

Estabilidad de un suero control multienzimático utilizado como material de referencia en los laboratorios clínicos

Stability of a multienzyme control serum used as reference material in clinical laboratories

Dr.Cs. Oscar Hernández Betancourt,¹ Lic. Sandra Fernández Torres,¹ Lic. Nayadis Vázquez Reyes,¹ Téc. Lydice Leiva Quesada,¹ Dra. Yadira Falcón Almeida,¹ Dr. Ubaldo Torres Romo²

¹ Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI). Universidad de Ciencias Médicas "Carlos J. Finlay". Camagüey, Cuba.

² Policlínico "Julio A. Mella". Camagüey, Cuba.

RESUMEN

Una de las vías fundamentales para garantizar la calidad de los ensayos realizados en los laboratorios clínicos es mediante el uso de materiales de referencia. Una problemática a la que nos enfrentamos es la escasez de estos productos en el mercado nacional dado su alto costo. **Objetivo:** evaluar la estabilidad de un suero bovino adulto enriquecido con las enzimas alanina aminotransferasa (ALAT/TGP), aspartato aminotransferasa (ASAT/TGP), fosfatasa alcalina (FA) y amilasa.

Métodos: se evaluó la estabilidad a tiempo real de la matriz enriquecida con las diferentes enzimas durante 12 meses a 2 temperaturas (refrigeración y congelación). Se evaluó el efecto del glicerol sobre la actividad enzimática de los extractos, así como el efecto de los preservantes propilenglicol y etilenglicol en la estabilidad de las enzimas. **Resultados:** los extractos enzimáticos obtenidos comenzaron a perder la actividad biológica a partir de los 15 días, independientemente de la temperatura de almacenamiento y de la presencia o no de glicerol. Los resultados del ensayo a tiempo real realizados a la matriz enriquecida, mostraron que la estabilidad varió con el tiempo y con el tipo de enzima, independientemente del preservante ensayado, disminuyendo por debajo

de los límites aceptables de actividad enzimática luego de 3 meses de almacenamiento del producto a 4 °C. **Conclusiones:** se logró un material de referencia multienzimático estable por un período de 3 meses.

Palabras clave: enzimas, ALAT, ASAT, FA, amilasa, suero control, glicerol, estabilidad enzimática, material de referencia.

ABSTRACT

A fundamental method to assure the quality of clinical laboratory tests is the use of reference materials. A problem we are faced with is the scarcity of these products in the domestic market, due their high cost. **Objective:** Evaluate the stability of an adult bovine serum enriched with the enzymes alanine aminotransferase (ALT, GPT), aspartate aminotransferase (AST, GPT), alkaline phosphatase (AP) and amylase. **Methods:** This enzyme-enriched matrix underwent real-time stability assessment during 12 months at two temperatures (refrigerated and frozen). An evaluation was made of the effect of glycerol on the enzymatic activity of extracts, as well as the effect of the preservatives propylene glycol and ethylene glycol on enzymatic stability. **Results:** The enzyme extracts obtained began to lose their biological activity at 15 days, irrespective of the storage temperature and the presence or absence of glycerol. The real time assessment of the enriched matrix showed that stability varied with time and enzyme type, irrespective of the preservative tested, and fell below acceptable limits of enzymatic activity after three months of storage at 4 °C. **Conclusions:** A multienzyme reference material was obtained which was stable for a period of 3 months.

Key words: enzymes, ALT, AST, AP, amylase, control serum, glycerol, enzymatic stability, reference material.

INTRODUCCIÓN

La bioquímica clínica emplea métodos analíticos con la finalidad de conocer la presencia y concentraciones de múltiples sustancias, incluyendo enzimas que componen los fluidos corporales humanos. Estos métodos pueden ser utilizados con igual propósito en animales, e incluso en las plantas. La implementación de un sistema de control de la calidad validado por las normativas internacionales en vigor, constituye la máxima aspiración de estos laboratorios para garantizar la precisión y confiabilidad de sus resultados. Teniendo en cuenta las normativas ISO 15189 para los laboratorios médicos,¹ la calibración de sistemas de medición debe asegurar en la medida de las posibilidades, que los resultados sean expresados en unidades internacionales estandarizadas (UI).

No obstante, mientras se trabaja en la implementación de este complejo sistema de la calidad, se puede trabajar en el mejoramiento de algunos aspectos

determinantes en la confiabilidad de los resultados obtenidos. Un importante factor dentro de los laboratorios clínicos que contribuye a mejorar la precisión y exactitud de los ensayos que en estos se llevan a cabo, es el empleo de diversos estándares, calibradores y materiales de referencias. Este tipo de sustancia son especímenes estables, homogéneos, que se comportan como muestras clínicas con valores asegurados.

