,9 mmol/L, 2-mercaptoetanol 10 mmol/L, ADP 5 mmol/L, pH 7,5). La muestra diluida se alícuotó en viales de 5 mL añadiendo a cada vial un volumen de 1,5 mL, se taparon cuidadosamente y se conservaron a 4 °C hasta el comienzo de la campaña de certificación.

2.8.2. Laboratorios participantes

En la asignación de un valor de concentración de proteína a la solución diluida de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa participaron un total de cinco laboratorios de distintos países de la comunidad europea, algunos de los cuales ya habían participado en la campaña de asignación de un valor de concentración catalítica al material de referencia BCR 608. En la Tabla 2.11. se describen los datos correspondientes a cada laboratorio, así como el código asignado a cada uno de ellos.

Código	Responsable	Dirección
1	F. Schiele	Centre de Médecine Préventive, Nancy, Francia
2	M. Hørder	University Hospital, Odense, Dinamarca
3	A. Truchaud	Institut de Biologie, Nantes, Francia
4	M. Panteghini	Spedali Civili, Brescia, Italia
5	M. Sánchez	Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España

Tabla 2.11: Datos de los distintos laboratorios participantes en la campaña de asignación de un valor de concentración de proteína por el procedimiento de Doestch.

2.8.3. Instrucciones proporcionadas a los participantes

A todos los laboratorios participantes se les proporcionó, además del material a valorar, las instrucciones necesarias en las que se describían los distintos pasos a seguir y un formulario a completar con los datos obtenidos de dicha valoración (Anexo).

Las instrucciones constaban de diferentes apartados: calibración de pipetas, especificaciones del espectrómetro, reactivos, preparación de las soluciones, descripción del calibrador y de la muestra a valorar (solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada) y especificaciones del procedimiento de medida.

2.8.3.1. Calibración de pipetas y especificaciones instrumentales

Todos los laboratorios tuvieron que calibrar las siguientes pipetas:

- Pipeta de 1 mL, para la adición de agua destilada y de las soluciones I y III.
- Pipeta de 0,5 mL, para la adición de la muestra y de la mezcla de reacción.
- Pipeta de 0,25 mL, para la adición de la solución II.

La calibración de las distintas pipetas se realizó mediante la dispensación de agua destilada a temperatura ambiente en un recipiente previamente tarado, en una balanza con una precisión de 0,1 mg. El procedimiento se repitió diez veces y se calculó la media. En la Tabla 2.12. se indican las medias obtenidas como resultado de la calibración de las diferentes pipetas para cada uno de los laboratorios participantes.

Código	Temperatura (°C)	Pipetas		
		1,00 mL (g)	0,50 mL (g)	0,25 mL (g)
1	22	0,9718	0,4970	0,2460
2	21	1,0010	0,5007	0,2495
3	20	0,9999	0,5010	0,2495
4	23	1,0000	0,5000	0,2500
5	25	1,0020	0,4994	0,2517

Tabla 2.12: Medias ($n = 10$) obtenidas de la calibración de las distintas pipetas y temperatura de calibración medida por cada laboratorio.

El espectrómetro requerido para la medición de la absorbancia tenía que ser capaz de realizar mediciones a 440 nm. Los participantes tenían que indicar el nombre y el tipo de espectrómetro. Era imprescindible que el aparato tuviese un intervalo de absorbancia lineal de 0 a 2 unidades de absorbancia, la exactitud de la longitud de onda tenía que ser de 1 nm, la amplitud del haz ≤ 2 nm y el paso de luz interno de las cubetas de $10,00 \pm 0,01$ mm.

2.8.3.2. Reactivos y preparación de las soluciones

En las instrucciones proporcionadas a cada participante se indicaban los reactivos necesarios para la preparación de las distintas soluciones a utilizar durante el procedimiento de medida. Los reactivos tenían que ser de grado analítico y cumplir los requerimientos descritos en las recomendaciones de la IFCC. En el formulario a rellenar por cada laboratorio los participantes anotaron el fabricante, el código y el lote de cada reactivo.

Todas las soluciones se prepararon con agua a temperatura ambiente. Las soluciones que se prepararon son las que se describen en el apartado 2.5.3.1. Previamente a ser utilizadas en la medición de la concentración de proteína se midió la absorbancia de la solución II a 654 nm y la absorbancia de la solución III a 347 nm frente a agua destilada. En la Tabla 2.13. se indican los valores obtenidos por cada

laboratorio en los tres días que fueron utilizadas, así como las tolerancias permitidas.

Soluciones	Código	Día 1	Día 2	Día 3	Tolerancia
Solución II (654 nm)	1	1,5685	1,5393	1,5221	1,3500-1,7500
	2	1,5529	1,5435	1,5536	
	3	1,5840	1,5940	1,6070	
	4	1,5070	1,5170	1,5280	
	5	1,5884	1,5910	1,5747	
Solución III (347 nm)	1	0,5424	0,5537	0,5612	0,4000-0,6000
	2	0,4991	0,5080	0,5143	
	3	0,5510	0,5480	0,5560	
	4	0,5380	0,5170	0,5280	
	5	0,4712	0,4704	0,4563	

Tabla 2.13: Absorbancias de la solución II y de la solución III medidas por cada laboratorio previamente a su utilización en la medición de la concentración de proteína por el procedimiento de Doestch.

2.8.3.3. Procedimiento de medida

A todos los participantes se les proporcionó el procedimiento a seguir paso a paso para la medición de la concentración de proteína de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada. Cada día se midió por duplicado la muestra y el calibrador siguiendo las instrucciones descritas en el apartado 2.5.3.2. En total, cada laboratorio realizó seis mediciones de la muestra y seis del calibrador. Los valores obtenidos se anotaron en las casillas correspondientes de los respectivos formularios.

2.8.4. Cálculo de la concentración de proteína

La concentración de proteína de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada se midió calibrando el procedimiento con un patrón de concentración de proteína conocida. La fórmula mediante la cual se realizó el cálculo se detalla a continuación:

$$C_{CK-2} \text{ (g/L)} = \frac{A_{CK-2}}{A_{\text{Calibrador}}} \times 0,4995$$

Donde 0,4995 es la concentración del calibrador (g/L), $A_{\text{Calibrador}}$ es la media intradía de la absorbancia medida del calibrador y $A_{\text{CK-2}}$ es la absorbancia de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada.

2.9. ASIGNACIÓN DE UN VALOR DE CONCENTRACIÓN DE MASA AL MATERIAL DE REFERENCIA BCR 608

En la campaña de asignación de un valor de concentración de masa al material de referencia de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa BCR 608 participaron un total de siete laboratorios, algunos de los cuales ya habían cooperado con anterioridad en la asignación de un valor de concentración de proteína a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada y en la asignación de un valor de concentración catalítica al BCR 608. A cada laboratorio se le proporcionaron cuatro viales del patrón líquido congelado, preparado tal y como se describe en el apartado 2.9.1.; seis viales del material de referencia BCR 608; la información necesaria que describía el procedimiento a seguir para realizar las mediciones y los formularios a rellenar con los valores obtenidos.

Todos los participantes midieron por duplicado en tres días la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 del material de referencia y la del patrón líquido usando los reactivos proporcionados por el fabricante del inmunoanálisis del que disponía cada laboratorio. Los analizadores fueron calibrados con los patrones proporcionados por los distintos fabricantes.

2.9.1. Preparación del patrón líquido

El patrón líquido se preparó a partir de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada a la que previamente se le había asignado un valor de concentración de proteína mediante el procedimiento de Doescth.

Previamente a la preparación del patrón líquido, se calibró el material volumétrico necesario, anotándose la temperatura a la cual se realizó la calibración para poder corregir el volumen dispensado:

- Pipeta: se calibró la pipeta a 0,064 mL por pesada del mismo volumen de agua a temperatura ambiente ($n = 10$). Se calculó la media, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el volumen corregido. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.14.
- Matraz: se calibró un matraz aforado (clase DIN A) de 100 mL por pesada del mismo volumen de agua a temperatura ambiente ($n = 5$). Se calculó la media, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el volumen corregido. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.14.

	Temperatura (°C)	Media (g)	DE	CV (%)	Volumen (mL)
Pipeta	25	0,064	$1,7 \cdot 10^{-4}$	0,26	0,0646
Matraz	25	99,5	0,0	0,0	99,92

Tabla 2.14: Resultados de la calibración de la pipeta y el matraz aforado utilizados en la preparación del patrón líquido.

El patrón líquido se preparó diluyendo la solución de la creatina-quinasa 2 purificada, teniendo en cuenta que la concentración final de la enzima debía de estar dentro del intervalo de medida de los distintos inmunoanálisis en los que posteriormente se iba a valorar.

Se pipetearon 0,064 mL de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada en un matraz aforado calibrado de 100 mL, a continuación se añadió el diluyente compuesto por PIPES 25 mmol/L, ADP 2 mmol/L, 2-mercaptoetanol 5 mmol/L, NaCl 154 mmol/L y albúmina humana 50 g/L, pH 7,2. Una vez finalizada esta operación se prepararon 50 alícuotas de 0,5 mL, repartiéndose el resto del volumen en 6 alícuotas y se congelaron a -80 °C.

2.9.2. Laboratorios participantes

En la campaña de certificación participaron un total de siete laboratorios. En la Tabla 2.15. se detallan los datos correspondientes a los participantes, así como el código asignado a cada uno de ellos.

Código	Responsable	Dirección
1	E. Cusó	Balagué Center, L'Hospitalet de Llobregat, España
2	M. Hørder	University Hospital, Odense, Dinamarca
3	F. Ceriotti	Istituto Scientifico H. S. Raffaele, Milán, Italia
4	M. Panteghini	Spedali Civili, Brescia, Italia
5	X. Fuentes	Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, España
6	G. Schumann	Medizinische Hochschule, Hannover, Alemania
7	K. Hallermayer	Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania

Tabla 2.15: Datos de los distintos laboratorios participantes en la campaña de asignación de un valor de concentración de masa al material de referencia BCR 608.

2.9.3. Instrucciones proporcionadas a los participantes

A los distintos laboratorios participantes se les envió, además del material a valorar, las instrucciones que describían los distintos pasos a seguir así como un formulario a rellenar con los datos obtenidos (Anexo). Dichas instrucciones constaban de los siguientes apartados: calibración de pipetas, calibración del analizador, reactivos, controles, patrón líquido, material de referencia BCR 608, procedimiento de medida y resultados. En cada uno de los apartados se describía detalladamente el procedimiento y los pasos a realizar.

2.9.3.1. Calibración de pipetas

Todos los participantes debían calibrar una pipeta de 1 mL con la que se reconstituiría posteriormente el material de referencia. La pipeta se calibraba mediante la adición de dicho volumen de agua a temperatura ambiente a un recipiente previamente tarado en una balanza con una precisión de 0,1 mg. Este procedimiento se repetía diez veces. Una vez finalizada esta operación se realizaba el cálculo de la media y, teniendo en cuenta la temperatura, el volumen dispensado corregido. En la Tabla 2.16. se indican los datos obtenidos para cada laboratorio.

Código	Media (g)	CV (%)	Temperatura (°C)	Volumen (mL)
1	0,9933	0,30	24,1	0,9969
2	0,9971	0,13	22,0	0,9993
3	0,9968	0,15	24,0	1,0006
4	0,9968	0,06	24,5	1,0000
5	0,9970	1,60	25,0	1,0009
6	0,9962	0,01	23,1	0,9996
7	0,9946	0,41	24,0	0,9973

Tabla 2.16: Datos obtenidos en la calibración de la pipeta de 1 mL por los distintos laboratorios.

2.9.3.2. Calibración del analizador

Cada laboratorio participante disponía de un analizador diferente. Los analizadores se calibraron con los calibradores proporcionados por el fabricante tal y como se describía en las especificaciones del equipo. En la Tabla 2.17. se indica el fabricante y el analizador, así como el tipo de calibración empleado por cada

laboratorio. Los laboratorios 2 y 4 midieron la concentración de la isoenzima en dos analizadores diferentes.

Código	Fabricante	Analizador	Calibración
1	Abbott Laboratories	IMx [®]	6 puntos
2a	Roche Diagnostics	Elecsys [®] 1010	2 puntos
2b	DPC	Immulin [®]	2 puntos
3	Dade-Behring	Dimension [®]	6 puntos
4a	Dade-Behring	Opus Plus [™]	6 puntos
4b	Roche Diagnostics	Elecsys [®] 2010	2 puntos
5	Chiron Diagnostics	ACS:180 [®] SE	2 puntos
6	Abbott Laboratories	AxSYM [®]	6 puntos
7	Roche Diagnostics	Elecsys [®] 290	2 puntos

Tabla 2.17: Especificaciones relativas a los analizadores utilizados por los distintos laboratorios en la campaña de certificación de un valor de concentración de masa al material de referencia BCR 608.

2.9.3.3. Reactivos y controles

Puesto que los analizadores utilizados por los distintos laboratorios eran diferentes, cada participante realizó las mediciones con los reactivos correspondientes al analizador empleado y verificó las series de medida con los controles proporcionados por el fabricante correspondiente.

2.9.3.4. Patrón líquido y material de referencia

A cada participante se le proporcionaron 4 viales del patrón líquido. Estos se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización. Antes de su utilización se mantenían a temperatura ambiente durante unos minutos, y una vez descongelados totalmente, se agitaban y se trataban igual que una muestra.

El material de referencia fue proporcionado por el IRMM. Cada participante recibió 6 viales, excepto los laboratorios 2 y 4 que recibieron un total de 12 viales. Estos se mantuvieron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización. El procedimiento mediante el cual se reconstituyeron los viales de BCR 608 fue el siguiente:

- Justo antes de su reconstitución se extraían de la nevera y se dejaban unos minutos a temperatura ambiente.
- Antes de destaparlos se cercioraba de que todo el material sólido se encontraba en el fondo del vial.
- Se destapaban con cuidado evitando que el liofilizado saliese del vial.
- El contenido del vial se reconstituía cuidadosamente a temperatura ambiente mediante la adición de 1 mL de agua destilada con la pipeta calibrada.
- Tras la adición de agua destilada, se dejaba durante unos minutos a temperatura ambiente y se mezclaba el contenido suavemente mediante inversión.
- El vial, una vez reconstituido, se guardaba a 4 °C hasta el momento de su utilización. La medición se realizaba el mismo día de su reconstitución.

2.9.3.5. Procedimiento de medida

Los procedimientos de medida mediante los cuales se midió la concentración de masa de la creatina-quinasa 2, tanto en el patrón líquido como en el material de referencia, se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones proporcionadas por los fabricantes de los equipos.

Durante tres días, tras la calibración correspondiente, cada participante media la concentración de la isoenzima en dos viales del BCR 608 (una medida por vial) y del patrón líquido por duplicado (dos medidas por vial). Previamente, se medía la creatina-quinasa 2 en los sueros control utilizados por cada laboratorio. Los valores obtenidos fueron anotados en las casillas correspondientes del formulario.

2.9.4. Cálculo de la concentración de masa

La concentración de masa del BCR 608 se calculó usando como calibradores los proporcionados por el fabricante de cada inmunoanálisis, y usando como calibrador el patrón líquido. La señal medida para las distintas muestras por los diferentes analizadores se interpolada en la curva de calibración generada a partir de los calibradores comerciales, de manera que se obtenían directamente los valores de concentración de masa.

El error volumétrico cometido en la reconstitución del material de referencia se corrigió mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{BCR 608}]_{\text{Corregida}} = [\text{BCR 608}] \times d$$

Donde d es la relación entre el volumen dispensado de la pipeta utilizada en la reconstitución y su valor nominal, $[\text{BCR 608}]$ es la concentración de masa medida del BCR 608.

La concentración de masa obtenida utilizando el patrón líquido como calibrador se recalculó mediante la siguiente ecuación:

$$\rho \text{ (}\mu\text{g/L)} = 80,362 \times \frac{[\text{BCR 608}]_{\text{Corregida}}}{[\text{Patrón líquido}]}$$

Donde ρ es el valor de concentración de masa del BCR 608 cuando se usa como calibrador el patrón líquido, $[\text{BCR 608}]_{\text{Corregida}}$ es la concentración de masa medida corregida del BCR 608, $[\text{patrón líquido}]$ es la media intradía de la concentración de masa del patrón líquido y 80,362 es el valor asignado de concentración de proteína al patrón líquido.

En la Figura 2.8. se puede ver un esquema en el que se detallan los distintos pasos seguidos en el cálculo de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 del BCR 608.

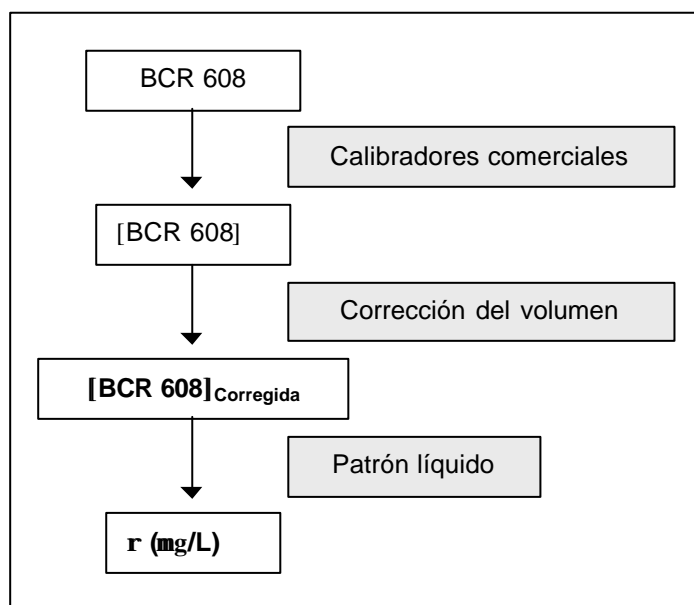


Figura 2.8: Esquema de los pasos seguidos en el cálculo de la concentración de masa del BCR 608.

2.9.5. Cálculo de la incertidumbre

El valor de concentración de masa asignado al material de referencia BCR 608 era trazable al SRM 927b. La incertidumbre asociada a esta concentración se calculó teniendo en cuenta los distintos componentes de los diferentes pasos involucrados durante la certificación. En primer lugar se tuvo en cuenta la incertidumbre asociada al proceso de dilución del SRM 927b, esta operación se realizó con el objetivo de obtener una concentración que estuviese dentro del intervalo de medida del procedimiento de Doeschth, de manera que el material de referencia diluido se utilizó como calibrador de este procedimiento de medida (1). También se midió la incertidumbre asociada, tanto al proceso de asignación de un valor de concentración de proteína mediante el procedimiento de Doeschth a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada (2), como a la posterior dilución de esta solución (patrón líquido), que más adelante sería utilizada como calibrador en la asignación de un valor de concentración de masa al BCR 608 (3). Por último, se halló la incertidumbre del procedimiento de asignación de un valor de concentración de masa al material de referencia BCR 608 mediante distintos inmunoanálisis comerciales (4).

De cada uno de los pasos descritos anteriormente se calculó la incertidumbre asociada mediante la estimación de la raíz cuadrada de la suma de las desviaciones estándar al cuadrado de aquellos componentes sujetos a errores que pudiesen influir sobre el resultado. En la Tabla 2.18. se detallan los componentes agrupados en los diferentes pasos involucrados.

A partir de la incertidumbre estándar combinada obtenida en la asignación de un valor de concentración de masa del BCR 608 que comprendía aproximadamente un 68% de los valores posibles de concentración, se midió la incertidumbre expandida con un nivel de confianza del 95%. Para ello, se multiplicó la incertidumbre estándar combinada por un factor $k = 2$.

Paso	Componente de incertidumbre
Dilución del SRM 927b	Concentración de proteína del SRM 927b Densidad del SRM 927b Masa pesada Volumen del matraz
Asignación de un valor de concentración de proteína a la solución diluida de la creatina-quinasa 2	Concentración del SRM 927b diluido (paso anterior) Valor asignado por el procedimiento de Doestch.
Preparación del patrón líquido	Concentración de la solución de la creatina-quinasa 2 Volumen de la pipeta Volumen del matraz
Asignación de un valor de concentración de masa al BCR 608	Concentración del patrón líquido Valor asignado en la campaña de certificación.

Tabla 2.18: Componentes sujetos a errores agrupados en los diferentes pasos de la certificación del BCR 608.

RESULTADOS

3.1. PURIFICACIÓN DE LA CREATINA-QUINASA 2

El objetivo de la purificación de la creatina-quinasa 2 fue la obtención de la isoenzima para la preparación del patrón líquido descrito en el apartado 2.9.1. También se utilizó en los estudios de conmutabilidad (apartado 2.7.).

A partir de 193 g de tejido miocárdico humano se obtuvieron 390 mL de extracto crudo, tal y como se describe en el apartado 2.2.1. El extracto crudo se precipitó con etanol (apartado 2.2.2.). Después de la centrifugación, el precipitado se resuspendió con 85 mL de tampón de homogeneización.

La purificación de la isoenzima 2 a partir del extracto crudo precipitado y dializado se realizó tal y como se describe en el apartado 2.2.3. En la Figura 3.1, se representa el cromatograma obtenido en la cromatografía de DEAE-Sephacel, donde se puede observar como la creatina-quinasa 3 eluía en el volumen del lavado mientras la isoenzima 2 quedaba retenida en el gel. La creatina-quinasa 2 retenida se eluyó a una concentración de 0,120 mol/L de NaCl. Las fracciones con actividad, se mezclaron y se concentraron hasta un volumen final de 13 mL.

El concentrado se aplicó a una columna de Blue-Sepharosa. El cromatograma obtenido se representa en la Figura 3.2. La enzima retenida por afinidad se eluyó al aumentar la fuerza iónica del tampón mediante la adición de 0,3 mol/L de NaCl. Las fracciones con actividad se mezclaron, se concentraron por ultrafiltración hasta un volumen de 13,5 mL. Tras una nueva aplicación a la columna de Blue-Sepharosa con el objetivo de eliminar la albúmina contaminante, la creatina-quinasa 2 retenida se eluyó mediante ADP 5 mmol/L, no se midió la concentración de proteína por absorbancia a 280 nm porque el ADP absorbía a esta longitud de onda. El pico de actividad se recogió y se concentró hasta un volumen final de 5,7 mL, y se guardó a -80 °C.