Las enzimas representan una clase especial de analitos;² estas se definen en término de "cantidades catalíticas" y su aplicabilidad es solo posible si los materiales de referencias empleados son comutables, que en enzimología se define como "la capacidad que tiene un material enzimático (referencia o control) de mostrar los cambios de actividad interensayos similar a aquellos que la misma enzima tiene en el suero humano".³ Implementar la estandarización en enzimología mediante sistemas de referencias, requiere de métodos comerciales que tengan las mismas especificidades analíticas hacia la enzima de interés y al procedimiento de referencia a utilizar.

Las mediciones de enzimas son importantes para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades del hígado, páncreas, músculo esquelético y hueso entre otras,⁴ lo cual enfatiza la importancia de resultados estandarizados en la práctica, ya que la incoherencia entre los resultados de un mismo paciente, no es algo poco común, lo que resulta peligroso y confuso tanto para clínicos como para pacientes, pues el mismo resultado puede ser considerado "normal" en un laboratorio y "anormal" en otro. Con tal finalidad se crean sistemas de referencias basados en la trazabilidad y jerarquía de los procedimientos para las mediciones.⁵⁻⁷

El objetivo de estandarizar las determinaciones de las concentraciones catalíticas de diferentes enzimas, es lograr resultados comparables en muestras humanas independientes de los juegos reactivos, instrumentos empleados y laboratorios donde se esté llevando a cabo el procedimiento. Con tal finalidad la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC) ha trazado proyectos para sistemas de referencias en enzimología clínica. Los procedimientos recomendados por la IFCC para la alanina aminotransferasa (ALAT), aspartato aminotransferasa (ASAT), creatina quinasa, gamma-glutamiltransferasa, lactato deshidrogenasa y alfa-amilasa, se han modificado recientemente para su optimización a 37 °C.²

En cuanto a los materiales de referencia no enzimáticos, existen actualmente varios fabricantes reconocidos, entre los que se encuentra la *OLYMPUS, HUMAN Diagnostica, Boehringer Mannheim GmbH Diagnóstica* y *BIO-RAD*, entre otras, con objetivos diversos en sus producciones.⁸ En cambio existen pocos trabajos destinados a la búsqueda de materiales de referencia o calibradores tanto monoenzimáticos como multienzimáticos, y los existentes en el mercado internacional son relativamente caros, lo que imposibilita su uso rutinario en la calibración de los ensayos enzimáticos. Varios materiales de referencia para múltiples enzimas se encuentran en el mercado,⁹ pero su uso también es limitado para países en vías de desarrollo.

A pesar de los esfuerzos hechos durante la década pasada, la situación actual de los laboratorios clínicos de Latinoamérica se caracteriza por un nivel insuficiente de confiabilidad en los resultados, lo que se ha observado en datos de garantía de calidad externa en 12 de los 20 países miembros de la Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica (COLABIOCLI). La falta de criterios unificados de la política de calidad y en consecuencia la falta de estandarización, hacen necesario indicar la dirección que asegure la calidad del trabajo y facilite la labor de estos laboratorios, para que proporcionen resultados que sean

clínicamente útil. Debido a la no disponibilidad de los materiales de referencia en muchos países por su alto costo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incita a la producción local de materiales de control de calidad para asegurar su disponibilidad.¹⁰ Precisamente, la no existencia de un material de referencia para las enzimas antes mencionadas en los laboratorios clínicos del territorio de Camagüey, estimuló la evaluación de un suero enriquecido con las enzimas alanina aminotransferasa (ALAT/TGP), aspartato aminotransferasa (ASAT/TGO), fosfatasa alcalina (FA) y amilasa, empleando como matriz el suero bovino. Se busca un método simple, barato y confiable que contribuya al aseguramiento de la calidad en estos laboratorios, referido específicamente a las de determinaciones enzimáticas. Por tal motivo, el presente estudio evalúa la estabilidad tanto de los extractos enzimáticos (fracciones enriquecidas), como del material de referencia en su totalidad (enzimas añadidas al suero bovino), dada la carencia de este reactivo en los laboratorios clínicos de la región y que afecta, entre otras causas, la calidad en los servicios ofertados al paciente, al no brindar resultados estandarizados que comprometen la confiabilidad de los resultados.

MÉTODOS

Especie animal utilizada

La especie seleccionada para estos estudios fueron conejos machos adultos de 6 meses de edad con un peso promedio de 2,5 kg, donados por la Unidad de Obtención de Productos Biológicos pertenecientes al Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI).

Procesamiento de las fracciones enriquecidas

Los órganos fueron extraídos de los animales previamente anestesiados y sacrificados mediante el empleo de Ketalar a 80 mg/kg de peso. Se utilizó el corazón para la obtención de TGP (ALAT) y TGO (ASAT) y el intestino delgado para la obtención de la FA. Estos órganos una vez extraídos fueron trasladados en hielo al laboratorio y homogenizados con la ayuda de una licuadora comercial en presencia de PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH = 7,1). La obtención de los extractos enriquecidos se llevó a cabo según los protocolos antes publicados.¹¹⁻¹³ Posteriormente se procedió a la adición del glicerol al 20 % y al almacenamiento a las temperaturas de 4 °C y -20 °C para los estudios de estabilidad. Se trabajó con 3 muestras (n= 3) por cada punto de medición planteado en el diseño experimental. La amilasa fue obtenida de saliva humana por secreción bucal inducida y recolectada en frasco estéril hasta la adición del glicerol.

Preparación del suero control con preservantes

Se utilizaron los preservantes comerciales propilenglicol (Imefa Mp-0-0162-EF) y etilenglicol (Koch-Light Laboratorios Ltd Cod.337.918.478080) en una concentración final en el suero del 15 %. Al suero descongelado y en reposo se le extrajo el 15 % del volumen total, el cual fue restituido por el preservante en estudio. Se procedió posteriormente a la adición de las enzimas según las concentraciones deseadas.

Estudios de estabilidad

Estabilidad a tiempo real

- Extractos enzimáticos enriquecidos:

Se estudiaron las variaciones de actividad enzimática en un lote de una fracción del extracto enzimático obtenido de corazón (TGP y TGO) y de intestino delgado (FA); se analizaron 3 muestras en cada tiempo seleccionado para su medición a los 15, 49, 77, y 105 días, según los tiempos establecido por el CECMED.^{8,10} Se ensayaron 2 temperaturas para el mantenimiento de las muestras (refrigeración y congelación) y se evaluó el efecto del glicerol en la estabilidad del producto.

- Matriz (suero control):

También se evaluó la estabilidad del suero control enriquecido con las 4 enzimas de interés en presencia de los preservantes antes mencionadas en los meses 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, indicados por el CECMED para estos estudios que se llevaron a cabo a una temperatura de 4 °C.

Métodos de determinación enzimática

a) *Determinación del marcador bioquímico TGP, TGO y FA.*

La actividad de estas enzimas en muestras de suero se determinaron por las técnicas descritas por Bermeyer¹⁴ y Vassault y otros, 1986,¹⁵ mediante el espectrofotómetro automático HITACHI 902 a 37 °C. Los resultados se expresan en unidades internacionales (UI).

b) *Determinación de AMILASA por el método de Caraway, T.*¹⁶ Para esta enzima específicamente los resultados se muestran en unidades/litro (U/L).

Análisis estadístico

Dada la normalidad de los datos, se empleó la estadística paramétrica, la prueba seleccionada fue el ANOVA y el Tukey como matriz para la comparación de medias. Cada muestra se trabajó en triplicado y para un intervalo de confianza de $p < 0,05$. Se empleó el paquete estadístico SPSS 15 para Windows del 2006. La variable dependiente seguida fue la actividad enzimática y como variables independientes se probaron: temperatura, tiempo, presencia de glicerol y otros preservantes como propilenglicol y etilenglicol para el suero bovino.

RESULTADOS

Estabilidad de las fracciones enriquecidas

Se muestra en la figura 1 las variaciones de la actividad enzimática de las fracciones enriquecidas de TGP y TGO a 4 y -20 °C en presencia o no de glicerol al

20 % en el tiempo. El extracto enzimático obtenido de corazón de conejo en presencia o no de glicerol se almacenó a 2 temperaturas (+4 °C y -20 °C) indicadas en la leyenda. Se muestran las medias con sus DE para un intervalo de confianza de $p < 0,05$ y una $n = 3$. El eje de las Y muestra los valores de actividad enzimática en unidades internacionales (UI) y el eje de las X el tiempo de experimentación.

Puede observarse cómo la presencia del glicerol al 20 % en las muestras, no influyó en la estabilidad de la enzima TGO independiente de la temperatura ensayada (fig. 1 superior), trayendo consigo una disminución de la actividad de esta enzima en el tiempo. En cambio en la figura inferior (TGP), se observa cómo el glicerol tiene un efecto protector significativo ($p = 0,031$) comparado con las muestras carentes de este producto tanto a 4 °C como a -20 °C, donde se observa una pérdida marcada de la actividad TGP a los 15 días de iniciado el experimento. Por otra parte, podemos afirmar que para esta enzima no hay cambios significativos ($p = 0,076$) en la estabilidad durante el período seleccionado (105 días) en las muestras con un 20 % de glicerol. Un resultado similar se observó cuando los experimentos se llevaron a cabo con las fracciones enriquecidas de ambas enzimas obtenidas de corazón e hígado bovino, (resultados no mostrados).