Los resultados obtenidos durante el proceso de purificación se resumen en las Tablas 3.1. y 3.2.

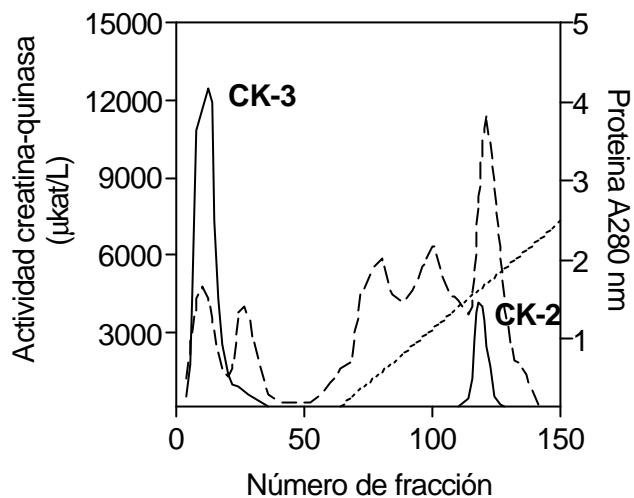


Figura 3.1: Cromatografía en DEAE-Sepharose pH 8,0. Concentración de proteína (mg/mL) medida por absorbancia a 280 nm (- - -), actividad de la creatina-quinasa total ($\mu\text{kat/L}$) (____) y gradiente de NaCl (.....).

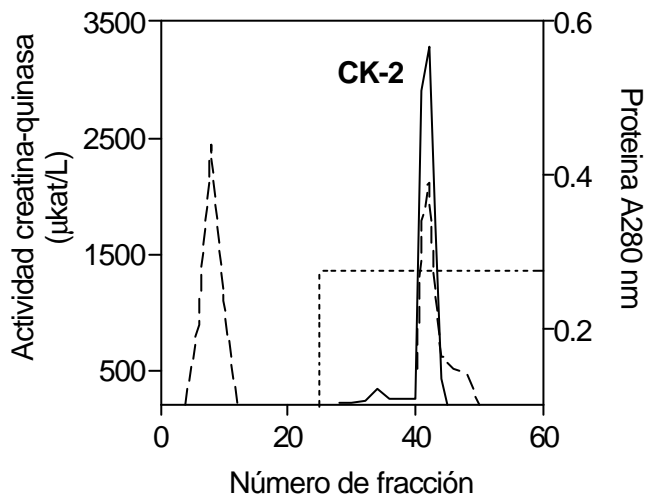


Figura 3.2: Cromatografía en Blue-Sepharose pH 7,0. Concentración de proteína (mg/mL) medida por absorbancia a 280 nm (- - -), actividad de la creatina-quinasa total ($\mu\text{kat/L}$) (____) y 0,3 mol/L de NaCl (.....).

Etapa	Proteína total (mg)	Actividad total (μ kat)	Actividad específica (μ kat/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
EC	6220,5	2521,7	0,405	100	1
DD	1287,4	1801,2	1,40	71,4	3,4
CK-3	172,7	716,5	4,15	28,4	10,2
CK-2	235,3	227,2	0,96	9,0	2,4
AF1	23,8	149,2	6,27	6,0	15,5
AF2	8,00	80,0	10,0	3,2	24,7

Tabla 3.1: Resultados de la purificación de la creatina-quinasa 2 a partir de 193 g de tejido miocárdico humano. Medidas de concentración catalítica de la creatina-quinasa total y de la concentración de proteína mediante el procedimiento de Coomassie. EC, extracto crudo; DD, precipitado de etanol al 70 % resuspendido y dializado; CK-3, pico del lavado de DEAE-Sephacel; CK-2, pico del eluido de DEAE-Sephacel; AF1, pico de la primera Blue-Sepharosa; AF2, pico de la segunda Blue-Sepharosa.

Etapa	Proteína total (mg)	Actividad total (μ kat)	Actividad específica (μ kat/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
EC	6220,5	1110,9	0,18	100	1
DD	1287,4	303,2	0,23	27,2	1,3
CK-3	172,7	–	–	–	–
CK-2	235,3	206,7	0,88	18,6	4,9
AF1	23,8	148,2	6,23	13,3	34,6
AF2	8,00	79,8	9,97	7,2	55,4

Tabla 3.2: Resultados de la purificación de la creatina-quinasa 2 a partir de 193 g de tejido miocárdico humano. Medidas de concentración catalítica de la creatina-quinasa 2 y de la concentración de proteína mediante el procedimiento de Coomassie. EC, extracto crudo; DD, precipitado de etanol al 70 % resuspendido y dializado; CK-3, pico del lavado de DEAE-Sephacel; CK-2, pico del eluido de DEAE-Sephacel; AF1, pico de la primera Blue-Sepharosa; AF2, pico de la segunda Blue-Sepharosa.

3.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA CREATINA-QUINASA 2 PURIFICADA Y ANÁLISIS DE PUREZA

El estudio de las características moleculares de la isoenzima 2 purificada y el análisis de su pureza se realizó mediante procedimientos electroforéticos, la disociación y posterior reasociación de sus subunidades, y mediante la medición de la concentración catalítica de posibles enzimas contaminantes.

3.2.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Se realizó una electroforesis en presencia de dodecil sulfato de sodio siguiendo el protocolo especificado en el apartado 2.6.1., para comprobar la pureza de la isoenzima purificada y calcular la masa molar de sus subunidades. De la misma manera se realizó un seguimiento del grado de purificación de cada etapa.

En la Figura 3.3 se muestran los resultados obtenidos una vez realizada la separación electroforética tras una tinción de Coomassie (apartado 2.6.3.1.). Cabe destacar la visualización de dos bandas en el carril donde se aplicó la enzima purificada con una masa molar de 40.800 y 44.500 g/mol, calculada tal y como se describe en el apartado 2.6.1.1., que coinciden con las de las subunidades M y B respectivamente de la creatina-quinasa.

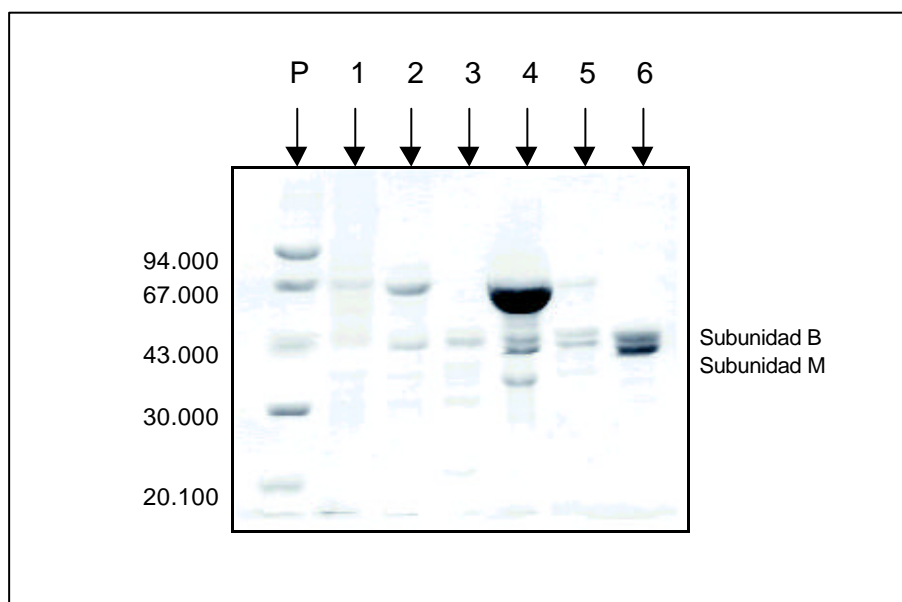


Figura 3.3: Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de las diferentes etapas de purificación de la creatina-quinasa. Se aplicaron 5 μ g de proteína por carril.

1, Extracto crudo; 2, precipitado de etanol al 70 %; 3, pico del lavado de DEAE-Sephacel; 4, pico eluido de DEAE-Sephacel; 5, pico del eluido de la primera Blue-Sepharosa; 6, pico del eluido de la segunda Blue-Sepharosa; P, patrón de masa molar.

3.2.2. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes

Se realizó una electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (apartado 2.6.2.) para identificar la presencia de la creatina-quinasa 2 y confirmar la ausencia en la muestra purificada de las isoenzimas 1 y 3 de la creatina-quinasa. La visualización de las bandas se realizó por tinción de Coomassie (apartado 2.6.3.1.), y mediante revelado por actividad (apartado 2.6.3.2.).

En las Figuras 3.4. y 3.5. se observa una única banda en el carril correspondiente al pico del eluido de la segunda Blue-Sepharosa correspondiente a la creatina-quinasa 2.

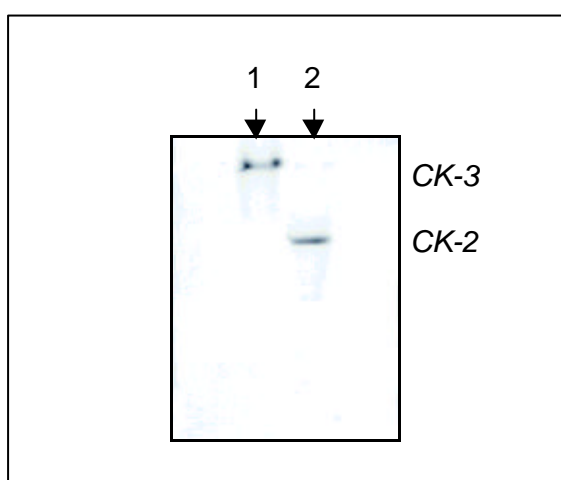


Figura 3.4: Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes. Tinción de Coomassie. 5 mg de proteína por carril.

1, pico del lavado de DEAE-Sephadex; 2, pico del eluido de la segunda Blue-Sepharosa.

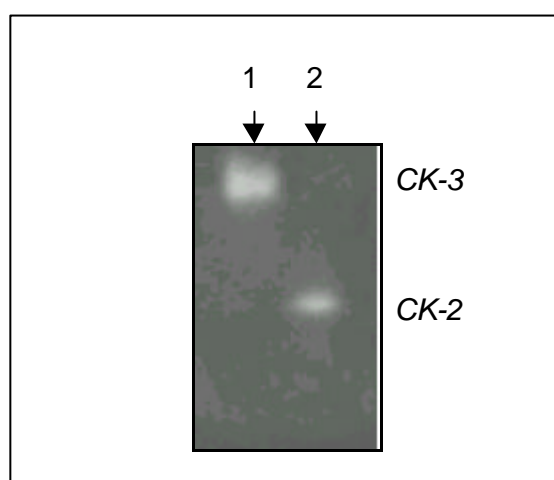


Figura 3.5: Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes. Revelado por actividad. 0,004 μ kat por carril.

1, pico del lavado de DEAE-Sephadex; 2, pico del eluido de la segunda Blue-Sepharosa.

3.2.3. Transferencia e identificación mediante anticuerpos específicos

El estudio de las características antigénicas de la creatina-quinasa 2 purificada se realizó mediante una transferencia de proteínas de un gel de electroforesis realizado en condiciones no desnaturalizantes a una membrana de PVDF, y un revelado con anticuerpos específicos (apartado 2.6.3.3.).

Se realizaron tres transferencias, cada una de las cuales se reveló con un anticuerpo específico diferente: un anticuerpo monoclonal contra la creatina-quinasa 2, un anticuerpo monoclonal contra la subunidad M y un anticuerpo monoclonal contra la subunidad B. También se realizó, junto con cada una de las transferencias, una

electroforesis en condiciones no desnaturalizantes que se reveló mediante una tinción de Coomassie.

Las Figuras 3.6., 3.7. y 3.8., muestran como cada uno de los anticuerpos reconocía una única banda en el carril correspondiente al pico del eluido de la segunda Blue-Sepharosa que coincidía con la banda teñida por el colorante.

3.2.4. Isoelectroenfoque

Mediante un isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida se midió el punto isoeléctrico de la creatina-quinasa 2 (apartado 2.6.4.).

El revelado mediante tinción de Coomassie evidenció la presencia de una banda mayoritaria con un pI de 5,56 en el carril donde se aplicó el eluido de la segunda Blue-Sepharosa (Figura 3.9.).

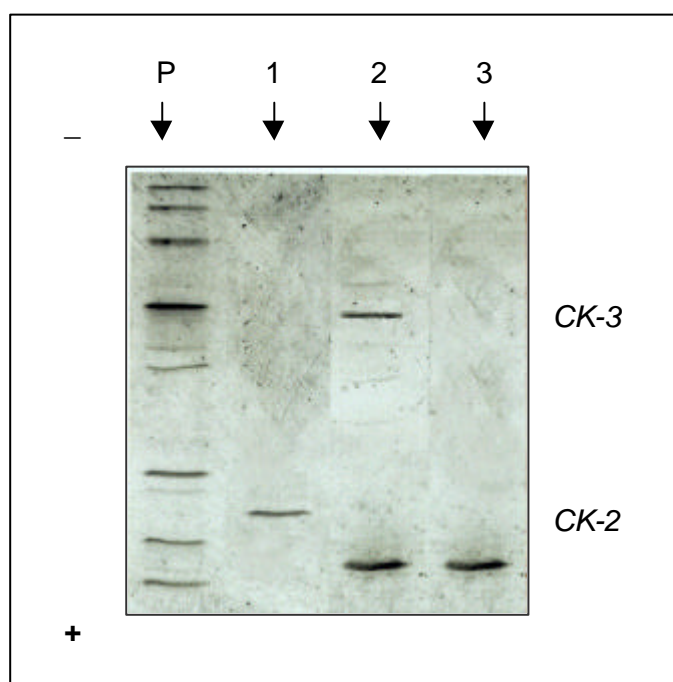


Figura 3.9.: Isoelectroenfoque. Tinción de Coomassie. 5 μ g de proteína por carril.

1, pico del eluido de la segunda Blue-Sepharosa; 2, pico del lavado de DEAE-Sepharcel; 3, Albúmina; P, Patrón de pI isoeléctrico.

3.2.5. Obtención de las isoenzimas 1 y 3 a partir de la isoenzima 2

La obtención de las isoenzimas 1 y 3 a partir de la isoenzima 2 purificada, se realizó con el objetivo de demostrar que las dos bandas obtenidas tras la realización de la electroforesis en condiciones desnaturizantes correspondían a la subunidad M y a la subunidad B.

A partir de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa purificada se obtuvieron las otras dos isoenzimas mediante la adición de urea (Xi-Cheng y cols., 1990). Una alícuota de 0,03 mL de creatina-quinasa 2 purificada con una concentración de 1,1 mg/mL de proteína se mezcló con 3 mL de una solución de urea 6 mol/L, Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,2. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante un tiempo total de 60 minutos, extrayéndose 1 mL de la solución a los 30 y 60 minutos de incubación. Las distintas alícuotas se sometieron a una dialisis de 24 h a 4 °C frente a una solución compuesta por Tris-HCl 50 mmol/L, 2-mercaptoetanol 10 mmol/L, EDTA.Na₂ 0,9 mmol/L y ADP 5 mmol/L, pH 7,0. Paralelamente se realizó una dialisis con una alícuota de 1 mL de creatina-quinasa 2 purificada que no había sido sometida a la acción del agente caotrópico (control).

Tras la dialisis, las diferentes alícuotas se concentraron hasta un volumen final de 0,05 mL y se sometieron a una electroforesis en condiciones no desnaturizantes. En la Figura 3.10. se muestra un gel de electroforesis revelado con tinción de Coomassie. El revelado por actividad de la creatina-quinasa se puede ver en la Figura 3.11. y las membranas de PVDF reveladas mediante un anticuerpo monoclonal contra la subunidad M y un anticuerpo monoclonal contra la subunidad B, en la Figura 3.12. y en la Figura 3.13., respectivamente.

Los distintos revelados mostraron la presencia de tres bandas con actividad y con distinta movilidad electroforética. De las tres bandas obtenidas, una era reconocida por el anticuerpo dirigido contra la subunidad M, otra era reconocida por el anticuerpo dirigido contra la subunidad B, y una tercera era reconocida por los dos anticuerpos.

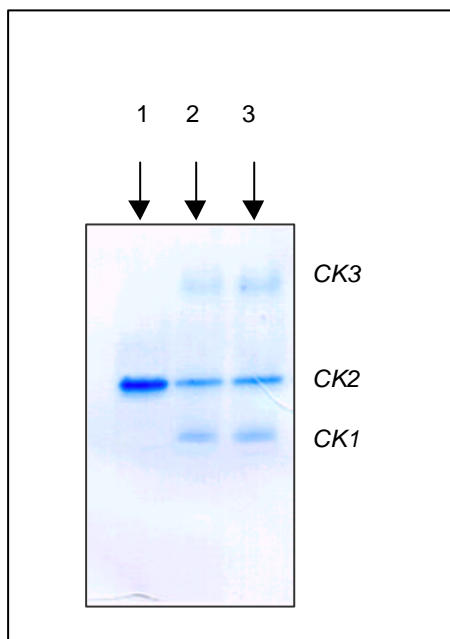


Figura 3.10: Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes. Tinción de Coomassie. 5 μ g de proteína por carril.

1, Control; 2, 30 minutos; 3, 60 minutos.

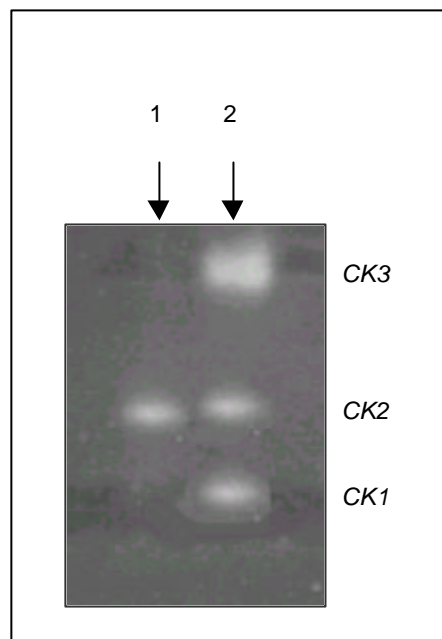


Figura 3.11: Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes. Revelado por actividad.

1, Control; 2, 30 minutos.

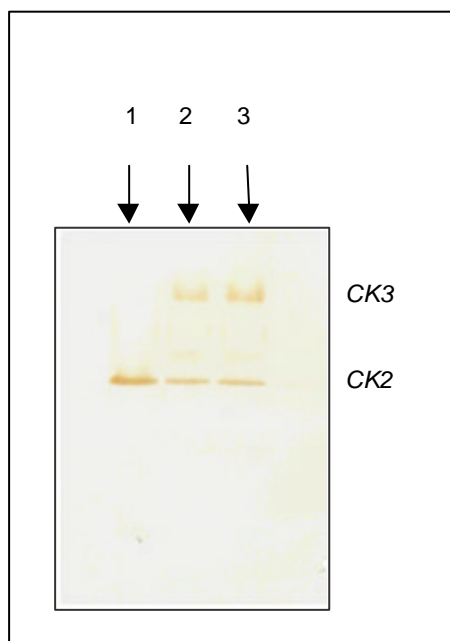


Figura 3.12: Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes. Revelado con un anticuerpo monoclonal contra la subunidad M.

1, Control; 2, 30 minutos; 3, 60 minutos.

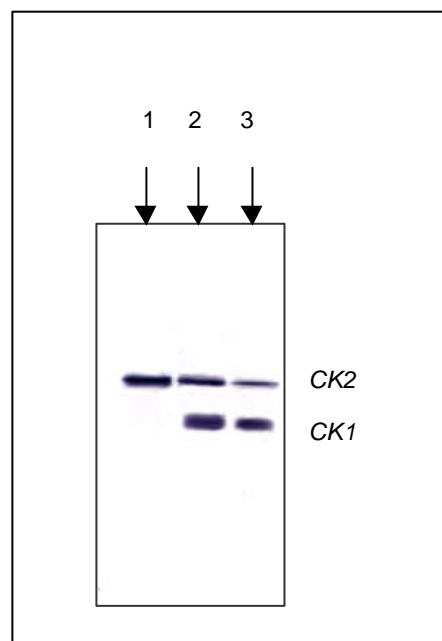


Figura 3.13: Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes. Revelado con un anticuerpo monoclonal contra la subunidad M.

1, Control; 2, 30 minutos; 3, 60 minutos.

3.2.6. Medición de enzimas contaminantes

Con el objetivo de detectar la presencia de posibles enzimas contaminantes en la solución de la creatina-quinasa 2 purificada, se midió la concentración catalítica de distintas enzimas que, o bien por su localización se podían encontrar en la fracción purificada, o bien por su participación como enzimas auxiliares en el procedimiento de medida de la concentración catalítica de la creatina-quinasa podían ocasionar resultados anómalos. Las enzimas medidas fueron: aspartato-aminotransferasa, alanina-aminotransferasa, L-lactato-deshidrogenasa, hexoquinasa y glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa.

En la Tabla 3.4. se muestran los resultados obtenidos expresados en porcentaje con respecto a la actividad total de la creatina-quinasa 2. Las actividades de las distintas enzimas se midieron mediante los procedimientos descritos en el apartado 2.3.

Enzima	Concentración catalítica (%)
Aspartato-aminotransferasa	ND
Alanina-aminotransferasa	ND
L-Lactato-deshidrogenasa	0,9 %
Hexoquinasa	ND
Glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa	ND

Tabla 3.4: *Medición de diferentes enzimas en la muestra purificada de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa. La concentración catalítica se expresa en porcentaje con respecto la actividad total de la creatina-quinasa 2. ND: no detectable.*

3.3. COMPARACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE MASA DE LA CREATINA-QUINASA 2 Y ESTUDIOS DE CONMUTABILIDAD

Se realizó un estudio comparativo de varios inmunoanálisis comerciales para determinar las diferencias existentes entre ellos. A la vez se estudió la conmutabilidad de la creatina-quinasa 2 en distintas matrices humanas, en una matriz sintética y en el material de referencia BCR 608.

3.3.1. Comparación de inmunoanálisis

Se compararon los cinco inmunoanálisis descritos en el apartado 2.4: Stratus[®], IMx[®], Immulite[®], Elecsys[®] y ACS:180[®]. Para ello se midió la concentración de masa de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en cien especímenes de plasma obtenidos tal y como se describe en el apartado 2.7.1. El objetivo de este estudio comparativo fue la determinación de la intercambiabilidad de resultados obtenidos con los distintos procedimientos, y de no ser así, detectar la existencia de diferencias proporcionales y/o constantes.