Por otra parte, se procedió a evaluar el efecto del glicerol en la enzima fosfatasa alcalina, cuyos resultados se muestran en la figura 2. Este ensayo se realizó a -20 °C. Se evidenció el efecto protector del glicerol en la actividad enzimática de la FA. El análisis estadístico reveló que existen diferencias significativas entre los valores de actividad de la enzima FA en muestras almacenadas con glicerol y muestras carentes del preservante ($p = 0,004$).

La fracción enriquecida fue obtenida a partir de intestino de conejo según el protocolo especificado en materiales y métodos. G- y G+ indican la ausencia o presencia de glicerol en las muestras, respectivamente. Se muestran las medias con sus DE para un intervalo de confianza de $p < 0,05$ y una $n = 3$. El eje de las Y muestra los valores de actividad enzimática en unidades internacionales (UI) y el eje de las X el tiempo.

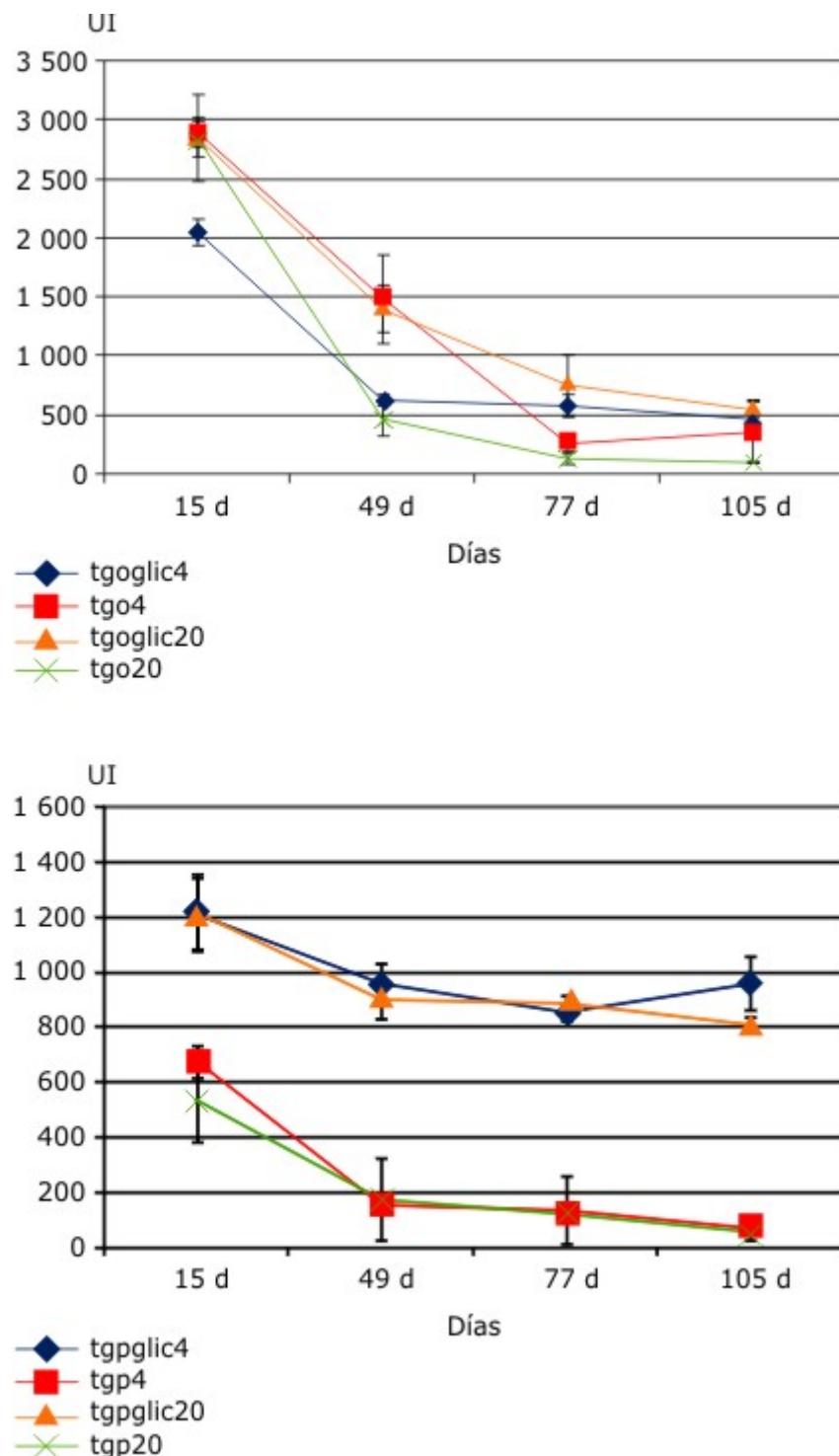


Fig. 1. Variaciones de actividad enzimática en el tiempo de las enzimas TGO (superior) y TGP (inferior).