Tras la correspondiente calibración del inmunoanálisis y su validación mediante la medición de la concentración de masa en distintos sueros control de concentración conocida, se midió la concentración en los especímenes plasmáticos.

Una vez comprobada la existencia de una relación lineal entre los dos procedimientos a comparar mediante el test de Cusum, se realizó la comparación mediante el procedimiento de Passing y Bablok. Las ecuaciones obtenidas para la recta de regresión ($y = a + bx$) se muestran en la Tabla 3.5. En las Figuras 3.14.A. y 3.14.B. se muestran las gráficas obtenidas en cada una de las comparaciones.

Las rectas de regresión obtenidas en la comparación entre el procedimiento de Elecsys y los otros cuatro inmunoanálisis no contienen el valor 0 en el intervalo de confianza de la ordenada en el origen. Esto indica que hay pequeñas diferencias de tipo constante entre Elecsys y el resto de los inmunoanálisis comparados.

Tan sólo en las comparaciones ACS:180/Stratus y ACS:180/IMx, se obtienen rectas de regresión que contienen en el intervalo de confianza de la pendiente el valor 1. Esto indica que existen diferencias de tipo proporcional entre el resto de los inmunoanálisis comparados.

x	y	n	Pendiente	Ordenada en el origen	r
Stratus	ACS:180	83	1,09 (0,99/1,18)	-1,32 (-3,95/1,54)	0,91
Stratus	Elecsys	85	1,33 (1,26/1,42)	-4,20 (-7,63/-2,03)	0,96
Stratus	IMx	85	1,14 (1,08/1,21)	-0,99 (-2,58/1,00)	0,92
Stratus	Immolute	82	1,26 (1,18/1,34)	-1,64 (-4,56/1,34)	0,95
ACS:180	Elecsys	97	1,26 (1,19/1,36)	-2,75 (-6,08/-0,67)	0,94
ACS:180	IMx	95	1,03 (0,97/1,09)	0,77 (-0,76/3,05)	0,96
ACS:180	Immolute	92	1,14 (1,07/1,22)	1,35 (-1,80/3,31)	0,96
Elecsys	IMx	97	0,83 (0,77,0,89)	3,60 (0,97/6,57)	0,92
Elecsys	Immolute	94	0,90 (0,86/0,96)	2,63 (1,29/4,90)	0,96
IMx	Immolute	92	1,06 (1,03/1,12)	-0,45 (-2,53/1,53)	0,96

Tabla 3.5: Parámetros de las rectas obtenidas en la comparación de los cinco inmunoanálisis con especímenes de plasma aplicando la regresión no paramétrica de Passing y Bablok, donde "r" es el coeficiente de correlación y "n" el número de especímenes empleados en cada comparación. Entre paréntesis se muestran los intervalos de confianza del 95%.

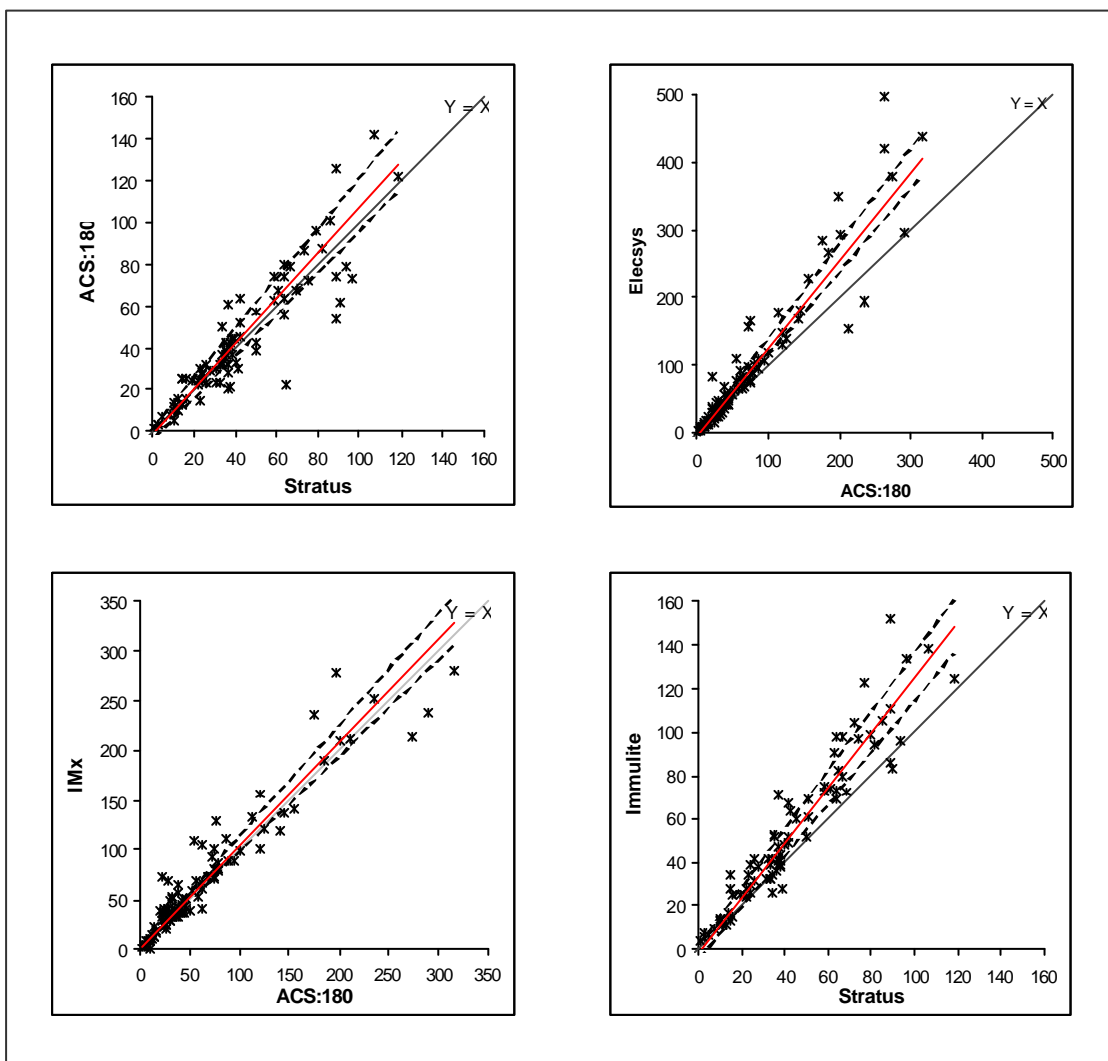


Figura 3.14.A: Rectas obtenidas en la comparación de los cinco inmunoanálisis con especímenes de plasma aplicando la regresión no paramétrica de Passing y Bablok. Recta de regresión (—), intervalo de confianza del 95% (- - -) y recta de identidad (x-x-x-x-).

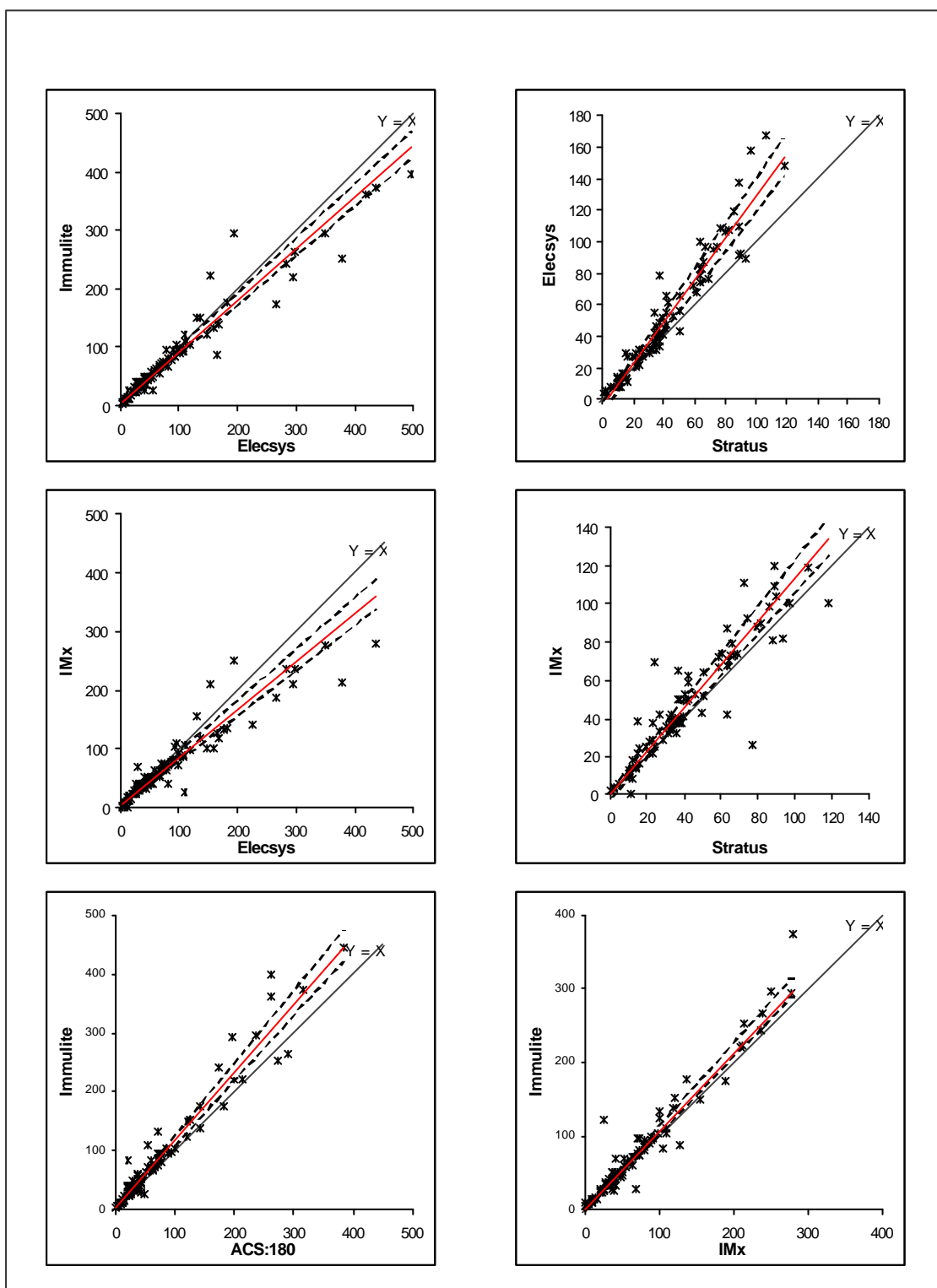


Figura 3.14.B: Rectas obtenidas en la comparación de los cinco inmunoanálisis con especímenes de plasma aplicando la regresión no paramétrica de Passing y Bablok. Recta de regresión (—), intervalo de confianza del 95% (- - -) y recta de identidad (x-x-x-x-x).

La relación existente entre los cinco inmunoanálisis, teniendo en cuenta únicamente las diferencias proporcionales, se resume en la siguiente ecuación.

$$\text{Elecsys} = 1,10 \wedge \text{Immulate} = 1,20 \wedge \text{IMx} = 1,26 \wedge \text{ACS:180} = 1,33 \wedge \text{Stratus}$$

3.3.2. Estudios de conmutabilidad: efecto de la matriz

El estudio del efecto de la matriz en los cinco inmunoanálisis se realizó mediante la medición de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en cinco materiales diferentes a los que se les había añadido la enzima purificada (apartado 2.7.2). En primer lugar se determinó la conmutabilidad de los distintos materiales respecto a los especímenes, y después se realizó un estudio comparativo entre ellos.

3.3.2.1. Conmutabilidad de las matrices

3.3.2.1.1. Matriz sérica

La concentración de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz sérica se midió por cuadruplicado con cada uno de los procedimientos analíticos. También se midió la concentración de la isoenzima en la mezcla de sueros utilizados para la preparación de la matriz, y se calculó la diferencia entre cada concentración individual de la matriz sérica y la media de las concentraciones medidas en la mezcla de sueros. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.6.

Inmunoanálisis	Concentración ($\mu\text{g/L}$)		Media	DE	CV (%)
Stratus	58,3	57,4	57,5	0,58	1,0
	57,5	56,9			
ACS:180	35,5	35,9	35,4	0,70	1,9
	36,0	34,6			
Elecsys	64,9	63,9	69,2	2,10	3,0
	63,7	68,2			
IMx	61,8	48,4	55,4	6,27	11,3
	59,4	51,9			
Immulite	66,7	68,9	69,6	1,62	2,3
	66,2	69,5			

Tabla 3.6: Concentración de masa ($\mu\text{g/L}$) de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz sérica obtenida en cada uno de los inmunoanálisis ($n = 4$). DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

A partir de estos resultados se midió la conmutabilidad de la creatina-quinasa 2 en la matriz sérica (Tabla 3.7.). Con los valores obtenidos se puede deducir que la creatina-quinasa 2 en la matriz sérica no se comporta de forma equivalente a los especímenes humanos, ya que sólo es conmutable en dos de las diez comparaciones, entre Stratus/Immulite, y Elecsys/IMx.

x	y	Pendiente	y/x				
			s	ds	p	dp	sint
Stratus	ACS:180	1,09 (0,99/1,18)	0,62	0,70	0,58	0,69	0,67
Stratus	Elecsys	1,33 (1,26/1,42)	1,13	1,00	1,34	0,85	0,58
Stratus	IMx	1,14 (1,08/1,21)	0,96	0,86	1,22	0,72	0,57
Stratus	Immuline	1,26 (1,18/1,34)	1,18	0,91	1,18	0,70	0,38
ACS:180	Elecsys	1,26 (1,19/1,36)	1,84	1,42	2,31	1,23	0,87
ACS:180	IMx	1,03 (0,97/1,09)	1,56	1,23	2,10	1,05	0,99
ACS:180	Immuline	1,14 (1,07/1,22)	1,91	1,29	2,03	1,09	0,57
Elecsys	IMx	0,83 (0,77,0,89)	0,85	0,87	0,91	0,85	0,97
Elecsys	Immuline	0,90 (0,86/0,96)	1,04	0,91	0,88	0,88	0,65
IMx	Immuline	1,06 (1,03/1,12)	1,22	1,05	0,96	1,04	0,67

Tabla 3.7: Conmutabilidad de las matrices. s: matriz sérica, ds: matriz sérica dializada, p: matriz plasmática, dp: matriz plasmática dializada, sint: matriz sintética. En negrita se indica la conmutabilidad.

La relación existente entre los cinco inmunoanálisis para la matriz sérica se resume en la siguiente ecuación:

$$\text{Elecsys} = 0,96 \cdot \text{Immuline} = 1,18 \cdot \text{IMx} = 1,84 \cdot \text{ACS:180} = 1,13 \cdot \text{Stratus}$$

3.3.2.1.2. Matriz sérica dializada

La concentración de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz sérica dializada se midió por cuadruplicado con cada uno de los procedimientos analíticos. También se midió la concentración de la isoenzima en la mezcla de sueros dializados utilizados para la preparación de la matriz, y se calculó la diferencia entre cada concentración individual de la matriz sérica dializada y la media de las concentraciones medidas en la mezcla de sueros dializados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.8.

A partir de estos resultados se midió la conmutabilidad de la matriz sérica dializada (Tabla 3.7). Con los valores obtenidos se puede deducir que la creatina-quinasa 2 en la matriz sérica dializada es conmutable en las comparaciones entre Elecsys/IMx, Elecsys/Immuline, IMx/Immuline.

Inmunoanálisis	Concentración ($\mu\text{g/L}$)		Media	DE	CV (%)
Stratus	89,4	87,4	87,8	1,52	1,7
	88,6	85,9			
ACS:180	62,1	60,9	61,8	1,93	3,1
	64,3	59,8			
Elecsys	87,9	86,8	87,7	0,62	0,7
	87,8	88,1			
IMx	77,9	75,0	76,3	2,84	3,7
	79,3	73,0			
Immulite	80,4	80,3	80,2	4,41	5,5
	74,7	85,5			

Tabla 3.8: Concentración de masa ($\mu\text{g/L}$) de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz sérica dializada obtenida en cada uno de los inmunoanálisis ($n = 4$). DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

La relación existente entre los cinco inmunoanálisis para la matriz sérica dializada se resume en la siguiente ecuación:

$$\text{Elecsys} = 1,09 \wedge \text{Immulite} = 1,15 \wedge \text{IMx} = 1,42 \wedge \text{ACS:180} = 1,00 \wedge \text{Stratus}$$

3.2.2.1.3. Matriz plasmática

La concentración de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz plasmática se midió por cuadruplicado con cada uno de los procedimientos analíticos. También se midió la concentración de la isoenzima en la mezcla de plasmas utilizados para la preparación de la matriz, y se calculó la diferencia entre cada concentración individual de la matriz plasmática y la media de las concentraciones medidas en la mezcla de plasmas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.9.

A partir de estos resultados se midió la conmutabilidad de la matriz plasmática (Tabla 3.7.). Con los valores obtenidos se puede deducir que la creatina-quinasa 2 en la matriz plasmática es conmutable en las comparaciones entre Stratus/Elecsys, Stratus/Immulite, y Elecsys/Immulite.

La relación existente entre los cinco inmunoanálisis para la matriz plasmática se resume en la siguiente ecuación:

$$\text{Elecsys} = 1,13 \wedge \text{Immulite} = 1,10 \wedge \text{IMx} = 2,31 \wedge \text{ACS:180} = 1,34 \wedge \text{Stratus}$$

Inmunoanálisis	Concentración (µg/L)		Media	DE	CV (%)
Stratus	72,6	71,7	71,5	0,99	1,4
	71,3	70,9			
ACS:180	43,2	39,9	41,5	1,91	4,6
	39,8	43,1			
Elecsys	91,6	96,9	95,8	3,33	3,5
	95,1	99,6			
IMx	86,6	88,8	87,4	1,39	1,6
	85,8	88,2			
Immulite	82,9	89,0	84,3	3,26	3,9
	81,9	83,7			

Tabla 3.9: Concentración de masa (µg/L) de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz plasmática dializada obtenida en cada uno de los inmunoanálisis (n = 4). DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

3.3.2.1.4. Matriz plasmática dializada

La concentración de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz plasmática dializada se midió por cuadruplicado con cada uno de los procedimientos analíticos. También se midió la concentración de la isoenzima en la mezcla de plasmas dializados utilizados para la preparación de la matriz, y se calculó la diferencia entre cada concentración individual de la matriz plasmática dializada y la media de las concentraciones medidas en la mezcla de plasmas dializados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.10.

Inmunoanálisis	Concentración (µg/L)		Media	DE	CV (%)
Stratus	111,7	105,2	106,7	5,72	5,3
	110,7	99,3			
ACS:180	73,2	73,6	73,6	1,33	1,8
	73,1	75,4			
Elecsys	90,5	89,6	90,6	0,88	1,0
	91,7	90,5			
IMx	76,4	81,8	77,2	3,18	4,1
	75,8	74,6			
Immulite	76,4	77,2	83,2	3,98	4,8
	81,9	84,8			

Tabla 3.10: Concentración de masa (µg/L) de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz plasmática dializada obtenida en cada uno de los inmunoanálisis (n = 4). DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

A partir de estos resultados se midió la conmutabilidad de la matriz (Tabla 3.7.). Con los valores obtenidos se puede deducir que la creatina-quinasa 2 en la matriz plasmática dializada es conmutable en las comparaciones entre ACS:180/Elecsys, ACS:180/IMx, ACS:180/Immolute, Elecsys/IMx, Elecsys/Immolute, e IMx/Immolute.

La relación existente entre los cinco inmunoanálisis para la matriz plasmática dializada se resume en la siguiente ecuación:

$$\text{Elecsys} = 1,13 \cdot \text{Immolute} = 1,17 \cdot \text{IMx} = 1,23 \cdot \text{ACS:180} = 0,85 \cdot \text{Stratus}$$

3.3.2.1.5. Matriz sintética

La concentración de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz sintética se midió por cuadruplicado con cada uno de los procedimientos analíticos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.11.

A partir de estos resultados se midió la conmutabilidad de la matriz sintética (Tabla 3.7.). Con los valores obtenidos se puede deducir que la creatina-quinasa 2 en la matriz sintética no se comporta de forma equivalente a los especímenes humanos, ya que sólo es conmutable en la comparación entre ACS:180/IMx.

Inmunoanálisis	Concentración ($\mu\text{g/L}$)		Media	DE	CV (%)
Stratus	131,1	134,9	131,7	2,29	1,7
	131,2	129,5			
ACS:180	88,5	88,7	88,6	1,17	1,3
	88,0	90,3			
Elecsys	77,3	78,9	77,4	1,36	1,7
	77,7	75,7			
IMx	72,0	78,0	74,4	3,40	4,6
	76,5	71,0			
Immolute	53,9	48,1	51,6	2,50	4,8
	52,9	51,7			

Tabla 3.11: Concentración de masa ($\mu\text{g/L}$) de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz sintética obtenida en cada uno de los inmunoanálisis ($n = 4$). DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

La relación existente entre los cinco inmunoanálisis para la matriz sintética se resume en la siguiente ecuación:

$$\text{Elecsys} = 1,50 \cdot \text{Immolute} = 1,04 \cdot \text{IMx} = 0,87 \cdot \text{ACS:180} = 0,58 \cdot \text{Stratus}$$

3.3.2.2. Comparación entre las matrices dializadas y sin dializar

La medición de la creatina-quinasa 2 en la matriz sérica y en la matriz plasmática, dializadas y sin dializar, se realizó con el objetivo de estudiar el efecto de la eliminación de los componentes de baja masa molar sobre cada uno de los inmunoanálisis.

La comparación de las medias obtenidas para la matriz sérica dializada y sin dializar mediante la distribución de Student (t), muestra la existencia de diferencias significativas entre las dos matrices para cada uno de los inmunoanálisis, siendo las concentraciones más elevadas en la matriz sérica dializada ($\alpha = 0,05$).

En la Tabla 3.12. se muestra la media y su intervalo de confianza del 95% obtenido por cada procedimiento para cada una de las matrices. También se muestra la relación existente entre las dos matrices (%), que pone de manifiesto el aumento que se produce al eliminar las sustancias dializables del suero.

Inmunoanálisis	Matriz sérica dializada ($\mu\text{g/L}$)	Matriz sérica ($\mu\text{g/L}$)	Relación (%)
Stratus	$87,8 \pm 2,42$	$57,5 \pm 0,92$	34
ACS:180	$61,8 \pm 3,07$	$35,4 \pm 1,01$	42
Elecsys	$87,7 \pm 0,92$	$65,2 \pm 3,31$	25
IMx	$76,3 \pm 4,51$	$55,4 \pm 9,99$	27
Immulite	$80,2 \pm 7,02$	$67,8 \pm 2,58$	15

Tabla 3.12: Concentración de masa ($\mu\text{g/L}$) de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz sérica dializada y sin dializar, e intervalo de confianza del 95% para cada una de las medias ($n = 4$). "Relación", es el cociente de la diferencia entre las dos matrices y la matriz sérica dializada.

La comparación de las medias obtenidas para la matriz plasmática dializada y sin dializar mediante la distribución de Student (t), muestra la existencia de diferencias significativas entre las dos matrices cuando la medición se realizó en Stratus, en ACS:180 y en IMx, siendo las concentraciones mayores en la matriz dializada para los dos primeros e inferiores para IMx ($\alpha = 0,05$). No había diferencias significativas cuando la medición se realizó en Elecsys ($\alpha = 0,01$) o en Immulite ($\alpha = 0,05$).

En la Tabla 3.13. se muestra la media y su intervalo de confianza del 95% obtenido por cada procedimiento para cada una de las matrices. También se describe la relación existente entre las dos matrices (%), que pone de manifiesto las variaciones producidas en la medición como consecuencia de la eliminación de las sustancias dializables del plasma.

Inmunoanálisis	Matriz plasmática dializada ($\mu\text{g/L}$)	Matriz plasmática ($\mu\text{g/L}$)	Relación (%)
Stratus	106,7 \pm 9,09	71,5 \pm 0,57	33
ACS:180	73,6 \pm 1,70	41,5 \pm 3,03	43
Elecsys	90,6 \pm 1,37	95,8 \pm 5,34	-5
IMx	77,2 \pm 5,07	87,4 \pm 2,21	-13
Immulin	80,1 \pm 6,33	84,3 \pm 4,99	-5

Tabla 3.13: Concentración de masa ($\mu\text{g/L}$) de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz plasmática dializada y sin dializar medida ($n = 4$), e intervalo de confianza del 95% para cada una de las medias. "Relación", es el cociente de la diferencia entre las dos matrices y la matriz plasmática dializada.

3.3.2.3. Comparación entre las matrices sérica y plasmática dializadas y sin dializar

Se realizó una comparación entre las matrices sérica y plasmática dializadas y sin dializar, con el objetivo de estudiar las diferencias existentes entre ellas.

En la Tabla 3.14. se muestran los resultados de la comparación entre la matriz sérica y plasmática sin dializar. La media de los valores de concentración obtenidos para cada inmunoanálisis es significativamente superior cuando la medición de la creatina-quinasa 2 se realiza en la matriz plasmática ($\alpha = 0,05$). Al dializar las matrices, estas diferencias sólo se mantienen en dos inmunoanálisis, Stratus y ACS:180, mientras que para Elecsys, IMx e Immulin la concentración no varía en función de la matriz dializada (Tabla 3.15.). Sin embargo, al realizar la comparación de las medias mediante la distribución de Student (t), se obtienen diferencias significativas para Stratus, ACS:180 y Elecsys ($\alpha = 0,05$).

Inmunoanálisis	Matriz plasmática ($\mu\text{g/L}$)	Matriz sérica ($\mu\text{g/L}$)	Relación (%)
Stratus	71,5 \pm 0,57	57,5 \pm 0,92	19
ACS:180	41,5 \pm 3,03	35,4 \pm 1,01	14
Elecsys	95,8 \pm 5,34	65,2 \pm 3,31	31
IMx	87,4 \pm 2,21	55,4 \pm 9,99	36
Immulin	84,3 \pm 4,99	67,8 \pm 2,58	19

Tabla 3.14: Concentración de masa ($\mu\text{g/L}$) de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz plasmática y la matriz sérica ($n = 4$), e intervalo de confianza del 95% para cada una de las medias. "Relación", es el cociente entre la diferencia de las dos matrices y la matriz plasmática.

Inmunoanálisis	Matriz plasmática dializada (µg/L)	Matriz sérica dializada (µg/L)	Relación (%)
Stratus	106,7 ± 9,09	87,8 ± 2,42	17
ACS:180	73,6 ± 1,70	61,8 ± 3,07	16
Elecsys	90,6 ± 1,37	87,7 ± 0,92	3
IMx	77,2 ± 5,07	76,3 ± 4,51	1
Immulite	80,1 ± 6,33	80,2 ± 7,02	0

Tabla 3.15: Concentración de masa (µg/L) de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en la matriz plasmática dializada y la matriz sérica dializada (n = 4), e intervalo de confianza del 95% para cada una de las medias. "Relación", es el cociente entre la diferencia de las dos matrices y la matriz plasmática dializada.

3.3.3. Conmutabilidad del material de referencia BCR 608

Siguiendo el mismo procedimiento que el usado para las matrices, se estudió la conmutabilidad del material de referencia BCR 608 de la creatina-quinasa 2. Una vez reconstituido el material de referencia, la concentración de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa se midió por cuadruplicado con cada uno de los inmunoanálisis. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.16.

A partir de estos resultados se midió la conmutabilidad del material, el valor para cada una de las comparaciones se muestra en la Tabla 3.17. Con estos resultados se puede deducir que la creatina-quinasa 2 del material de referencia no se comporta de forma equivalente a los especímenes humanos, ya que sólo es conmutable en la comparación entre Elecsys/Immulite.

Inmunoanálisis	Concentración (µg/L)		Media	DE	CV (%)
Stratus	101,7	99,5	102,4	2,50	2,4
	105,5	102,9			
ACS:180	65,8	66,5	66,15	1,31	1,9
	67,7	64,6			
Elecsys	61,6	65,7	63,1	1,96	3,1
	63,5	61,5			
IMx	63,4	64,7	62,1	3,00	4,8
	62,5	57,8			
Immulite	52,8	53,9	55,9	2,95	5,3
	58,2	58,6			

Tabla 3.16: Concentración de masa (µg/L) de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa en el material de referencia BCR 608 obtenida en cada uno de los inmunoanálisis (n = 4). DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

x	y	Pendiente	y/x
Stratus	ACS:180	1,09 (0,99/1,18)	0,65
Stratus	Elecsys	1,33 (1,26/1,42)	0,62
Stratus	IMx	1,14 (1,08/1,21)	0,60
Stratus	Immuline	1,26 (1,18/1,34)	0,55
ACS:180	Elecsys	1,26 (1,19/1,36)	0,95
ACS:180	IMx	1,03 (0,97/1,09)	0,94
ACS:180	Immuline	1,14 (1,07/1,22)	0,94
Elecsys	IMx	0,83 (0,77,0,89)	0,84
Elecsys	Immuline	0,90 (0,86/0,96)	0,88
IMx	Immuline	1,06 (1,03/1,12)	0,89

Tabla 3.17: Conmutabilidad del material de referencia BCR 608. En negrita se indica la conmutabilidad.

La relación existente entre los cinco inmunoanálisis para el material de referencia se resume en la siguiente ecuación:

$$\text{Elecsys} = 1,13 \cdot \text{Immuline} = 1,02 \cdot \text{IMx} = 0,95 \cdot \text{ACS:180} = 0,62 \cdot \text{Stratus}$$

3.4. ASIGNACIÓN DE UN VALOR DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL PROCEDIMIENTO DE DOETSCH

La asignación de un valor de concentración de proteína a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 se realizó mediante el procedimiento de Doetsch, tal y como se describe en el apartado 2.8. Previamente se realizó un estudio de las características metrológicas del procedimiento, así como un ensayo preliminar en el que colaboraron los distintos laboratorios participantes en la campaña.

3.4.1. Estudio de algunas características metrológicas del procedimiento de Doetsch

El estudio de algunas características metrológicas del procedimiento de Doetsch, se realizó con el objetivo de valorar aspectos del procedimiento de medida que posteriormente se iban a tener en cuenta durante la medición. Básicamente consistió en la determinación de la rectilinealidad, el límite de detección y la imprecisión.

Para la determinación de la rectilinealidad se realizaron diferentes diluciones en agua de una solución de albúmina sérica bovina 3 g/L comprendidas entre 0,09 y 1,5 g/L. Las medidas de cada dilución se realizaron por duplicado mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.5.3.2. Los resultados obtenidos mostraban una relación lineal entre la absorbancia medida y la concentración de la muestra dentro del intervalo de concentraciones estudiado. La recta de regresión lineal obtenida presentaba un coeficiente de regresión (r) de 0,9986, una pendiente de 1,111 y una ordenada en el origen de -0,018.

Para la determinación del límite de detección se realizaron diez mediciones del blanco compuesto por agua destilada. El límite de detección se calculó mediante la ecuación: $L_D = X_b + 3 DE$, donde X_b es la media de los valores del blanco y DE es la desviación estándar. El resultado obtenido tras la interpolación en la recta de calibración, realizada como se ha descrito anteriormente, que relacionaba absorbancia frente a concentración fue de 0,0045 g/L.

Para la estimación de la imprecisión interserial e intraserial se midieron tres series por triplicado de tres soluciones de albúmina sérica bovina de 0,1, 0,5 y 1,0 g/L. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.18.

Albúmina (g/L)	CV (%) Intraserial	CV (%) Interserial
0,1	2,02	2,29
0,5	1,53	8,39
1,0	1,12	4,81

Tabla 3.18: *Imprecisión intraserial e interserial del procedimiento de Doetsch. CV es el coeficiente de variación (n = 3).*

3.4.2. Medición de la concentración de proteína de una solución de albúmina

Previamente a la campaña de asignación de un valor de concentración de proteína a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada se realizó un ensayo preliminar en el que participaron los distintos laboratorios descritos en el apartado 2.8.2.

Los objetivos de este ensayo preliminar fueron la familiarización de los diferentes participantes con el procedimiento de medida, ya que la obtención de la creatina-quinasa 2 purificada era muy costosa y consecuentemente no se podían correr riesgos, y la constatación de que el método escogido cumplía con los requisitos deseados de imprecisión e inexactitud analítica.

Del mismo modo que en la campaña de asignación de un valor de concentración de proteína a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada, en el ensayo preliminar los participantes midieron por duplicado en tres días diferentes la concentración de proteína de dos soluciones de albúmina sérica bovina (solución problema y calibrador). A cada participante se le enviaron 3 viales de calibrador, 3 viales de solución problema y un total de 26 columnas de gel filtración. También se les proporcionó las instrucciones necesarias que describían el procedimiento de medida a seguir (apartado 2.8.3.), así como el formulario a rellenar con los datos obtenidos.

Al igual que el calibrador, la solución problema se preparó a partir de una dilución del material de referencia SRM 927b. En un matraz aforado (clase DIN A) de 250 mL, previamente tarado, se pesaron 1,0674 g del SRM 927b. Seguidamente el recipiente se enrasó cuidadosamente con una solución de azida de sodio 1 g/L. La concentración final tras la dilución fue de 0,3011 g/L.

El cálculo de la concentración de proteína se realizó tal y como se describe en el apartado 2.8.4. a partir de la media de las absorbancias del calibrador. En la Tabla 3.19. se muestran los valores de concentración obtenidos por cada laboratorio participante en los diferentes días, al igual que la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Laboratorio	Día 1	Día 2	Día 3	Media	DE	CV (%)
1	0,2979	0,2927	0,2978	0,2935	0,0063	2,16
	0,2923	0,2819	0,2987			
2	0,3943	0,3631	0,3929	0,3724	0,0267	7,16
	0,3801	0,3231	0,3812			
3	0,3096	0,2986	0,2860	0,2979	0,0092	3,10
	0,3102	0,2899	0,2936			
4	0,2978	0,2897	0,2973	0,2941	0,0040	1,34
	0,2978	0,2897	0,2925			
5	0,2764	0,3050	0,3201	0,3008	0,0164	5,46
	0,2882	0,3000	0,3151			

Tabla 3.19: Cálculo de la concentración de proteína (g/L) de la solución problema de albúmina obtenida por los distintos laboratorios. DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

En la Figura 3.15. se representan las medias y 2 veces la desviación estándar obtenidas por cada laboratorio, también se representa la distribución de las medias individuales respecto a la media de medias.

A partir de las medias de cada laboratorio se calculó la media de las medias, la inexactitud y la imprecisión. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.20.

Concentración (g/L)	Media (g/L)	Error (%)	DE	CV (%)
0,3011	0,3117	- 3,4	0,034	3,84

Tabla 3.20: Datos obtenidos a partir del análisis de las medias de la concentración de proteína (g/L) de la solución problema obtenidas por los distintos laboratorios. DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

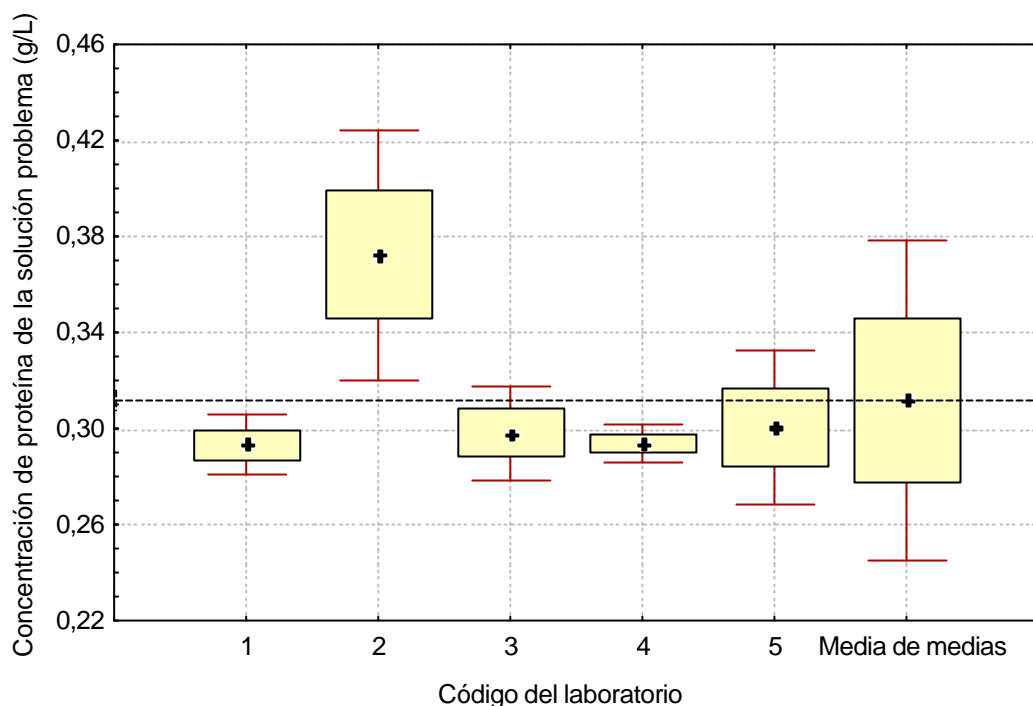


Figura 3.15: Representación de los valores medios de concentración de proteína (g/L) de la solución problema de albúmina obtenidos por cada laboratorio. Media (+), desviación estándar (□), 2 x desviación estándar (I), media de medias (_____)

3.4.3. Medición de la concentración de proteína de una solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada

En vista de los buenos resultados obtenidos en el ensayo preliminar, se procedió a realizar la asignación de un valor de concentración de proteína a la solución diluida de creatina-quinasa 2 purificada.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos por cada laboratorio participante para el calibrador y la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada, se calculó su concentración tal y como se describe en el apartado 2.8.4.

En la Tabla 3.21. se indican los valores de concentración individuales obtenidos por cada laboratorio, la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Mediante el test de Box-Whisker se encontró un valor aberrante para el laboratorio 3, aún así no se eliminó porque no existían razones experimentales.

Laboratorio	Día 1	Día 2	Día 3	Media	DE	CV (%)
1	0,1273 0,1302	0,1219 0,1325	0,1214 0,1238	0,1262	0,0046	3,63
2	0,1199 0,1202	0,1153 0,1173	0,1103 0,1224	0,1176	0,0043	3,69
3	0,1049 0,1341	0,1078 0,1129	0,1023 0,0995	0,1103	0,0126	11,39
4	0,1356 0,1347	0,1282 0,1265	0,1294 0,1294	0,1306	0,0037	2,80
5	0,1228 0,1216	0,1344 0,1479	0,1411 0,1547	0,1371	0,0134	9,74

Tabla 3.21: Concentración de proteína (g/L) de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada obtenida por los distintos laboratorios. En negrita se indica el valor aberrante (Box-Whisker). DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

En la Figura 3.16. se representan las medias y 2 veces la desviación estándar obtenidas por cada laboratorio, también se representa la distribución de las medias individuales respecto a la media de medias.

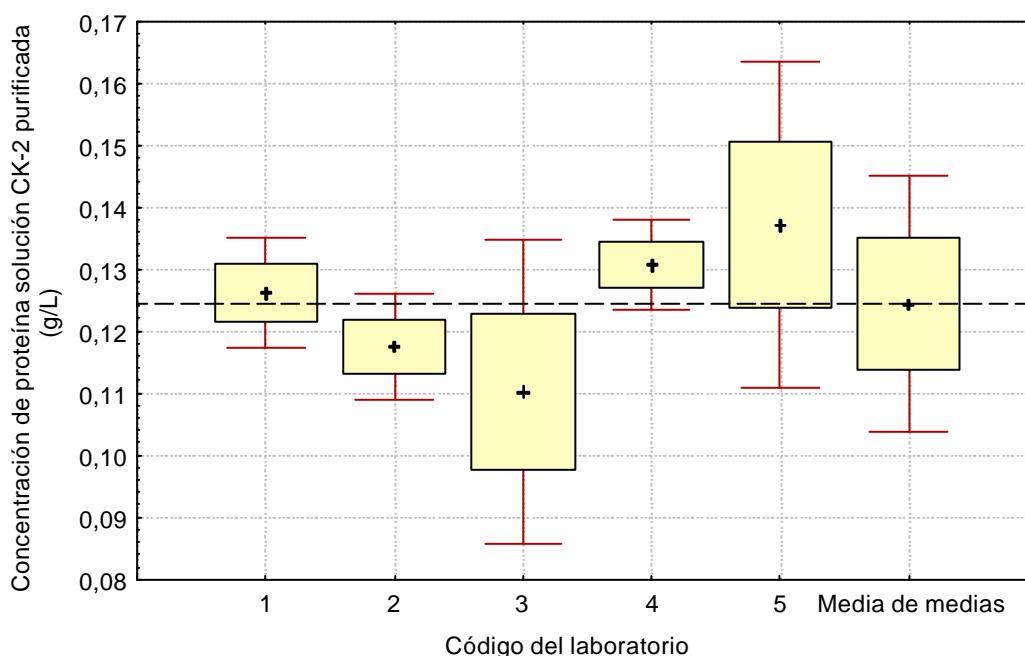


Figura 3.16: Representación de los valores medios de concentración de proteína (g/L) de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada obtenidos por cada laboratorio. Media (+), desviación estándar (I), 2 x desviación estándar (I), media de medias (- - -).

A partir de los valores de concentración se realizó una evaluación estadística, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.22. Puesto que había homogeneidad de varianzas y los datos de cada grupo se ajustaban a una distribución normal, se pudo realizar la prueba del análisis de la varianza (ANOVA), el resultado de la cual puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los distintos laboratorios (Tabla 3.23).

Número de grupos de resultados aceptados:	P:5
Número de replicados aceptados:	N:30
Homología de varianzas (test Cochran $\alpha = 0,05$):	homogéneas
Normalidad de la distribución de medias (K-S):	Normal
Valores de medias datos aberrantes (B-W):	Ninguna
Media de medias:	0,1243 g/L
DE de la distribución de medias:	0,0106 g/L
CV	8,52%
DE intralaboratorio:	0,0088 g/L
DE interlaboratorio:	0,0259 g/L
Intervalo de confianza del 95% de la media:	0,1243 \pm 0,0131 g/L

Tabla 3.22: Evaluación estadística de los valores de concentración de proteína de la solución de la creatina-quinasa 2 purificada obtenidos por cada laboratorio. B-W: Box-Whisker, K-S: Kolmogorov-smirnov

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F Snedecor	P-value
Entregrupos	$2,69 \cdot 10^{-3}$	4	$6,75 \cdot 10^{-4}$	8,66	0,0002
Intragrupos	$1,94 \cdot 10^{-3}$	25	$7,79 \cdot 10^{-5}$		
Total	$4,65 \cdot 10^{-3}$	29			

Tabla 3.23: Análisis de la varianza (ANOVA).

El test de Sheffe puso de manifiesto la existencia de dos grupos distintos que quedaba reducido a sólo uno si se eliminaban el laboratorio 3 o el 5 (Tabla 3.24.). Puesto que no habían razones experimentales que justificasen dicha eliminación, la asignación del valor de concentración de proteína a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada, se realizó teniendo en cuenta las medias de todos los laboratorios participantes. El valor de concentración de proteína asignado a dicha solución fue: 0,1243 g/L.

Laboratorio	Replicados	Media	Grupos homogéneos
3	6	0,1103	x
2	6	0,1176	x x
1	6	0,1262	x x
4	6	0,1306	x x
5	6	0,1371	x

Tabla 3.24: *Test de Sheffe para la determinación de grupos homogéneos de valores de concentración de proteína de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada ($\alpha = 0,001$).*

3.5. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MASA DEL MATERIAL DE REFERENCIA BCR 608

La medición de la concentración de masa del BCR 608 se realizó mediante los distintos inmunoanálisis que disponían los laboratorios participantes en la campaña de certificación. La concentración del material de referencia se calculó primero a partir de los calibradores proporcionados por los diferentes fabricantes, y después a partir de un patrón líquido con un valor de concentración de proteína asignado por el procedimiento de Doestch. El patrón líquido se preparó de la misma manera que el material de referencia.