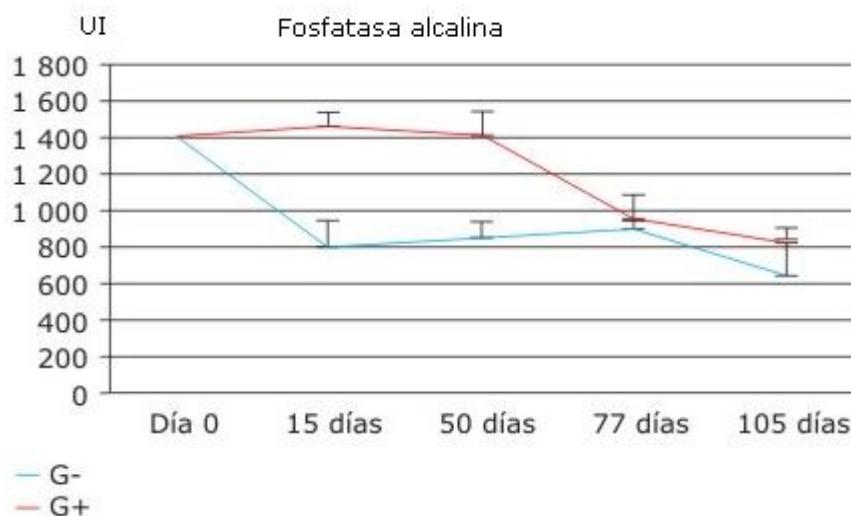


Fig. 2. Estabilidad de la enzima fosfatasa alcalina a -20 °C en presencia o no de glicerol.

El estudio estadístico arrojó que la estabilidad de esta enzima decae significativamente ($p= 0,005$) posterior a los 50 días de obtenida la fracción enriquecida de la misma, no pudiéndose emplear el extracto posterior a este tiempo para enriquecer el suero bovino.

Estabilidad a tiempo real del suero control de enzimas

Un resultado interesante se observó cuando se evaluó el empleo de los preservantes en el suero control. Primeramente los resultados de estos dependieron del tipo de enzima seleccionada; por ejemplo, para la TGP (fig. 3 superior), puede observarse que el suero control sin los 2 preservantes en estudio, presentó valores de actividad enzimática superiores a las muestras que emplearon el propilenglicol y el etilenglicol como preservos. En cambio, cuando analizamos TGO (fig. 3 inferior), no se observa una estabilidad manifiesta de la enzima en presencia o no de los preservantes estudiados. El mejor resultado se obtuvo con el polietilenglicol por un periodo de tres meses de estudio.

El experimento fue llevado a cabo a 4 °C. El eje de las Y muestra los valores de unidades internacionales (UI) y el eje de las X el tiempo del ensayo. Se emplearon los preservantes propilenglicol y etilenglicol, los cuales se comparan con el suero enriquecido carente de preservante. Se muestran las medias con sus DE para un intervalo de confianza de $p< 0,05$ y una $n= 3$.

Si se comparan los resultados de la estabilidad de ambas enzimas (TGP-TGO), se manifiesta la mayor estabilidad en el tiempo de la TGP, al no existir diferencias significativas ($p= 0,446$) entre los 12 meses ensayados. Para la TGO, la estabilidad del suero comienza a decaer significativamente ($p= 0,002$) con posterioridad a los 3 meses.