Cada participante calibró el analizador correspondiente y verificó la calibración con los sueros control de concentración conocida de que disponía (Tabla 3.25.). Tras la comprobación de que la calibración había sido correcta se midió la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 del material de referencia y del patrón líquido por duplicado.

Una vez finalizada la campaña se analizaron todos los datos proporcionados por los diferentes laboratorios, y finalmente se asignó un valor de concentración de masa al material de referencia BCR 608.

3.5.1. Medición de la concentración de masa utilizando los calibradores proporcionados por el fabricante

La configuración de los distintos analizadores comerciales obligaba a realizar la calibración mediante los calibradores proporcionados por el mismo fabricante obteniéndose valores de concentración de masa. Estos valores fueron corregidos para cada laboratorio teniendo en cuenta el error volumétrico cometido durante la reconstitución del BCR 608. En la Tabla 3.26. se muestran los valores de concentración corregidos obtenidos por cada participante, la media, la desviación estándar asociada y el coeficiente de variación. Mediante el test de Box-Whisker se encontraron dos valores aberrantes respecto a su grupo de valores, y una media de concentraciones aberrante respecto al resto de medias. Los valores aberrantes no se eliminaron por que no habían razones experimentales que lo justificase.

En la Figura 3.17. se representan las medias obtenidas para cada laboratorio. También se describe la distribución de las medias individuales respecto a la media de medias.

Cód.	Código del control	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Rango ($\mu\text{g/L}$)	Concentración ($\mu\text{g/L}$)		
				Día 1	Día 2	Día 3
1	CK-MB controls (9C09-10)	-	3,5 – 6,5	5,7	5,2	5,8
		-	15,0 – 25,0	21,7	20,4	22,2
		-	90,0 – 150,0	134,9	121,4	143,8
2a	Precicontrol cardiac (2018209)	6,0	5,6 – 6,4	5,9	5,8	5,8
		53,0	47,7 – 58,4	51,1	52,2	52,1
2b	Biorad cardiac marker (685)	4,3	3,5 – 5,0	5,1	5,1	4,9
		16,0	13,8 – 18,1	14,5	14,8	14,5
		50,8	44,5 – 57,1	46,0	44,6	43,3
3	(B 5930-1/-2/-3)	4,0	2,1 – 5,9	3,8	2,5	4,0
		14,8	11,9 – 17,8	-	16,7	18,6
		42,6	34,1 – 51,2	50,6	43,6	48,0
4a	Opus CK-MB (OQHR 12/13)	-	3,5 – 7,2	5,2	4,9	5,8
		-	12,1 – 20,1	15,5	14,4	14,7
		-	28,1 – 46,9	38,4	36,1	35,0
4b	Precicontrol cardiac (2018209)	6,1	4,8 – 7,4	6,1	6,4	6,4
		54,5	43,6 – 65,4	54,9	57,6	55,8
5	Control Dade (B5275)	4,6	3,2 – 5,9	4,9	5,2	5,2
		18,0	14,4 – 21,5	19,0	19,6	19,9
		50,4	40,3 – 60,4	54,2	56,4	56,4
6	-	5,0	4,2 – 5,7	4,8	5,2	5,2
		20,0	17 – 23	19,2	19,8	20,8
		120,0	102 – 138	119,9	121,5	127,8
7	Precicontrol cardiac (2018209-122)	6,1	4,8 – 7,4	6,1	6,3	6,2
		54,5	43,6 – 65,4	54,7	54,9	55,4

Tabla 3.25: Datos sobre los sueros control utilizados por los distintos participantes para validar las respectivas calibraciones. En negrita se indican los valores obtenidos fuera de rango.

A partir de los valores de concentración de masa obtenidos por los distintos participantes se realizó una evaluación estadística cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.27. Puesto que los diferentes laboratorios presentaban homogeneidad de varianzas y los datos de cada grupo se ajustaban a una distribución normal, se pudo realizar una comparación de los diferentes grupos mediante el análisis de la varianza (ANOVA). El estudio puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos de datos (Tabla 3.28).

Código	Día 1	Día 2	Día 3	Media	DE	CV (%)
1	72,38	65,49	72,07	70,25	3,28	4,68
	72,78	66,60	72,18			
2a	53,22	51,37	51,51	51,65	1,62	3,14
	53,65	50,98	49,17			
2b	55,26	58,56	56,06	56,09	1,40	2,50
	54,76	56,76	55,16			
3	62,00	56,60	62,60	59,88	3,39	5,67
	61,50	54,60	62,00			
4a	84,95	83,95	84,65	84,62	1,70	2,01
	87,75	83,15	83,25			
4b	55,09	56,55	57,31	55,49	1,25	2,25
	54,73	55,38	53,88			
5	61,62	60,71	63,77	59,47	3,34	5,62
	58,18	58,35	54,16			
6	64,28	64,68	68,87	64,41	3,42	5,30
	58,87	62,98	66,78			
7	50,73	48,76	50,58	50,78	1,15	2,26
	50,98	51,51	52,15			

Tabla 3.26: Concentración de masa corregida (mg/L) del BCR 608 calculada mediante los calibradores proporcionados por el fabricante. En negrita se indican los valores aberrantes (Box-Whisker). DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

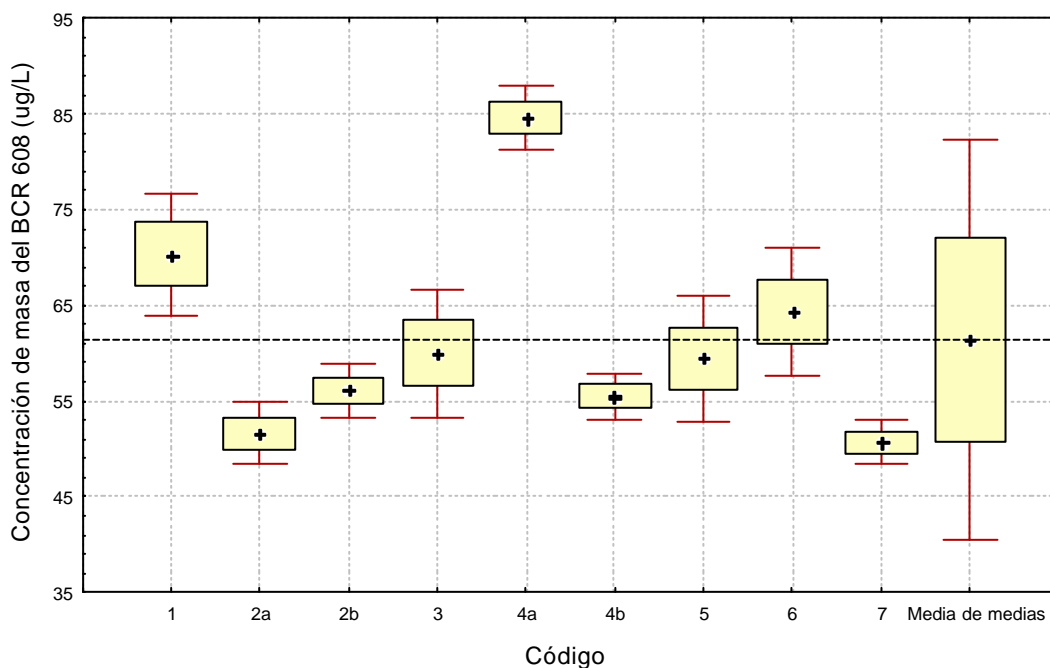


Figura 3.17: Representación de las medias de la concentración de masa corregida (mg/L) del BCR 608 calculada mediante los calibradores proporcionados por el fabricante. Media (+), desviación estándar (\square), 2 x desviación estándar (I), media de medias (_____).

Número de grupos de resultados aceptados:	P:9
Número de replicados aceptados:	N:54
Homología de varianzas (test Cochran $\alpha = 0,05$):	homogéneas
Normalidad de la distribución de medias (K-S):	Normal
Valores de medias datos aberrantes (B-W):	Una
Media de medias:	61,404 $\mu\text{g/L}$
DE de la distribución de medias:	10,627 $\mu\text{g/L}$
CV	17,31%
DE intralaboratorio:	26,026 $\mu\text{g/L}$
DE interlaboratorio:	2,483 $\mu\text{g/L}$
Intervalo de confianza del 95% de la media:	61,404 \pm 8,169 $\mu\text{g/L}$

Tabla 3.27: Evaluación estadística de la concentración de masa corregida ($\mu\text{g/L}$) del material de referencia BCR 608, calculada mediante los calibradores proporcionados por el fabricante. B-W: Box-Whisker, K-S: Kolmogorov-smirnov

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F Snedecor	P-value
Entregrupos	5418,99	8	677,373	109,90	< 0,001
Intragrupos	277,365	45	6,16367		
Total	5696,35	53			

Tabla 3.28: Análisis de la varianza (ANOVA).

El test de Sheffe mostraba la coexistencia de 6 grupos distintos de datos ($\alpha = 0,05$) (Tabla 3.29). El cálculo de la concentración de masa del BCR 608 se realizó teniendo en cuenta las medias de todos los laboratorios participantes. El valor de concentración de masa calculado fue: 61,2 $\mu\text{g/L}$.

Código	Replicados	Media	Grupos homogéneos	
7	6	50,78	x	
2a	6	51,65	x	
4b	6	55,49	x	x
2b	6	56,09	x	x
5	6	59,47		x x
3	6	59,88		x x
6	6	64,41		x x
1	6	70,25		x
4a	6	84,62		x

Tabla 3.29: Test de Sheffe para la determinación de grupos homogéneos de valores concentración de masa corregida ($\mu\text{g/L}$) del BCR 608 ($\alpha = 0,001$).

3.5.2. Medición de la concentración de masa mediante el patrón líquido

Al igual que en el material de referencia la concentración de masa fue medida en el patrón líquido. El patrón líquido se preparó a partir de una solución pura de creatina-quinasa 2 a la que previamente se le había asignado un valor de concentración de proteína mediante el procedimiento de Doestch (apartado 3.6). El cálculo de la concentración de masa del BCR 608 usando el patrón líquido como calibrador, se realizó con el objetivo de asignar un valor concentración de masa al material de referencia trazable al material de referencia internacional SRM 927 b.

En la Tabla 3.30. se muestran los valores de concentración de masa obtenidos por cada participante para el patrón líquido.

Código	Día 1	Día 2	Día 3	Media	DE	CV (%)
1	67,90	59,50	63,40	62,95	3,04	4,83
	63,20	60,00	63,90			
2a	43,39	44,80	41,08	43,24	1,78	4,12
	44,96	44,18	41,02			
2b	43,70	43,10	43,80	43,23	1,26	2,92
	42,10	45,10	41,60			
3	54,30	51,20	52,40	52,98	4,05	7,65
	57,20	46,20	56,60			
4a	69,00	68,90	71,80	69,61	3,58	5,15
	69,20	64,00	74,80			
4b	46,50	47,99	48,76	47,87	1,06	2,21
	46,87	49,26	47,86			
5	57,18	57,25	57,60	57,71	0,93	1,62
	58,98	58,68	56,57			
6	58,20	51,20	66,70	60,92	3,89	6,36
	56,20	59,20	64,00			
7	39,46	37,22	39,41	37,59	1,55	4,13
	36,08	35,81	37,68			

Tabla 3.30: Concentración de masa ($\mu\text{g/L}$) del patrón líquido. DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

A partir de la media del patrón líquido calculada para los diferentes días, y teniendo en cuenta el error volumétrico cometido en la reconstitución del BCR 608, se calculó la concentración de masa del material de referencia tal y como se describe en el apartado 2.9.4. En la Tabla 3.31. se muestran los valores de concentración obtenidos para cada participante, la media, la desviación estándar asociada y el

coeficiente de variación. Mediante el test de Box-Whisker se encontró un valor aberrante que no se eliminó ya que no habían razones experimentales para ello.

Código	Día 1	Día 2	Día 3	Media	DE	CV (%)
1	88,73	88,09	91,00	89,62	1,22	1,36
	89,22	89,57	91,13			
2a	96,80	92,78	100,83	96,06	3,24	3,37
	97,60	92,07	96,27			
2b	103,52	106,71	105,51	104,26	1,54	1,47
	102,58	103,43	103,81			
3	89,42	93,45	92,36	90,93	1,82	2,00
	88,70	90,15	91,48			
4a	98,85	101,59	92,86	97,89	4,65	4,75
	102,11	100,62	91,33			
4b	94,88	93,34	95,21	93,11	2,22	2,39
	94,26	91,41	89,52			
5	85,27	84,16	89,78	85,16	4,22	4,95
	80,50	80,90	90,33			
6	90,30	86,33	84,69	85,04	2,98	3,50
	82,72	84,07	82,11			
7	108,09	107,31	105,44	108,59	2,63	2,42
	108,62	113,36	108,72			

Tabla 3.31: Concentración de masa (mg/L) del BCR 608 calculada mediante el patrón líquido, y teniendo en cuenta el error volumétrico. En **negrita** se indica el valor aberrante (Box-Whisker). DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

En la Figura 3.18. se representan las medias obtenidos para cada laboratorio. También se describe la distribución de las medias individuales respecto a la media de medias.

En la Tabla 3.32. se muestran los resultados de la evaluación estadística de las concentraciones de masa calculadas mediante el patrón líquido. Puesto que los diferentes laboratorios presentaban homogeneidad de varianzas, y los datos de cada participante se ajustaban a una distribución normal, se pudo realizar una comparación de los diferentes grupos mediante el análisis de la varianza (ANOVA). El estudio puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los distintos laboratorios (Tabla 3.33.).

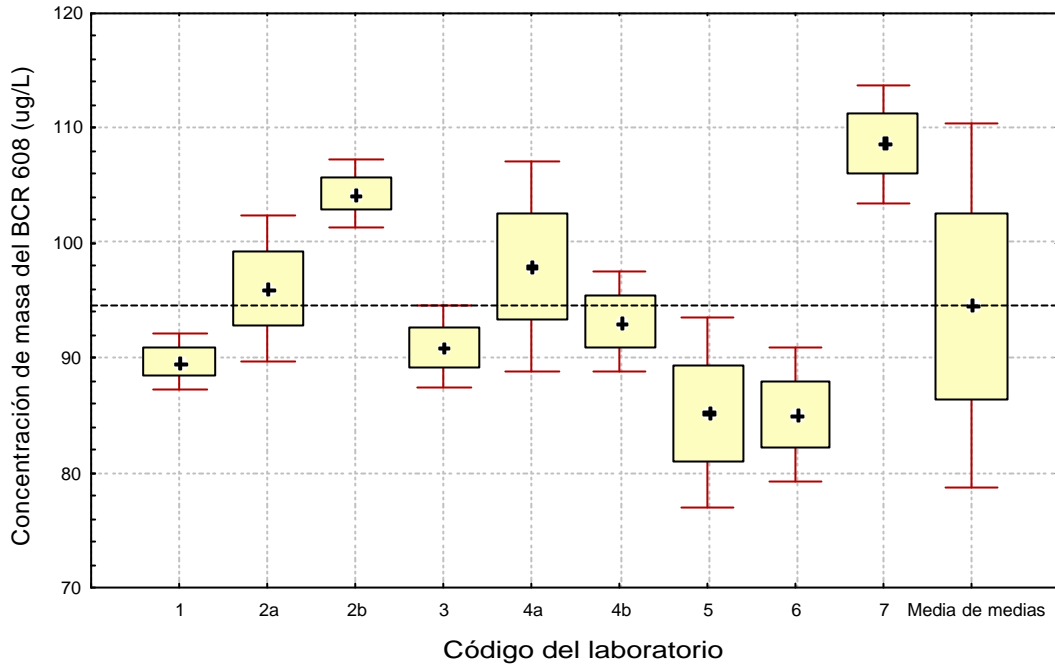


Figura 3.18: Representación de las medias de la Concentración de masa ($\mu\text{g/L}$) del BCR 608 calculada mediante el patrón líquido, y teniendo en cuenta el error volumétrico. Media (+), desviación estándar (\square), $2 \times$ desviación estándar (I), media de medias (_____).

Número de grupos de resultados aceptados:	P:9
Número de replicados aceptados:	N:54
Homología de varianzas (test Cochran $\alpha = 0,05$):	homogéneas
Normalidad de la distribución de medias (K-S):	Normal
Valores de medias datos aberrantes (B-W):	Ninguna
Media de medias:	94,518 $\mu\text{g/L}$
D.E de la distribución de medias:	8,085 $\mu\text{g/L}$
CV	8,55%
D.E interlaboratorio:	19,807 $\mu\text{g/L}$
D.E intralaboratorio:	2,940 $\mu\text{g/L}$
Intervalo de confianza del 95% de la media:	94,518 \pm 6,215 $\mu\text{g/L}$

Tabla 3.32: Evaluación estadística de la concentración de masa ($\mu\text{g/L}$) del material de referencia BCR 608, calculada mediante el patrón líquido, y teniendo en cuenta el error volumétrico.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F Snedecor	P-value
Entregrupos	3138,48	8	392,51	45,38	< 0,001
Intragrupos	389,056	45	8,64569		
Total	3527,54	53			

Tabla 3.33: Análisis de la varianza (ANOVA).

El test de Sheffe mostraba la coexistencia de cinco grupos distintos de datos ($\alpha = 0,05$) (Tabla 3.34.). La concentración de masa del BCR 608 se cálculo a partir de la media de las medias, en vez de a partir de la media de todos los valores individuales, debido a la elevada variabilidad entre laboratorios. El valor de concentración de masa calculado fue: 94,518 $\mu\text{g/L}$.

Código	Replicados	Media	Grupos homogéneos		
6	6	85,04	x		
5	6	85,16	x		
1	6	89,62	x	x	
3	6	90,93	x	x	x
4b	6	93,10		x	x
2a	6	96,06		x	x
4a	6	97,89		x	x
2b	6	104,26			x x
7	6	108,59			x

Tabla 3.34: Test de Sheffe para la determinación de grupos homogéneos de valores concentración de masa (mg/L) del material de referencia BCR 608, calculada mediante el patrón líquido, y teniendo en cuenta el error volumétrico ($\alpha = 0,001$).

3.6. ASIGNACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE AL VALOR DE CONCENTRACIÓN DE MASA DEL MATERIAL DE REFERENCIA BCR 608

El valor de concentración de masa asignado al material de referencia BCR 608 era trazable al material de referencia SRM 927b (Figura 3.19). Para el cálculo de su incertidumbre se tuvieron en cuenta todos aquellos componentes de los diferentes pasos descritos en el apartado 2.9.5 que contribuían de una manera significativa. El cálculo se realizó siguiendo el procedimiento descrito por la Eurachem/Citac Guide.

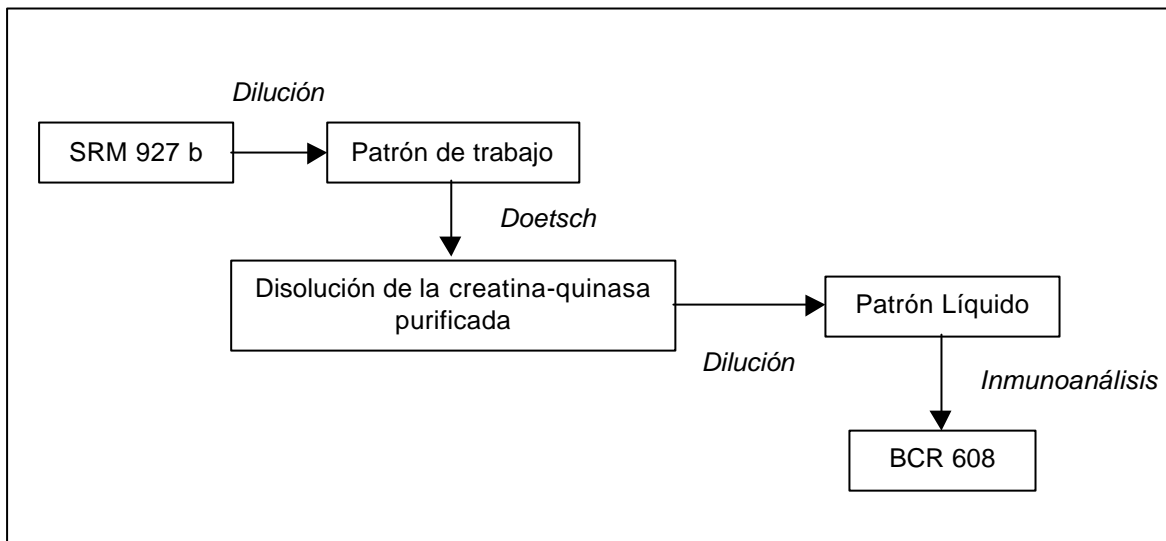


Figura 3.19: Trazabilidad del material de referencia BCR 608 de la creatina-quinasa 2 al SRM 927 b.

3.6.1. Dilución del SRM 927b

Para el cálculo de la incertidumbre asociada a la dilución del material de referencia SRM 927b se tuvieron en cuenta las incertidumbres estándares relativas detalladas en la Tabla 3.35. Tanto la incertidumbre de la concentración de proteína del SRM927b, como su densidad, fueron proporcionadas por el NIST con un nivel de confianza del 95%, de manera que el cálculo de la incertidumbre se realizó dividiendo el valor proporcionado por 1,96.

Componente	Valor	Incertidumbre	Incertidumbre estándar relativa
Concentración de proteína del SRM 927b	72,01 g/L	0,17 g/L	$2,36 \times 10^{-3}$
Densidad del SRM 927b	1,021 g/mL	0,0036 g/mL	$3,53 \times 10^{-3}$
Volumen del matraz	250 mL	0,15 mL	$6,0 \times 10^{-4}$
Masa pesada	/	/	$1,9 \times 10^{-4}$

Tabla 3.35: Datos sobre la incertidumbre de la dilución del SRM 927b.

El cálculo de la concentración de proteína del SRM 927b diluido se midió teniendo en cuenta su densidad, la cantidad añadida al matraz donde se realizó su dilución, el volumen del matraz y su concentración nominal:

$$v = \frac{m}{d} = \frac{1,770}{1,021} = 1,734 \text{ mL}$$

$$c = v \times \frac{c_{\text{SRM927b}}}{V_{\text{Matraz}}} = 1,734 \times \frac{72,01}{250} = 0,4995 \text{ g/L}$$

Donde m es la cantidad (g) de SRM 927b dispensada en el matraz aforado, d es la densidad (g/mL) del SRM 927b, v es el volumen (mL) de proteína añadido al matraz aforado, $c_{\text{SRM 927b}}$ es la concentración nominal (g/L) del SRM 927b, V_{Matraz} es el volumen (mL) del matraz utilizado en la dilución y c es la concentración (g/L) del SRM 927b diluido.

En el cálculo de la incertidumbre estándar no se tuvo en cuenta la incertidumbre estándar relativa asociada a la masa pesada ni al volumen del matraz aforado, ya que no contribuían de una manera significativa.

$$U = \sqrt{(2,36 \times 10^{-3})^2 + (3,53 \times 10^{-3})^2} = 4,25 \times 10^{-3}$$

$$u = 4,25 \times 10^{-3} \times 0,4995 \text{ g/L} = 0,0021 \text{ g/L}$$

Donde U es la incertidumbre estándar relativa, 0,4995 g/L es la concentración del SRM 927b una vez diluido y u es la incertidumbre estándar.

3.6.2. Asignación de un valor de concentración de proteína a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada

Para el cálculo de la incertidumbre asociada a este paso se tuvieron en cuenta las incertidumbres estándares relativas detalladas en la Tabla 3.36. La incertidumbre asociada a la concentración de proteína asignada por el procedimiento de Doetsch fue proporcionada con un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, en el cálculo de la concentración de proteína contribuyeron únicamente 5 valores, lo que equivale a 4 grados de libertad ($n = 5$; 4 grados de libertad), de manera que el cálculo de la

incertidumbre se realizó dividiendo este valor por 2,8. Este factor era equivalente a dos veces la distribución de Student *t* que se utilizó en el cálculo de la incertidumbre.

Componente	Valor	Incertidumbre	Incertidumbre estándar relativa
Concentración del SRM 927b diluido	0,4995 g/L	0,0021 g/L	$4,25 \times 10^{-3}$
Valor asignado por el procedimiento de Doetsch	124,3 mg/L	4,70 mg/L	0,0378

Tabla 3.36: Datos sobre la incertidumbre de la asignación de un valor de concentración de proteína a la solución de la creatina-quinasa 2 purificada.

En el cálculo de la incertidumbre estándar se tuvieron en cuenta los dos componentes detallados en la Tabla 3.33:

$$U = \sqrt{(4,20 \times 10^{-3})^2 + (0,0378)^2} = 0,038$$

$$u = 0,038 \times 124,3 \text{ mg/L} = 4,72 \text{ mg/L}$$

Donde *U* es la incertidumbre estándar relativa, 124,3 mg/L es la concentración de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada asignada por el procedimiento de Doetsch y *u* es la incertidumbre estándar.

3.6.3. Preparación del patrón líquido

Para el cálculo de la incertidumbre asociada a la preparación del patrón líquido se tuvieron en cuenta las incertidumbres estándares relativas detalladas en la Tabla 3.37.

Componente	Valor	Incertidumbre	Incertidumbre estándar relativa
Concentración de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada	124,3 mg/L	4,72 mg/L	0,038
Volumen de la pipeta	0,0646 mL	0,00017 mL	$2,63 \times 10^{-3}$
Volumen del matraz	100 mL	0,1296 mL	$1,29 \times 10^{-3}$

Tabla 3.37: Datos sobre la incertidumbre de la preparación del patrón líquido.

El cálculo de la concentración de este material una vez diluido se realizó teniendo en cuenta la concentración de proteína asignada por el procedimiento de Doetsch a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada, y el volumen calibrado de la pipeta y del matraz aforado utilizados para su dilución:

$$c_{CK-2} = c_{Proteína} \times \frac{V_{Pipeta}}{V_{Matraz}} = 124,3 \times \frac{0,0646}{99,92} = 80,362 \mu\text{g/L}$$

Donde $c_{Proteína}$ es la concentración de proteína ($\mu\text{g/L}$) asignada por el procedimiento de Doetsch a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada, v_{Pipeta} es el volumen (mL) dispensado de este material al matraz aforado y v_{Matraz} es el volumen (mL) del matraz utilizado en la dilución.

En el cálculo de la incertidumbre estándar se tuvieron en cuenta los tres componentes detallados en la Tabla 3.37:

$$U = \sqrt{(0,038)^2 + (2,63 \times 10^{-3})^2 + (1,296 \times 10^{-3})^2} = 0,038$$

$$u = 0,038 \times 80,362 \mu\text{g/L} = 3,054 \mu\text{g/L}$$

Donde U es la incertidumbre estándar relativa, $80,362 \mu\text{g/L}$ es la concentración de proteína del patrón líquido y u es la incertidumbre estándar.

3.6.4. Asignación de un valor de concentración de masa al BCR 608

Para el cálculo de la incertidumbre asociada a la asignación de un valor de concentración de masa al BCR 608 se tuvieron en cuenta las incertidumbres estándares relativas detalladas en la Tabla 3.38. La incertidumbre asociada a la concentración de masa asignada por los distintos inmunoanálisis fue proporcionada con un nivel de confianza del 95%, de manera que el cálculo de la incertidumbre se realizó dividiendo este valor por 1,96.

Componente	Valor	Incertidumbre	Incertidumbre estándar relativa
Concentración del patrón líquido	80,362 µg/L	3,054 µg/L	0,038
Valor asignado en la campaña de certificación	95,518 µg/L	3,171 µg/L	0,033

Tabla 3.38: Datos sobre la incertidumbre de la asignación de un valor de concentración de masa al BCR 608.

En el cálculo de la incertidumbre estándar se tuvieron en cuenta los dos componentes detallados en la Tabla 3.38:

$$U = \sqrt{(0,038)^2 + (0,033)^2} = 0,051$$

$$u = 0,051 \times 94,518 \text{ µg/L} = 4,82 \text{ µg/L}$$

Donde U es la incertidumbre estándar relativa, 94,518 µg/L es la concentración masa certificada del BCR 608 y u es la incertidumbre estándar.

En la Figura 3.20., se muestra un gráfico en el que se puede observar la contribución de los distintos pasos a la incertidumbre del valor certificado.

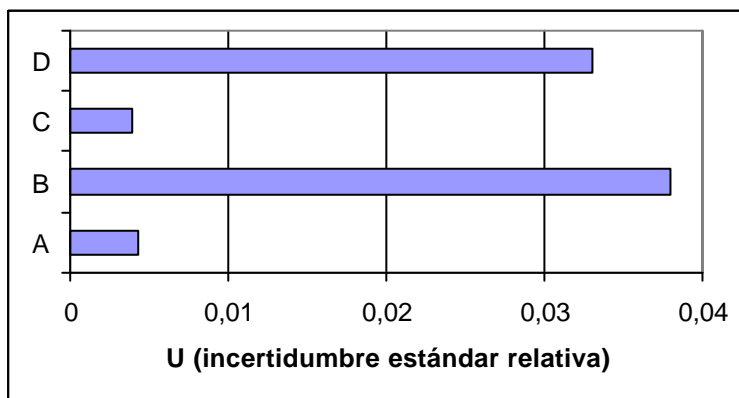


Figura 3.20: Incertidumbre estándar relativa de los distintos pasos que contribuyen a la incertidumbre de la concentración de masa certificada de la creatina-quinasa 2 del BCR 608. A: dilución del SRM 927b, B: Valor asignado por el procedimiento de Doetsch, C: Dilución de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada (Patrón líquido), D: Valor asignado en la campaña de certificación.

3.7. VALOR CERTIFICADO DEL MATERIAL DE REFERENCIA

El valor de concentración de masa certificado de la creatina-quinasa 2 del material de referencia BCR 608 reconstituido tal y como se describe en el apartado 2.9.3.4., calculado mediante el patrón líquido de idéntica composición a este y medido mediante distintos inmunoanálisis comerciales y distintos laboratorios, es el que se indica a continuación junto a su incertidumbre expandida. La incertidumbre expandida se obtuvo a partir de la incertidumbre estándar multiplicada por un factor $k = 2$:

$$\text{BCR 608} = 94,5 \pm 9,6 \mu\text{g/L}$$

DISCUSIÓN

4.1 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA CREATINA-QUINASA 2

La creatina-quinasa 2 utilizada en la preparación del patrón líquido, se purificó a partir de músculo cardíaco humano, ya que principalmente se encuentra en este tejido. La purificación se realizó siguiendo el mismo procedimiento que había sido descrito para la obtención de la creatina-quinasa 2 para la preparación del material de referencia BCR 608 (Gella y cols., 1998). En primer lugar, tras la homogenización del tejido y precipitación con etanol, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico, eliminándose la mayoría de proteínas contaminantes junto con la isoenzima 3 de la creatina-quinasa (isoenzima mayoritaria en el músculo cardíaco). A continuación se realizaron dos cromatografías de afinidad, de esta manera se consiguió separar la albúmina, principal contaminante, debido a que la similitud de su punto isoeléctrico con el de la creatina-quinasa 2 no permitía la separación de ambas proteínas mediante la cromatografía de intercambio iónico.

A partir de 193 g de tejido miocárdico humano se obtuvieron 8 mg de enzima purificada con una actividad específica de 10 $\mu\text{kat}/\text{mg}$ y una concentración catalítica de 14.033 $\mu\text{kat}/\text{L}$. El rendimiento calculado a partir de la concentración catalítica de la creatina-quinasa 2 fue de un 7,2 %, con un factor de purificación de 55 veces. Aunque el rendimiento fue superior al que había sido descrito para la obtención de la isoenzima 2 que se utilizó para la preparación del material de referencia (1,2%), la actividad específica fue inferior (16,7 $\mu\text{kat}/\text{mg}$) (Gella y cols., 1998).

Una vez obtenida la creatina-quinasa 2 purificada se procedió a su caracterización con el objetivo de determinar tanto el grado de pureza de la solución, como las características moleculares de la misma.

La comprobación del grado de pureza de la isoenzima purificada se realizó mediante procedimientos electroforéticos, y mediante la medición de la concentración catalítica de algunas enzimas que se encuentran en el músculo cardíaco y que podían hallarse como contaminantes en la solución purificada. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes y tinción de Coomassie, y en condiciones no desnaturalizantes y revelado por actividad (Figuras 3.3., 3.4., y 3.5.) confirmaron la pureza de la muestra, descartándose la contaminación por albúmina y por la isoenzima 3. En cuanto a la presencia de enzimas contaminantes, o no se detectó concentración catalítica, o esta era inferior al 1% (Tabla 3.4.), como en el caso de la L-lactato-deshidrogenasa, enzima que se encuentra en grandes cantidades en el citoplasma de las células. Aún así, se consideró que la solución contenía únicamente creatina-quinasa 2 con un grado de pureza superior al 99%.

Respecto a la caracterización molecular de la enzima, la electroforesis en condiciones desnaturizantes y tinción de Coomassie (Figura 3.3.), puso de manifiesto la presencia de dos bandas con distinta masa molar, 40.800 y 44.500 g/mol. Estos valores son muy similares a los descritos en 1983 por Perryman y cols., 43.000 y 44.500 g/mol, para las subunidades M y B respectivamente.

La determinación del punto isoeléctrico aportó un valor de 5,56 para la creatina-quinasa 2 (Figura 3.9.). Este valor coincidió con los descritos por diversos autores para la isoforma tisular de dicha enzima: 5,61 (Chapelle y Heusghem, 1980), 5,50 (Eldin y cols., 1986) y 5,80 (Gella y cols., 1998).

El estudio de las características antigénicas de la creatina-quinasa 2 purificada realizado mediante transferencia e identificación con anticuerpos específicos contra la subunidad B, la subunidad M y la isoenzima 2, confirmó la integridad antigénica de dicha isoenzima, puesto que en todos los casos se encontró una interacción antígeno-anticuerpo adecuada (Figuras 3.6., 3.7. y 3.8.).

La obtención de las tres isoenzimas de la creatina-quinasa a partir de la isoenzima 2 purificada, visualizadas mediante electroforesis en condiciones no desnaturizantes y revelado por Coomassie y por actividad (Figuras 3.9. y 3.10.), y caracterizadas antigénicamente mediante anticuerpos específicos contra la subunidad M y la subunidad B (Figuras 3.11. y 3.12.), confirmó que la isoenzima purificada estaba formada por la combinación de las subunidad M y B.

Una vez caracterizada y demostrada la pureza y reactividad antigénica de la creatina-quinasa 2, se consideró que la isoenzima podía ser utilizada como patrón en los inmunoanálisis de la campaña de certificación de un valor de concentración de masa al material de referencia BCR 608.

4.2. COMPARACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE MASA DE LA CREATINA-QUINASA 2 Y ESTUDIOS DE CONMUTABILIDAD

Se realizó un estudio comparativo de cinco procedimientos de medida de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2, con el objetivo de estudiar (1) las diferencias existentes entre ellos, (2) el efecto matriz y (3) la conmutabilidad del material de referencia BCR 608.

4.2.1. Comparación de inmunoanálisis

La falta de normalización y armonización de resultados en la medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 mediante distintos inmunoanálisis, ha sido descrita por diversos autores (Vaidja y cols., 1993, Green y cols., 1994, Gadsden y cols., 1994). La variabilidad de los resultados obtenidos mediante distintos inmunoanálisis puede ser causada por diversos factores: la heterogeneidad del componente objeto de la medida, el procesamiento y la recolección de los especímenes, el tipo de espécimen, la matriz en la que se encuentra el componente, el diluyente de la muestra, las características de los anticuerpos utilizados (estabilidad, especificidad, procedencia), el marcaje y el método de detección de la señal, los calibradores y controles, la función de calibración, y por último, el procedimiento de calibración (Price, 1998).

El presente trabajo ha constatado, que si bien los distintos procedimientos comparados correlacionaban bien (coeficientes de correlación comprendidos entre 0,91 y 0,96), existían diferencias significativas entre ellos, como reflejaban las pendientes y las ordenadas en el origen de las rectas de regresión obtenidas mediante la comparación por el procedimiento de Passing y Bablok (Tabla 3.5.). Sólo el intervalo de confianza del 95% de las pendientes obtenidas tras la comparación de ACS:180/Stratus y ACS:180/IMx comprendía el valor 1, por lo tanto entre el resto de los inmunoanálisis comparados existían diferencias de tipo proporcional. El intervalo de confianza del 95% de la ordenada en el origen para todas las comparaciones contenía el valor cero, excepto cuando Elecsys era uno de los inmunoanálisis comparados, indicando la existencia de diferencias constantes entre este inmunoanálisis y el resto. Con el inmunoanálisis Elecsys se obtenían valores de concentración superiores a los obtenidos con el resto de procedimientos, en cambio con Stratus se obtenían concentraciones inferiores. La infravaloración de los valores de concentración de masa obtenidos por Stratus ya había sido descrita por otros autores (McBride y cols., 1991).

Cabe destacar que las diferencias existentes entre los distintos inmunoanálisis comparados no se reflejan en los valores discriminantes proporcionadas por los distintos fabricantes (Tabla 4.1.), puesto que Elecsys, IMx y ACS:180 dan valores idénticos (5,0 µg/L), a pesar de que los valores obtenidos con Elecsys son 1,20 y 1,26 veces superiores, respectivamente.

	Valor discriminante (µg/L)	Intervalo analítico (µg/L)
Stratus®	4,7	0,40-125
ACS:180®	5,0	0,80-300
Elecsys®	5,0	0,15-500
IMx®	5,0	0,70-300
Immulite®	5,9	0,42-500

Tabla 4.1: Características de los inmunoanálisis comparados.

La falta de normalización de los resultados obtenidos con los distintos inmunoanálisis comparados, se podría corregir sustancialmente mediante el uso de patrones trazables a un mismo material de referencia, lo que permitiría la intercambiabilidad de resultados y un único valor discriminante válido para los distintos procedimientos de medida.

4.2.2. Estudio de conmutabilidad: efecto de la matriz

Una de las causas más importantes de variabilidad entre los distintos inmunoanálisis comerciales es el efecto de la matriz. Se entiende por matriz el conjunto de todos los componentes de la muestra (o material) excepto el analito. En el presente trabajo se ha realizado un estudio del efecto de distintas matrices de origen humano (suero y plasma) y una matriz sintética con la misma composición a la utilizada en la preparación del BCR 608.

La mayoría de las matrices estudiadas no eran conmutables con los especímenes plasmáticos utilizados en el estudio comparativo de los distintos inmunoanálisis (Tabla 3.7.), es decir, la creatina-quinasa 2 purificada diluida en la matriz plasmática, sérica o sintética no mostraba el mismo comportamiento interprocedimiento que las muestras humanas. La matriz sintética sólo era conmutable en una de las diez comparaciones (ACS:180/IMx). Esta falta de conmutabilidad

probablemente era consecuencia de diferencias en cuanto a la composición de esta matriz sintética y la matriz de origen humano.

La dialisis de las matrices aumentó la conmutabilidad de la creatina-quinasa 2, principalmente en la matriz plasmática, que pasó a ser conmutable en todas aquellas comparaciones en las que no intervenía Stratus (6 de 10). El efecto producido por la dialisis parecía indicar la presencia de componentes de baja masa molar en el suero y en el plasma que podrían interferir en la interacción antígeno-anticuerpo. De hecho, los valores de concentración de masa obtenidos en las matrices dializadas eran superiores a los obtenidos en las mismas matrices sin dializar.

Las diferencias entre las matrices dializadas y sin dializar se estudiaron más exhaustivamente mediante la comparación entre la matriz sérica o plasmática dializada y sin dializar. Al eliminar las sustancias dializables del suero se incrementaba el valor de la concentración de la isoenzima 2, en diferente grado, para cada uno de los inmunoanálisis (Tabla 3.12.). Esto parecía indicar que la dialisis eliminaba sustancias séricas interferentes que afectaban de forma negativa a la medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 en los especímenes séricos. En cambio, los resultados de la comparación entre la matriz plasmática dializada y sin dializar (Tabla 3.13.), mostraban que la interferencia de las sustancias dializables del plasma dependía del inmunoanálisis utilizado, ya que podían interferir de forma negativa, como en el caso de Stratus y ACS 180, o no interferir como sucedía con Elecsys, IMx e Immulite.

Estas diferencias entre las matrices dializadas y sin dializar, ya habían sido observadas en un estudio realizado por Frey en 1996, que comprendía tres de los inmunoanálisis citados (Stratus, IMx y ACS:180), y una matriz sérica, dializada y sin dializar, a la que se le había añadido la creatina-quinasa 2 purificada.

La comparación entre la matriz sérica y plasmática confirmó el diferente comportamiento de la creatina-quinasa 2 frente a los diferentes inmunoanálisis (Tabla 3.15.). Los valores de concentración de masa obtenidos eran más elevados cuando la medición de la isoenzima se realizaba en la matriz plasmática. Al dializar las matrices (Tabla 3.16), las diferencias únicamente se mantenían en Stratus y en ACS:180, debido a que la eliminación de las sustancias dializables, en cada una de las matrices, provocaba un aumento de la concentración en la misma proporción. Cuando la medición se realizaba en Elecsys, IMx e Immulite, los valores de concentración obtenidos eran los mismos independientemente de la matriz dializada, ya que, como se había observado anteriormente, las sustancias dializables del suero afectaban

negativamente a la medición, mientras que las plasmáticas no afectaban. De manera que, la medición de la creatina-quinasa 2 con cualquiera de estos tres inmunoanálisis, era independiente de la matriz utilizada (sérica o plasmática), siempre y cuando se dializase previamente.

Cabe destacar, que las matrices utilizadas en este estudio, presentaban características equivalentes a los diluyentes de muestra proporcionados por los distintos fabricantes (Tabla 4.2.).

A pesar de las diferencias observadas en cuanto a la medición de la creatina-quinasa 2 en función del tipo de matriz, la mayoría de los fabricantes no lo especifican en sus prospectos. Si bien recomiendan un tipo de espécimen, en la mayoría de los casos no hacen distinción entre realizar la medición en un espécimen sérico o plasmático (Tabla 4.2.). Únicamente en el prospecto del ACS:180[®] se indica que las mediciones en un espécimen plasmático con heparina de sodio pueden llegar a proporcionar resultados un 20% superiores a las realizadas en un espécimen sérico.

	Diluyente	Tipo de espécimen
Stratus [®]	Suero humano	Suero
ACS:180 [®]	Suero equino	Suero o plasma con heparina de sodio
Elecsys [®]	Matriz proteica	Suero o plasma con heparina de sodio
IMx [®]	Suero bovino	Suero, plasma con heparina de sodio o EDTA-sales de tripotasio
Immulite [®]	Matriz proteica	Suero o plasma con heparina de sodio

Tabla 4.2: Diluyentes y especímenes recomendados por los fabricantes de los inmunoanálisis .

4.2.3. Conmutabilidad del material de referencia BCR 608

Uno de los requisitos fundamentales que han de cumplir los materiales de referencia para garantizar la normalización de resultados, es la conmutabilidad con las muestras humanas. Únicamente, si el componente objeto de la medida se encuentra en la matriz adecuada (similar a la de las muestras humanas), podrá comportarse de manera similar a como lo hace en los especímenes humanos. Esta conmutabilidad es muy difícil de conseguir cuando los procedimientos de medida que van a ser utilizados

para medir los analitos son los inmunoanálisis, puesto que los procedimientos de medida son muy diferentes entre sí.

El material de referencia de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa (BCR 608) tiene un valor certificado de concentración catalítica de $1,12 \pm 0,03 \mu\text{kat/L}$, y cumple los criterios requeridos en cuanto a composición, homogeneidad y estabilidad (Gella y cols., 1998). En vista de la necesidad de la homogenización de resultados de concentración de masa de la creatina-quinasa 2, se realizó un estudio de la conmutabilidad del BCR 608 con los cinco procedimientos de medida descritos en el apartado 2.4.

El estudio de la conmutabilidad del BCR 608 con los diferentes inmunoanálisis demostró que no era conmutable, ya que la isoenzima 2 del material no se comportaba de forma equivalente a los especímenes humanos. La no conmutabilidad del material de referencia parecía indicar la presencia de algún componente de la matriz que afectaba al procedimiento de medida de manera distinta a como afectaban los componentes de la matriz plasmática.

Los valores de concentración que se obtuvieron para el material de referencia con cada uno de los inmunoanálisis fueron muy similares, excepto con Stratus, que a diferencia de los especímenes humanos, el valor de concentración fue superior (1,5 veces), lo que indicaría la presencia de algún interferente en la matriz que afectaría de manera positiva dando lugar a valores de concentración superiores a los esperados.