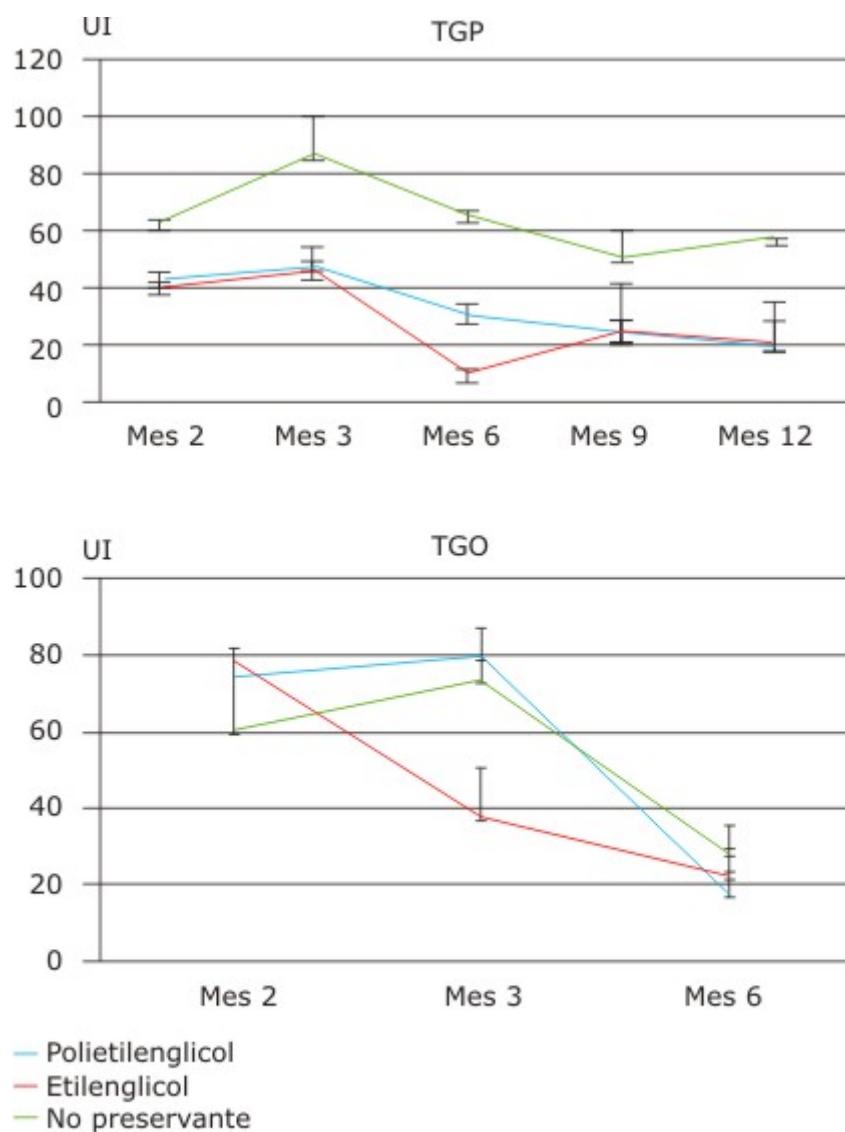


Fig. 3. Estabilidad a tiempo real del suero control para las enzimas TGP (superior) y TGO (inferior).

En el caso de la fosfatasa alcalina (FA) observada en la figura 4 superior, se evidencia una pérdida gradual de la actividad de la enzima en el tiempo, existiendo diferencias significativas a partir de los 6 meses ($p= 0,022$) en relación con el mes 1. Como puede observarse, ninguno de los preservantes ensayados causó el efecto protector esperado sobre la actividad de esta enzima. Esta misma figura muestra los resultados de la estabilidad de la amilasa. La estabilidad de esta enzima decrece significativamente ($p= 0,031$) a partir de los 3 meses, y tampoco se observa un efecto protector de los preservantes utilizados con tales fines, lo cual sugiere un tiempo inferior para el uso comercial del producto.

El experimento se llevó a cabo a 4 °C. Como en el caso anterior, se emplearon los preservantes propilenglicol y etilenglicol, los cuales se comparan con el suero enriquecido carente de preservante. Se muestran las medias con sus DE para un intervalo de confianza de $p< 0,05$ y una $n= 3$. El eje de las Y muestra los valores de actividad enzimática en unidades internacionales (UI) para la fosfatasa alcalina y

en unidades/litros (U/L) para la amilasa, el eje de las X muestra el tiempo del ensayo.