La liofilización puede afectar a las características antigénicas de una proteína (Büttner, 1991), de manera que no existiese conmutabilidad para un mismo material antes y después de su liofilización. Por lo tanto, era necesario el estudio de la conmutabilidad entre la creatina-quinasa 2 del BCR 608 y la creatina-quinasa 2 purificada diluida en la matriz sintética, puesto que esta última sería utilizada como patrón en la campaña de certificación de un valor de concentración de masa del BCR 608.

La creatina-quinasa 2 en la matriz sintética, al igual que en el material de referencia, no era conmutable con los especímenes humanos. La relación existente entre los cinco inmunoanálisis mostraba un comportamiento muy similar de la isoenzima en las dos matrices. A excepción de la relación entre Elecsys e Immulite, las demás relaciones eran muy parecidas. Por lo tanto, la creatina-quinasa 2 presente, tanto en el material de referencia liofilizado, como en la matriz sintética sin liofilizar, se comportaba de la misma manera con los distintos procedimientos de medida.

4.3. CERTIFICACIÓN DE UN VALOR DE CONCENTRACIÓN DE MASA AL MATERIAL DE REFERENCIA BCR 608

El material de referencia BCR 608 objeto de la asignación de un valor de concentración de masa de la creatina-quinasa 2, es un liofilizado que contiene una concentración catalítica certificada de $1,12 \pm 0,03 \mu\text{kat/L}$ de creatina-quinasa 2 en una matriz compuesta por: PIPES 25 mmol/L, ADP 2 mmol/L, 2-mercaptoatanol 5 mmol/L, NaCl 154 mmol/L, albúmina humana 50 g/L, pH 7,2. (Gella y cols., 1998).

La concentración de masa de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada se midió mediante un procedimiento que permitió determinar su concentración de proteína. Además, esta solución era trazable a un material de referencia con una concentración de proteína certificada: el SRM 937b (NIST). Desafortunadamente, este procedimiento no era válido para la certificación de un valor de concentración de masa del BCR 608, puesto que la concentración de masa de la enzima era muy baja, y además, su matriz contenía una elevada concentración de albúmina sérica humana. Sin embargo, la trazabilidad del BCR 608 al SRM 937b se consiguió a través de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada. Tras la medición de su concentración de proteína, la solución que contenía la isoenzima purificada se diluyó obteniéndose una solución estable y de concentración conocida que se utilizó como patrón en los distintos inmunoanálisis. De manera que la concentración de masa del BCR 608 se asignó mediante esta solución patrón asegurando su trazabilidad al SRM 937b.

4.3.1. Asignación de un valor de concentración de proteína por el procedimiento de Doetsch

Existe un gran número de procedimientos que permiten la medición de la concentración de proteína. Los más sensibles se basan en la unión que se produce entre un cromógeno específico y algunos aminoácidos de la cadena peptídica (ej.: Lowry, Coomassie) o en la absorción a 280 nm de los aminoácidos aromáticos. El material de referencia SRM 937b era una solución de albúmina sérica bovina, una proteína diferente a la creatina-quinasa 2 en cuanto a la composición de los aminoácidos que la integran. Por lo que la elección de cualquiera de los procedimientos nombrados anteriormente para asignar un valor de concentración a la solución purificada de la creatina-quinasa 2 a través del SRM 937b daría lugar a errores. En 1973, Doetsch describió un procedimiento con una elevada sensibilidad y especificidad para la cadena de aminoácidos que forma parte de cualquier proteína. Este procedimiento, que incorporaba dos cromatografías de gel filtración, había sido

considerado como un procedimiento de referencia. Por este motivo, fue seleccionado para la asignación de un valor de concentración de proteína a la solución purificada de la creatina-quinasa 2.

En la asignación de un valor de concentración de proteína a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada participaron 5 laboratorios. Previamente, y debido al elevado coste de la obtención de la creatina-quinasa 2 purificada, se realizó un ensayo preliminar con el objetivo de familiarizar a los participantes con el procedimiento de medida, y estudiar algunas características metrológicas de dicho procedimiento.

La imprecisión obtenida para cada laboratorio en el ensayo preliminar estaba comprendida entre 1,34-7,16% (Tabla 3.19.). Debido a que la solución problema objeto de la medida era de concentración conocida se pudo determinar la inexactitud del valor asignado: - 3,4%. Este valor estaba comprendido dentro de la imprecisión de la campaña de asignación del valor de concentración de proteína a la solución problema 3,84% (Tabla 3.20.).

En vista de que el procedimiento de medida de Doetsch cumplía con los requisitos esperados de inexactitud e imprecisión, se procedió a la asignación del valor de concentración de proteína a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada.

La imprecisión obtenida para cada laboratorio estaba comprendida entre 2,80-11,39% (Tabla 3.21.). Tras la evaluación estadística de los datos proporcionados por los distintos laboratorios, se determinó la concentración de proteína de la solución diluida de creatina-quinasa 2 a través de la media de medias de los distintos laboratorios, debido a que no existía un único grupo homogéneo de datos (Tabla 3.24.). El valor calculado fue 124,3 mg/L.

La imprecisión intraensayo y la interensayo eran elevadas, 7,08% y 20,84%, respectivamente, al igual que la imprecisión asociada al valor asignado 8,52% (Tabla 3.22.), lo que no es de extrañar si tenemos en cuenta que se trataba de un procedimiento manual que incluía dos cromatografías, y que la concentración de proteína de la muestra era muy cercana al límite inferior del intervalo de medida (90-1500 µg/L). El aumento de la imprecisión respecto al obtenido en el ensayo preliminar, se debía a que la concentración de proteína de la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada era sustancialmente inferior a la de la solución problema utilizada en el ensayo preliminar 124,3 mg/L y 301,1 mg/L, respectivamente.

4.3.2. Medición de la concentración de masa del material de referencia BCR 608

Debido a que en la actualidad no existe ningún procedimiento de referencia para la medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2, y a que en el estudio comparativo de los inmunoanálisis comerciales ninguno de los procedimientos estudiados parecía destacar sobre los otros, se decidió asignar el valor de concentración de masa al BCR 608 mediante su medición en un amplio número de inmunoanálisis comerciales basados en distintos principios de medida, a pesar de que se había descrito que la asignación de valores mediante procedimientos de distintas características podría aumentar considerablemente la incertidumbre del valor asignado (Dybkaer, 1991).

La concentración de creatina-quinasa 2 se midió en la misma serie, en el BCR 608 y en el patrón líquido de creatina-quinasa 2 purificada.

Cada participante calibró sus inmunoanálisis con los calibradores correspondientes, y se determinó la concentración de masa de las muestras. Las concentraciones del material de referencia obtenidas por cada participante se calcularon de dos maneras distintas. En primer lugar, se realizó una evaluación estadística de los valores de concentración medidos por cada laboratorio, una vez corregido el error volumétrico que había cometido cada participante en la reconstitución del BCR 608. El valor de concentración, 61,404 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 3.27.), se determinó a partir de la media de medias de cada grupo de datos, puesto que no existía un único grupo homogéneo de concentraciones (Tabla 3.29.). El coeficiente de variación interlaboratorio, CV: 42;4%, fue muy elevado, lo que indicaba que existía una gran diferencia entre los valores medios de concentración de los distintos grupos datos.

Esta diferencia de resultados disminuía considerablemente cuando el cálculo de la concentración se realizaba utilizando como calibrador común el patrón líquido. Por lo tanto, si los distintos inmunoanálisis fuesen calibrados frente a una misma solución de concentración conocida, que a su vez fuese conmutable con las muestras humanas, la variabilidad de resultados disminuiría notablemente. Christenson y cols. (1981) han puesto de manifiesto que mediante el uso como calibrador de un material constituido por creatina-quinasa 2 recombinante, la variabilidad existente entre los distintos inmunoanálisis se reducía de un 40% a un 13%.

Como ya se ha indicado anteriormente, la trazabilidad del BCR 608 al SRM 937b, era factible a través del patrón líquido. Por este motivo, se recalculó la concentración del material de referencia mediante esta solución de concentración

conocida, teniendo en cuenta el error volumétrico cometido en la reconstitución del BCR 608. El valor de concentración se calculó a partir de la media de las medias de cada grupo de datos por falta de homogeneidad de valores, obteniéndose un valor de 94,518 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 3.32.) con una incertidumbre relativa del 6,57%, inferior a la obtenida directamente sin la utilización del patrón líquido como calibrador, 13,30%, debido a la disminución del coeficiente de variación interensayo.

4.3.3. Asignación de la incertidumbre asociada al valor de concentración de masa del material de referencia BCR 608

La concentración de masa certificada del BCR 608 fue asignada mediante el uso del patrón líquido como calibrador, lo que garantizaba la trazabilidad al material de referencia SRM 937b. La incertidumbre asociada fue de 4,82 $\mu\text{g/L}$. Esta incluía todos los componentes de los diferentes pasos del proceso descritos en la Tabla 2.18. que contribuían de una manera significativa. Cabe destacar que la contribución mayor vino dada por la asignación del valor de concentración de proteína a la solución diluida de la creatina-quinasa 2 purificada por el procedimiento de Doetsch (Figura 3.20.), como consecuencia de la elevada imprecisión del procedimiento.

La incertidumbre expandida (intervalo de confianza del 95%) asociada al valor certificado fue 9,6 $\mu\text{g/L}$, y la incertidumbre expandida relativa fue 10,1%. Este valor era superior al obtenido en otros materiales de referencia de la BCR (Tabla 4.3.).

Respecto a la diferencia en cuanto a los valores de incertidumbre asociados a la concentración de masa y a la concentración catalítica del BCR 608, indicar que en la certificación de la concentración catalítica se utilizó un único procedimiento de medida, el procedimiento de referencia descrito por la IFCC.

4.3.4. Valor certificado del material de referencia

El valor certificado del CRM 608 fue $94,5 \pm 9,6 \mu\text{g/L}$. Este valor de concentración se encuentra dentro del intervalo de medida de los distintos inmunoanálisis comerciales que se utilizan hoy en día para medir la concentración de masa de la creatina-quinasa 2.

Descripción	Código	Incertidumbre expandida relativa (%)
Apolipoproteína A-I	BCR-393	4,7
Apolipoproteína A-II	BCR-394	5,9
Tiroglobulina	BCR-457	5,5
α_1 -Fetoproteína	BCR-486	9,0
Caliceína (antígeno específico de la prostata)	BCR-613	8,7
Creatina-quinasa 1	BCR-299	3,1
γ -Glutamyltransferasa	BCR-319	2,4
Fosfatasa alcalina	BCR-371	2,4
L-Lactato-deshidrogenasa 1	BCR-404	4,7
Fosfatasa ácida prostática	BCR-410	2,5
Alanina-aminotransferasa	BCR-426	2,3
α -Amilasa pancreática	BCR-476	1,8
Creatina-quinasa 2	BCR-608	2,7

Tabla 4.3: *Incertidumbre expandida relativa de algunos materiales de referencia certificados distribuidos por el IRMM.*

4.4. UTILIDAD DEL MATERIAL DE REFERENCIA

Debido a que el BCR 608 tiene un valor certificado de concentración catalítica y de concentración de masa, permitiría conseguir la armonización de resultados de dos tipos de procedimientos de medida mediante un único material de referencia, lo que resulta de gran ayuda si se tiene en cuenta que actualmente se utilizan para medir la concentración de la creatina-quinasa 2, tanto los procedimientos basados en el inmunoanálisis como los procedimientos basados en la inmunoinhibición,.

El material de referencia de creatina-quinasa 2 puede ser empleado en la comparación de resultados de laboratorios que utilicen el mismo procedimiento de medida y en el control de la calidad del procedimiento de rutina del propio laboratorio.

Asimismo, el material de referencia puede ser usado para la calibración de un procedimiento de medida de creatina-quinasa 2 a un solo punto de concentración, o a varios puntos si se diluye en la misma matriz. En caso de emplearse como calibrador es preciso utilizar un material control para valorar la calidad analítica del procedimiento.

Si el material de referencia se utiliza para validar la calidad analítica de un determinado procedimiento, el valor esperado de concentración de masa de creatina-quinasa 2 será el valor certificado incluyendo el intervalo de confianza del 95% definido, pero si se emplea como calibrador deberá utilizarse el valor certificado.

En el caso de la validación de la calidad analítica de un procedimiento determinado usado en el propio laboratorio, se deberán realizar los siguientes cálculos:

- Para valorar la reproducibilidad del procedimiento estudiado habrá que comparar la varianza obtenida en n determinaciones con la varianza intralaboratorios obtenida en la campaña de certificación, es decir: $8,644 (\mu\text{g/L})^2$. La comparación de varianzas puede realizarse mediante la simple inspección o aplicando la prueba estadística adecuada.
- Para valorar el error sistemático del procedimiento estudiado habrá que comparar la media obtenida en n determinaciones en el laboratorio (y) con el valor certificado (μ), el error sistemático vendrá dado por la siguiente ecuación:

$$\delta = y - \mu$$

y el intervalo de confianza (95%) de dicho error se calculará mediante la siguiente ecuación:

$$d - 2 S_b \leq \delta \leq d + 2 S_b$$

Siendo S_b la desviación típica interlaboratorio (19,807 $\mu\text{g/L}$) estimada en la campaña de certificación.

Sin embargo, debido a la falta de conmutabilidad del BCR 608 con las muestras humanas, difícilmente se podrán solucionar los problemas de homogeneización de resultados a través de la asignación de valores de concentración de masa a los calibradores producidos por los distintos fabricantes utilizando este material referencia como patrón. Por este motivo, sería necesaria la preparación de un material de referencia secundario que fuese conmutable con las muestras humanas (p. ej.: creatina-quinasa 2 purificada diluida en una mezcla de especímenes plasmáticos dializados) al que se le asignaría un valor de concentración con un procedimiento de referencia (en el momento que existiese) usando como patrón el BCR 608. Mediante este material de referencia secundario se asignarían valores de concentración a los patrones comerciales con el procedimiento de medida escogido por el fabricante correspondiente (Figura 4.1.).

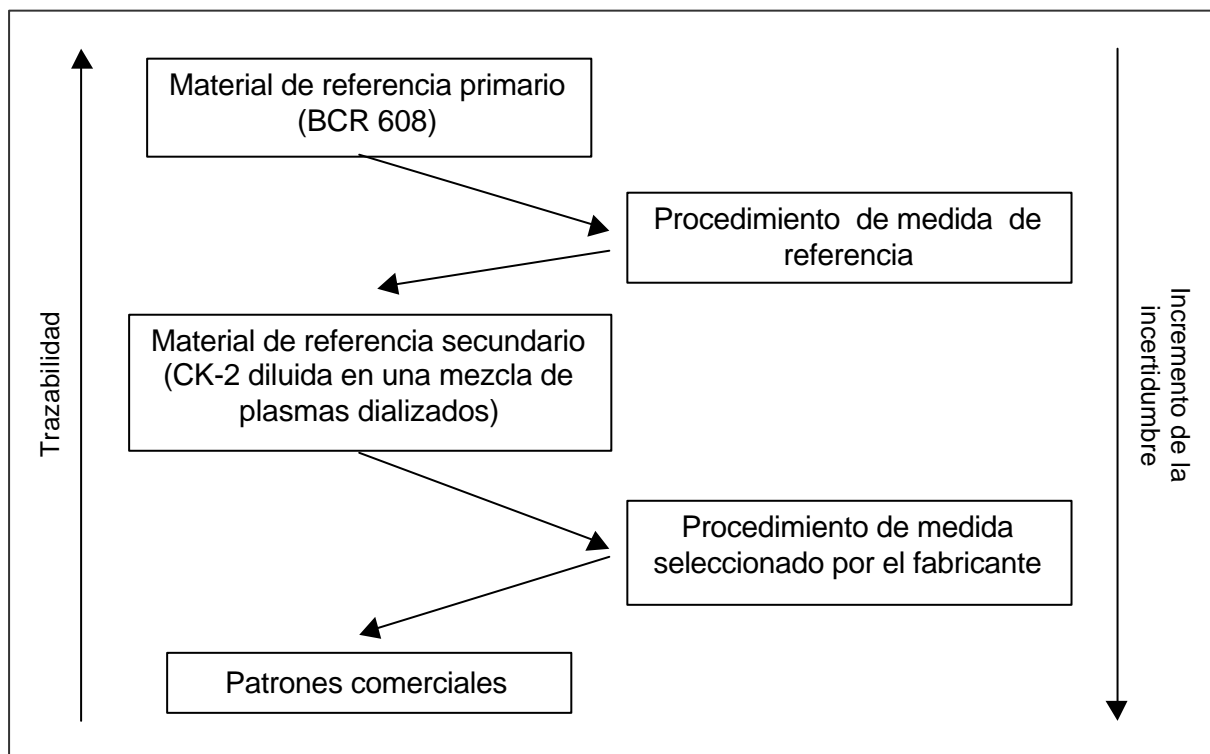


Figura 4.1: Armonización de resultados con calibradores comerciales trazables al BCR 608.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron 8 mg de creatina-quinasa 2 purificada a partir de 193 g de tejido miocárdico humano, con una actividad específica de 10 $\mu\text{kat}/\text{mg}$ y una concentración catalítica de 14.033 $\mu\text{kat}/\text{L}$. El rendimiento fue de un 7,2%, con un factor de purificación de 55 veces.
2. La isoenzima purificada estaba compuesta por dos subunidades con una masa molar de 40.800 g/mol (subunidad M) y 44.500 g/mol (subunidad B). El pH isoeléctrico era de 5,56. El análisis de la pureza y la caracterización molecular de la creatina-quinasa 2 purificada, realizado mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes, no desnaturalizantes, revelado con anticuerpo específicos y medición de posibles enzimas contaminantes, demostró que la isoenzima presentaba las características adecuadas para la preparación del patrón líquido.
3. Los distintos inmunoanálisis comparados para la medición de la concentración de masa de la creatina-quinasa 2 correlacionaban bien (coeficientes de correlación comprendidos entre 0,91 y 0,96). Sin embargo, existían diferencias significativas entre ellos, como reflejan las pendientes y las ordenadas en el origen de las rectas de regresión obtenidas mediante la comparación por el procedimiento de Passing y Bablok.
4. El estudio del efecto matriz puso de manifiesto que la mayoría de las matrices estudiadas no eran conmutables con los especímenes plasmáticos utilizados en el estudio comparativo de los distintos inmunoanálisis. Sin embargo, la dialisis tanto de la mezcla de especímenes séricos, como de la mezcla de especímenes plasmáticos, aumentaba su conmutabilidad.
5. La comparación entre la matriz sérica y plasmática confirmó el diferente comportamiento de la creatina-quinasa 2 frente a los distintos inmunoanálisis observado en el estudio de conmutabilidad. Los valores de concentración de masa obtenidos eran más elevados cuando la medición de la isoenzima se realizaba en la matriz sérica. Las matrices dializadas presentaban una concentración de creatina-quinasa 2 equivalente, en cualquier caso el grado de equivalencia dependía del inmunoanálisis utilizado.
6. La creatina-quinasa 2 en la matriz sintética, al igual que en el material de referencia, no era conmutable con los especímenes plasmáticos. El comportamiento de la isoenzima en ambas matrices era el mismo.
7. La calibración de los distintos inmunoanálisis mediante una misma solución de concentración conocida, que a su vez era conmutable con la muestra objeto de la medida, disminuía notablemente la variabilidad entre procedimientos, como ha

quedado evidenciado en la medición de la concentración masa de la creatinina 2 del BCR 608 usando el patrón líquido como calibrador.

8. El valor certificado de concentración de masa del BCR 608 con su incertidumbre expandida asociada fue $94,5 \pm 9,6 \mu\text{g/L}$.

BIBLIOGRAFÍA

A

Adams JE, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Is the MB creatine kinase the choice for the 1990s?. *Circulation* 1993;88:750-63.

Antman EM, Grudzien C, Mitchell RN, Sacks DB. Detection of unsuspected myocardial necrosis by rapid bedside assay for cardiac troponin T. *Am Heart J* 1997;133:596-8.

Apple FS. Acute myocardial infarction and coronary reperfusion. Serum cardiac markers for the 1990s. *Am J Clin Pathol* 1992;97:217-26.

Apple FS. Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase-MB. *Clin Chim Acta* 1999;284:151-9.

Apple FS. Increased concentrations of cardiac troponin I are equivalent to increased cardiac troponin T in identifying chest pain patients at short-term risk of myocardial infarction. *Clin Chem* 1998;44:1786-9.

Arenas J, Gella FJ. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la creatina quinasa en suero sanguíneo humano. *Quim Clin* 1988;7:29-32.

B

Bergmeyer HU. Hexoquinase. En: *methods of enzymatic analysis* (3^a ed). Vol II. Bergmeyer HU (dir). Weinheim: Verlag Chemie 1983;222-4.

Bota A. Obtenció d'adenosina-desaminasa humana a partir d'eritròcits. Preparació d'un material de referència europeu. Tesis doctoral 2000.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

Bucher EA, Maisonpierre PC, Konieczny SF, Emerson CP Jr. Expression of the troponin complex genes: transcriptional coactivation during myoblast differentiation and independent control in heart and skeletal muscles. *Mol Cell Biol* 1988;8:4134-42.

Buttner J. The need for accuracy in laboratory medicine. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:981-8.

Buttner J. Philosophy of measurement by means of immunoassays. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1991;205:11-20.

Buttner J. Reference methods as a basis for accurate measuring systems. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1991;29:223-35.

C

Chapelle JP, Heusghem C. Further heterogeneity demonstrated for serum creatine kinase isoenzyme MM. Clin Chem 1980;26:457-62.

Christenson RH, Vaidya H, Landt Y, Bauer RS, Green SF, Apple FA, Jacob A. Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer HU (dir.). 3^a ed. vol II. Weinheim: Verlag-Chemie, 1983.

Chuga DJ. Fluorescent albumin-bilirubin complex on cellulose acetate electropherograms, which may confuse creatine kinase isoenzyme assay. Clin Chem 1979;25:494.6.

Cobbaert C, Leinbach RC, Collen D. Detection of coronary artery reperfusion with creatine kinase-MB determinations during thrombolytic therapy: correlation with acute angiography. J Am Coll Cardiol 1988;11:729-34.