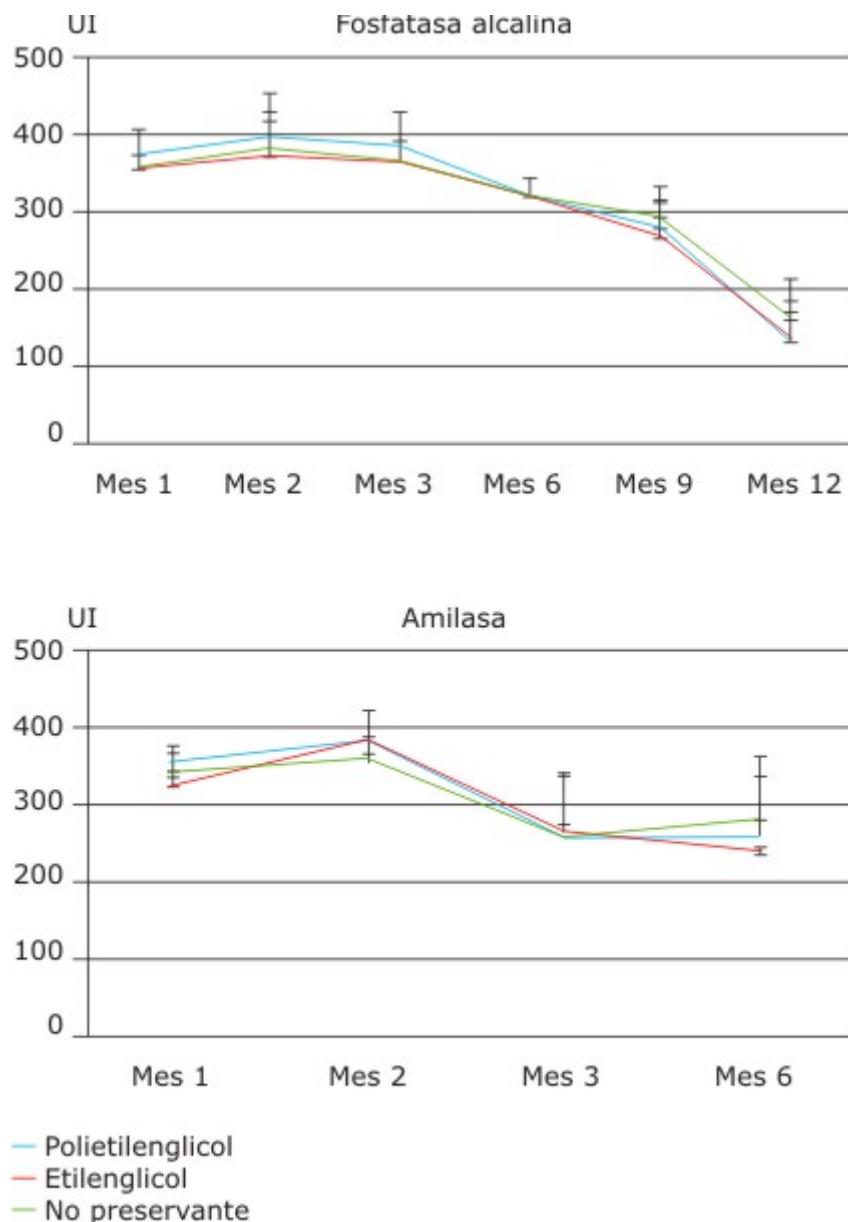


Fig. 4. Estabilidad a tiempo real de las enzimas fosfatasa alcalina (superior) y amilasa (inferior).

DISCUSIÓN

La confiabilidad en la precisión y exactitud de los resultados que brinda el laboratorio clínico en los análisis de las muestras que en él se estudian, depende de un complejo sistema que engrana múltiples factores y estrategias. La implementación del sistema de aseguramiento de la calidad (SAC) incluye aspectos

diversos y muy complejos que no son objetos de estudio en el presente trabajo. Sin embargo, pueden considerarse alternativas y decisiones con la finalidad de logar tal objetivo, entre tanto se implemente el SAC, las cuales ayuden a la obtención de resultados confiables para clínicos y pacientes. Uno de estos aspectos es trabajar en la obtención de materiales de referencias.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la estabilidad de un material de referencia para determinadas enzimas que son clínicamente importantes, por su amplio uso en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades cardíacas, pancreáticas, hepáticas y musculares, entre otras, y cuantificadas por los especialistas en los laboratorios clínicos provinciales. Por este motivo, es importante brindar un material de referencia multienzimático que presente condiciones químicas muy similares a las muestras de suero humano, donde tendrá lugar la reacción específica para cada una de estas enzimas y donde el método de purificación, la matriz, los instrumentos de medición, así como los procederes, influirán sobre la conmutabilidad del resultado.¹⁷ De esta forma los laboratorios clínicos tendrían valores estandarizados con un calibrador enzimático estable, a falta de estándares internacionales. Este sistema de referencia constituye un eslabón de una compleja estructura que asegura en parte, el proceso de calibración del método por ellos empleados. Es importante hacer énfasis en este aspecto, pues se observa en la práctica diaria, la variabilidad entre los ensayos de diferentes laboratorios,^{18,19} que en muchas ocasiones llega a ser superior al 25 %.²⁰