Cochran WG, Cox GM. Experimental Design, 2nd ed., John Willey & Sons, Inc., New York, 1957:343.

Couthon F, Clottes E, Vial C. High salt concentrations induce dissociation of dimeric rabbit muscle creatine kinase-Physico-chemical characterization the monomeric species. Bba-Protein Struct Mol Enzym 1997;1339:277-88.

D

Dawson DM, Eppenberger HM, Kaplan NO. The comparative enzymology of creatine kinases. J Biol Chem 1967;242:210-17.

Deutsch J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. En: Methods of enzymatic analysis (3^a ed). Vol II. Bergmeyer HU (dir). Weinheim: Verlag Chemie 1983;190-197.

DeWood MA, Leonard J, Grunwald RP, Hensley GR, Mouser LT, Burroughs RW, Berg R Jr, Fisher LD. Medical and surgical management of early Q wave myocardial infarction. II. Effects on mortality and global and regional left ventricular function at 10 or more years of follow-up. *J Am Coll Cardiol* 1989;14:78-90.

Doetsch K, Gadsden RH. Determination of total urinary protein, combining Lowry sensitivity and Biuret specificity. *Clin Chem* 1973;19:1170-78.

Dybkaer R. Reference materials-A main element in a coherent reference measurement system. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29:241-46.

E

Edwards RJ, Watts DC. Human "creatine kinase conversion factor" identified as a carboxipeptidase. *Biochem J* 1984;221:465-70.

Eisenberg PR, Shaw D, Shaw C, Jaffe AS. Concordance of creatine kinase-MB activity and mass. *Clin Chem* 1989;35:440-43.

Elding S, Gercken G, Harm K, Vogt KD. The isoelectric focusing of creatine kinase variants:I. The heterogeneity of creatine kinase in human heart cytosol and mitochondria. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986;24:283-92.

Eppenberger HM. I-1a A brief summary of the history of the detection of creatine kinase isoenzymes. *Mol Cell Biochem* 1994;133/134:9-11.

Eurachem/Citac Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement. Second Edition 2000.

F

Forstner M, Muller A, Stolz M, Wallimann T. The active site histidines of creatine kinase. A critical role of His 61 situated on a flexible loop. *Protein Sci* 1997;6:331-39.

Franzini C, Ceriotti F. Impact of reference materials on accuracy in clinical chemistry. *Clin Biochem* 1998;31:449-57.

Frey E. Obtención de creatina-quinasa 2 humana y preparación de un material de referencia certificado. Tesis doctoral 1996.

Fritz-Wolf, K., Schnyder, T., Wallimann, T. & Kabsch, W. Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature* 1996;381:341-45.

Fuentes A. Diccionari d'especialitat. Bioquímica Clínica. Barcelona. EUMO 1999.

Furter R, Furter-Graves EM, Wallimann T. Creatine kinase: The reactive cysteine is required for synergism but is nonessential for catalysis. *Biochemistry* 1993;32:7022-29.

G

Galán A. Creatina-kinasa. Isoenzimas y formas múltiples de las enzimas en Bioquímica Clínica. Comité de publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica clínica y patología Molecular 1996.

Gadsden RH sr, Papadea CN, Cate JC 4th. Analytical evaluation of methods for serum creatine kinase-MB. Electrophoresis, immunoinhibition and solid phase separation. *Ann Clin Lab Sci* 1994;24:110-20.

Garabedian HD, Gold HK, Yasuda T, Johns JA, Finkelstein DM, Gaivin RJ, Cobbaert C, Leinbach RC, Collen D. Detection of coronary artery reperfusion with creatine kinase-MB determinations during thrombolytic therapy: correlation with acute angiography. *J Am Coll Cardiol* 1988;11:729-34.

Green S, Onoroski M, Moore R, Wu A. Standardization of CK-MB mass immunoassays. *Clin Chem* 1994;40:1032.

Gella FJ, Arenas J, Carreras J, Durbán R, Moreno R, Pator MC. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de aspartato-aminotransferasa en suero sanguíneo humano. *Quim Clin* 1987;6:235-39.

Gella FJ, Arenas J, Carreras J, Durbán R, Galán A, Moreno R, Pator MC. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de alanina-aminotransferasa en suero sanguíneo humano. *Quim Clin* 1987;6:241-44.

Gella FJ, Canalias F. Calibration and traceability of enzyme and antibody measurements. *Clin Chim Acta* 1998;278:145-9.

Gella FJ, Frey E, Ceriotti F, Galan A, Hadjivassiliou AG, Horder M, LorentzK, Moss DW, Schiele F, Canalias F. Production and certification of an enzyme reference material for creatine kinase isoenzyme 2 (CRM 608). *Clin Chim Acta* 1998;276:35-52.

George S, Ishikawa Y, Perryman MB, Roberts R. Purification and characterization of naturally occurring and in vitro induced multiple forms of MM creatine kinase. *J Biol Chem* 1984;259:2667-74.

Gerhardt W, Waldenström J. Creatine kinase B-subunit activity in serum after immunoinhibition of M-subunit activity. *Clin Chem* 1979;25:1274-80.

Gerhardt W, Ljungdahl L, Collinson PO, Lovis C, Mach F, Sylven C, Rasmanis G, Leinberger R, Zerback R, Muller-Bardorff M, Katus HA. An improved rapid troponin T test with a decreased detection limit: a multicentre study of the analytical and clinical performance in suspected myocardial damage. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57:549-57.

Gibler WB, Lewis LM, Erb RE, Makens PK, Kaplan BC, Vaughn RH, Biagini AV, Blanton JD, Campbell WB. Early detection of acute myocardial infarction in patients presenting with chest pain and nondiagnostic ECGs: serial CK-MB sampling in the emergency department. *Ann Emerg Med* 1990;19:1359-66.

Gillum RF, Fortmann SP, Prineas RJ, Kottke TE. International diagnostic criteria for acute myocardial infarction and acute stroke. *Am Heart J* 1984;108:150-8.

Griffiths PD. CK-MB: a valuable test?. *Ann Clin Biochem* 1986;23:238-242.

Grimm RH, Tillingshast S, Daniels K, Neaton JD, Mascioli S, Gow R, Pritzker M, Prineas RJ. Unrecognized myocardial infarction: experience in the multiple risk factor intervention trial (MRFLT). *Circulation* 1987;75 (Suppl 11):11-6-11-8.

Guardiá M, Lopez R, Gella FJ. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de lactato deshidrogenasa en suero sanguíneo humano. *Quim Clin* 1989;8:57-61.

Gubern G. Preparació d'un material de referència europeu d' α -amilasa pancreàtica humana. Tesis doctoral 1994.

H

Hearse JD. Cellular damage during myocardial ischaemia: metabolic changes leading to enzyme leakage. En: Enzymes in cardiology. Hearse DJ, Leiris J (dirs) New York: John Wiley 1979:1-19.

Henrich N. Differentiation of creatine kinase isoenzymes by nonimmunological methods. En: Lang H, ed.: Creatine kinase isoenzymes. Berlin, New York: Springer-verlag, 1981;41-7.

Hermens WT. Mechanisms of protein release from injured heart muscle. En: Myocardial damage: early detection by novel biochemical markers. Kaski JC, Holt DW (dirs). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1998:85-98.

Hess JW, Macdonald RP. Serum creatine phosphokinase activity. Mich Med 1963;62:1095-8

Hoang CD, Zhang J, Payne RM, Apple FS. Post-infarction left ventricular remodeling induces changes in creatine kinase mRNA and protein subunit levels in porcine myocardium. Am J Pathol 1997;151:257-64.

Hudson MP, Christenson RH, Newby LK, Kaplan AL, Ohman EM. Cardiac markers: point of care testing. Clin Chim Acta. 1999;284:223-37.

I

Ingwall JS, Kramer MF, Fifer MA, Lorell BH, Shemin R, Grossman W, Allen PD. The creatine kinase system in normal and diseased human myocardium. New Engl J Med 1985;313:1050-54.

International Standards Organization (ISO). Terms and definitions used in connections with reference materials. ISO Guide 30, 1992.

J

Jeffcoate SL. Role of reference materials in immunoassay standardization. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1991;205:131-3.

Jockers-Wretou E, Pfeleiderer G. Quantitation of creatine kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunologicla method. Clin Chim Acta 1975;58:223-232.

Jones MG, Swaminathan R. The clinical biochemistry of creatine kinase. JIFCC 1990;2:108-14.

K

Kanemitsu F, Okigaki T. Creatine kinase isoenzymes. J Chromatogr 1988;429:399-417.

Kannel WB. Epidemiology and prevention of cardiac failure: Framingham Study insights. Eur Heart J 1987;8:23-6.

Katus HA, Remppis A, Scheffold T, Diederich KW, Kuebler W. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. Am J Cardiol 1991;67:1360-7.

Katus HA, Diederich KW, Scheffold T, Uellner M, Schwarz F, Kubler W. Non-invasive assessment of infarct reperfusion: the predictive power of the time to peak value of myoglobin, CKMB, and CK in serum. Eur Heart J 1988 Jun;9:619-24.

Kost GJ, Kirk JD, Omand K. A strategy for the use of cardiac injury markers (troponin I and T, creatine kinase MB mass and isoforms, and myoglobin) in the diagnosis of acute myocardial infarction. Arch Pathol Lab Med 1998;122:245-51.

Kumudavalli I, Watts DC. Formation of an unusual hybrid in the development of human adenosine^{5'}-triphosphate-creatine phosphotransferase. Biochem J 1968;108:547-50.

L

LaDue JS, Wroblewski F, Karmen A. Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transhumeral myocardial infarction. Science 1954;120:497.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-85.

Langlois MR, Delanghe JR, De Buyzere ML, Leroux-Roels GG. Glycation of human tissue and serum creatine kinase. *Clin Chim Acta* 1992;211:83-92.

Lee NK, Csako G, Bernhardt P, Elin R. Relevance of macro creatine kinase type 1 and type 2 isoenzymes to laboratory and clinical data. *Clin Chem* 1994;40:1278-83.

Lee TH, Goldman L. Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann Internal Med* 1986;105:221-33.

Lott JA, Stang JM. Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis. *Clin Chem* 1980;26:1241-50.

M

Magneson GR, Nag S, Wu AH, Azzazy HM. Standardization of creatine kinase-MB (CK-MB) mass assays: the use of recombinant CK-MB as a reference material. *Clin Chem* 1999;45:1414-23.

Mair J. Tissue release of cardiac markers: from physiology to clinical applications. *Clin Chem Lab Med*. 1999;37:1077-84.

Maire I, Artur Y, Aubry C, Bailly M, Besses C, Braun JP, Frei J, Lanlegerie P, Mathieu M et al. Les méthodes de mesure des isoenzymes de la créatine kinase (iso CK) en chimie clinique: revue générale. *Ann Biol Clin* 1986;44:303-20.

Mao GD, Adeli K, Eisenbrey AB, Artiss JD. Clinical laboratory investigation of the Sanofi ACCES CK-MB procedure and comparison to electrophoresis and Abbott IMx. *Clin Chem* 1996;106:112-17.

Marchandise H, Colinet E. Assessment of methods of assigning certified values to reference materials. *Fresenius Z Anal Chem* 1983;316:669-72.

McBride JH, Rodgerson DO, Ota MK, Maruya M, McEveney S. Creatine kinase MB measured by fluorometric enzyme immunoassay and immunochemiluminescence. *Ann Clin Lab Sci* 1991;21:284-90.

Mehta J, Chopra JS, Mehta S, Nain CK, Bhagwat AG, Dhand UK, Rana SV. Ultrastructure and activity of some enzymes of energy metabolism of skeletal muscle in experimental energy deficiency. *Ann Nutr Metab* 1987;31:35-46.

Morison IM, Clayson KJ, Fine JS. Effect of creatine kinase-MM subtype composition on a CK-MB immunoinhibition assay. *Clin Chem* 1988;34:535-38.

Moss DW, Henderson R. Enzymes. En: *Tietz textbook of Clinical Chemistry*. Burtis CA y Aschwood ER (dirs.) 2ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994:735-896.

Moss DW, Whicher JT. Commutability and the problem of method-dependent results. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:1003-7.

Moss DW. Enzyme standardization-the way forward. *Ann Clin Biochem* 1997;34:13-6.

Moss DW. Materiales de referencia enzimáticos: su situación en enzimología clínica. *Quim Clin* 1994;13:261-64.

N

Nealon DA, Henderson AR. Stability of commonly used thiols and of human creatine kinase isoenzymes during storage at various temperatures in various media. *Clin Chem* 1977;23:816-29.

Neumeier D, Prellwitz W, Würzburg U, Brundobler M, Olbermann M, Just HJ, Knedel M, Lang H. Determination of creatine kinase isoenzyme MB activity in serum using immunological inhibition of creatine kinase M subunit activity. *Clin Chim Acta* 1976;73:445-51.

P

Panteghini M, Pagani F, Bonetti G. The sensitivity of cardiac markers: an evidence-based approach. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1097-106.

Panteghini M. Diagnostic application of CK-MB mass determination. *Clin Chim Acta* 1998;272:23-31.

Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:709-20.

Perryman MB, Strauss AW, Buettner TL, Roberts R. Molecular heterogeneity of creatine kinase isoenzymes. *Biochim Biophys Acta* 1983;747:284-290.

Perryman MB, Knel JD, Roberts R. Carboxypeptidase-catalyzed hydrolysis of C-terminal lysine: mechanism for in vivo production of multiple forms of creatine kinase in plasma. *Clin Chem* 1984;30:662-64.

Plebani M, Zaninotto M. Cardiac markers: centralized or decentralized testing?. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1113-7.

Price CP. Progress in immunoassay technology. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:341-7.

R

Ritter CS, Mumm SR, Roberts R. Improved radioimmunoassay for creatine kinase isoenzymes in plasma. *Clin Chem* 1981;27:1878-87.

Roberts R, Kleiman NS. Earlier diagnosis and treatment of acute myocardial infarction necessitates the need for a 'new diagnostic mind-set'. *Circulation* 1994;89:872-81.

S

Sanz GA. Cardiopatía isquémica. En: *Medicina interna*. Rozman C (dir) 12ªed. Barcelona: Ediciones Doyma 1992,509-527.

Sánchez M, Canalias F, Palencia T, Gella FJ. Creatine kinase 2 mass measurement: methods comparison and study of the matrix effect. *Clin Chim Acta* 1999;288:111-9.

Schwertner HA, Hawthorne SB. Albumin-bound fluorescence in serum of patients with chronic renal failure. *Clin Chem* 1980;26:649-52.

Sistermans EA, de Kok YJM, Peters W, Ginsel LA, Jap PHK, Wieringa B. Tissue-and cell. Specific distribution of creatine kinase B: A new and highly specific monoclonal antibody for use in immunohistochemistry. *Cell Tissue Res* 1995;280:435-46.

Sjovall K, Voight A. Creatine-phospho-transferase isoenzymes. *Nature* 1964;4933:701.

Smith AF. Separation of tissue and serum creatine kinase isoenzymes on polyacrylamide gel slabs. *Clin Chim Acta* 1972;39:351-59.

Somer H, Konttinen A. Demonstration of serum creatine kinase isoenzymes by fluorescence technique. *Clin Quim Acta* 1972;40:133-38.

Stamm D. Reference materials and reference methods in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* 1979;17:283-97.

Stein W, Bohner J, Eggstein. Creatine kinase variants. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:859-76.

Stein W, Bohner J, Steinhart R, Eggstein M. Macro creatine kinase:determination and differentiation of two types by their activation energies. *Clin Chem* 1982;28:19-24.

Stein W, Bohner J, Renn W, Maulbetsch R. Macro creatine kinase type 2: results of a prospective study in hospitalizedpatients. *Clin Chem* 1985;31:1959-64.

I

Tietz NW. Accuracy in clinical chemistry--does anybody care?. *Clin Chem* 1994;40:859-61.

Trainer TD, Gruenig D. A rapid method for the analysis of creatine phosphokinase isoenzymes. *Clin Chim Acta* 1968;21:151-54.

Trask RV, Strauss AW, Billadello JJ. Developmental regulation and tissue-specific expression of the human musclecreatine kinase gene. *J Biol Chem* 1988;263:17142-9.

U

Urdal P, Urdal K, Stromme JH. Cytoplasmic creatine kinase isoenzymes quantitated in tissue specimens obtained by surgery. *Clin Chem* 1983;29:310-13.

Uriano GA, Gravatt CC. The role of reference materials and reference methods in chemical analysis. *CRC Crit Rev Anal Chem* 1977;6:361-411.

V

Vaidya H, Beatty BG. Eliminating interference from heterophilic antibodies in a two-site immunoassay for creatine kinase MB by using F(ab') conjugate and polyclonal mouse IgG. *Clin Chem* 1992;38:1737-42.

Van der Veen KI, Willebrands AF. Isoenzymes of creatine phosphokinase in tissue extracts and in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta* 1966;13:312-16.

Voss EM, Sharkey SW, Gernert AE, Murakami MM, Johnston RB, Hsieh CC, AppleFS. Human and canine cardiac troponin T and creatine kinase-MB distribution in normal and diseased myocardium. Infarct sizing using serum profiles. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119:799-806.

W

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 1992;281:21-40.

Wang XCH, Zhou HM, Wang ZX, Tsou CHL. Is the subunit the minimal function unit of creatine kinase?. *Biochim Biophys Acta* 1990;1039:313-17.

Webb T, Jackson PJ, Morris GE. Protease digestion studies of an equilibrium intermediate in the unfolding of creatine kinase. *Biochem J* 1997;321:83-8.

Westgard JO, Seehafer JJ, Barry PL. European specifications for imprecision and inaccuracy compared with operating specifications that assure the quality required by US CLIA proficiency-testing criteria. *Clin Chem* 1994;40:1228-32.

Wevers RA, Olthuis HP, Van Niel JCC, Van Wilgenburg MGM, Soons JBJ. A study on the dimeric structure of creatine kinase (EC 2.7.3.2.). *Clin Chim Acta* 1977;75:377-85.

Willerson JT. Diagnóstico clínico del infarto agudo de miocardio. *Hospital practice* 1989;4:70-85.

Wolf PL, Kearns T, Neuhoff J, Lauridson J. Identification of CPK isoenzyme MB in myocardial infarction. *Lab Med* 1974;5:48-50.

Wolfson D, Lindberg E, Su L, Farber SJ, Dubin SB. Three rapid immunoassays for the determination of creatine kinase MB: an analytical, clinical, and interpretive evaluation. *Am Heart J* 1991;122:958-64.

Wong PCP, Smith AF: Biochemical differences between the MB and MM isoenzymes of creatine kinase. *Clin Chim Acta* 1976;68:147-58.

Würzburg U, Ströbel R. Immunoinhibition test for creatine kinase-B subunit: a comparison of monoclonal mouse and polyclonal goat antibodies. *J Clin Chem Clin Biochem* 1981;19:543-44.

Würzburg U, Hennrich N, Lang H, Prellwitz W, Neumeier D, Knedel M. Determination of creatine kinase MB in serum using inhibiting antibodies. *Klin Wschr* 1976;54:357-60.

Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1992;1102:119-66.

Wyss M, James P, Schlegel J, Wallimann T. Limited proteolysis of creatine kinase. Implications for three-dimensional structure and for conformational substrates. *Biochemistry* 1993;32:10727-35.

Wyss M, Schlegel J, James P, Eppenberger HM, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase from chicken brain. Purification, biophysical characterization, and generation of heterodimeric and heterooctameric molecules with subunits of other creatine kinase isoenzymes. *J Biol Chem* 1990;265:15900-8.

ANEXO

PROTEIN CONCENTRATION MEASUREMENT IN PURIFIED HUMAN CREATINE KINASE 2

VALUE ASSIGMENT CAMPAIGN

LABORATORY
Name of responsible
Address
.....
.....
Telephone number
Fax number
E-mail

Please complete these 3 sheets and return before **March 16 1998**, to:

Francesca CANALIAS
Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular
Unitat de Bioquímica de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona
Edifici M 08193-Bellaterra (Spain)
Fax (34) 3 581 15 73

CALIBRATION OF PIPETTES

Nominal volume (mL)	1.00	0.50	0.25
Mean weight of water delivered (g)
Temperature (°C)
Corrected volume (mL)

SPECTROMETER

Name and type

Bandwidth (nm)

Wavelength selection by

Actual wavelength for measurements (nm)

REAGENTS

	Manufacturer	Code	Lot
Sodium hydroxide		
Sodium potassium tartrate		
Copper (II) sulfate		
Potassium iodide		
Sodium diethyldithiocarbamate		

PREPARATION OF SOLUTIONS

	day 1	day 2	day 3
Absorbance of solution II at 654 nm against water		
Absorbance of solution III at 347 nm against water		

RESULTS

	day 1	day 2	day 3
Absorbance of calibration material			
Absorbance of sample (CK 2)			

OBSERVATIONS

**ASSIGNMENT CAMPAIGN OF
CREATINE KINASE 2 MASS CONCENTRATION
VALUE TO CRM 608**

LABORATORY
Name of responsible
Address
.....
.....
Telephone number
Fax number
E-mail

Please complete these 4 sheets and return before **July 14, 1999**, to:

Francesca CANALIAS
Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular
Unitat de Bioquímica de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona
Edifici M 08193-Bellaterra (Spain)
Tel. +34 93 581 15 75 Fax +34 93 581 15 73
E-mail: francesca.canalias@blues.uab.es

CALIBRATION OF PIPETTE	
Nominal volume: 1.00 mL	Weight of water delivered (g)
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
Mean (g), SD	
CV (%)	
Temperature (°C)	
Corrected volume (mL)	

ANALYZER	
Manufacturer	
Name	
Type of detection system	
CALIBRATOR: code number	lot number
Type of calibration	

REAGENTS AND CONTROL MATERIALS		
	Code number	Lot number

VIALS OF CRM 608		
Date of receipt in the laboratory:		
	Date of measurement	Number of vial (see label)
First vial		
Second vial		
First vial		
Second vial		
First vial		
Second vial		

RESULTS

CONTROL MATERIALS				
Target value	Range of acceptable values	Obtained values		
		Day 1	Day 2	Day 3

LIQUID STANDARD		
Obtained values (mg/L)		
Day 1	Day 2	Day 3

CRM 608			
Obtained values (mg/L)			
	Day 1	Day 2	Day 3
Vial 1			
Vial 2			

OBSERVATIONS