Actualmente existe una amplia dispersión en los valores de α -amilasa en los ensayos interlaboratorios, tal como se mostró en un estudio de vigilancia para el control de la calidad, que sugiere el uso de calibradores con valores de enzima en suero que sean independientes al método usado para el análisis. Se plantean que estos sueros deben poseer las condiciones químicas necesarias para simular estrechamente la actividad de la α -amilasa endógena presente en el suero humano (conmutabilidad), y el resultado debe ser independiente del método utilizado, la naturaleza y fuente de la enzima empleada así como de la matriz en que la enzima es disuelta.²¹

Para promover específicamente el establecimiento de sistemas medibles de referencia en la enzimología clínica que eviten lo antes expuesto, el IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) creó en 1997 un grupo de trabajo que finalizó más tarde en un Comité.²²

En la actualidad, varios grupos como el Instituto para Materiales de Referencia (IRMM) de Bélgica y el IFCC, están desarrollando un material de referencia certificado multienzimático (MECRM) para las enzimas: amilasa, ALAT, ASAT, FA, creatina quinasa, gamma glutámico transaminasa (GTT), lactato deshidrogenasa (LDH) y lipasa, que exhiben una amplia y definida conmutabilidad.²³ Por otra parte, existe una limitada cantidad de materiales de referencia o calibradores monoenzimáticos, los cuales son relativamente caros y por consiguiente no utilizados rutinariamente para calibrar ensayos enzimáticos. Por tal motivo, el trabajo en la obtención y estandarización de materiales monoenzimáticos y multienzimáticos como los que se proponen con este trabajo, podrían ser de mucha utilidad.⁹

Aquí se obtuvieron fracciones enriquecidas para varias enzimas de interés clínico con la finalidad de establecer un suero multienzimático en la provincia de Camagüey, ante la carencia de materiales de referencia internacionales. Para obtener las enzimas destinadas a enriquecer la matriz, se emplearon los protocolos de purificación originales.¹¹⁻¹³ Este procedimiento sencillo, permitió obtener fracciones enriquecidas para la TGP/ALAT, TGO/ASAT, y FA. Teniendo en cuenta la

factibilidad, sostenibilidad y aplicación del resultado, se trabajó con los extractos enzimáticos de conejo, al no existir diferencias marcadas en el rendimiento cuando se comparó con los extractos obtenidos de varios órganos de otras especies de ovinos y vacunos (resultados no mostrados). Al igual que otros trabajos publicados,²⁴ los extractos obtenidos con los protocolos antes mencionados no estaban exhaustivamente purificados, lo que llevó a la presencia de proteínas contaminantes que sugieren la pérdida de la estabilidad posiblemente debido a la degradación enzimática.

Para garantizar la estabilidad de las enzimas se emplea una amplia variedad de preservantes como el glicerol, manitol, sorbitol, polietilenglicol y trealosa, entre muchos otros.²⁵⁻²⁷

El glicerol es un preservante utilizado en la conservación de enzimas de utilidad en los laboratorios de biología molecular (endonucleasas, exonucleasas, ligasas, fosfatases, peroxidases), donde la actividad de estas enzimas permanece estable por períodos que duran entre 6 y 12 meses.²⁸

En este estudio, la adición de glicerol en los extractos enzimáticos, no causó el efecto protector esperado en 2 de las 3 enzimas ensayadas (TGP, TGO, FA). Ni la TGO ni la FA mostraron ser estables en presencia de este producto, quizás debido a que son enzimas más sensibles a los cambios de temperatura (termolábiles) que la TGP, aunque hay un trabajo que reporta la mayor estabilidad térmica de la TGO en relación con la TGP,²⁹ o quizás debido a las propiedades específicas de cada enzima ante el solvente, que puede afectar su actividad.

El resultado aquí mostrado corrobora lo antes expuesto, ya que en el caso particular de la TGP, se observaron niveles de actividad enzimática mantenidos durante los 105 días que duró el ensayo. No obstante, la caída de la actividad catalítica de las 2 restantes enzimas, impide el almacenamiento de estas fracciones para su posterior uso en el enriquecimiento de la matriz. Pudieran evaluarse otras combinaciones que incluyen otros aditivos, así como concentraciones incrementadas de glicerol, con la finalidad de mantener la estabilidad de estas enzimas.

Hay trabajos que reportan que la acción del glicerol como estabilizante de enzimas como la termolisina a altas temperaturas, mejora cuando se combina con solventes orgánicos como el n-propanol y el isopropanol.²⁵ Por otra parte, se emplean mezclas de glicerol y etilenglicol en concentraciones del 5 % para evaluar los cambios de actividad de la enzima *adenosina desaminasa* (ADA), ya que los niveles declinan con el tiempo a temperatura ambiente. Los estudios mostraron que el glicerol al 10 % en presencia de 0,10 mol/L de sulfato de sodio, mantuvo constante los niveles de ADA al menos por 10 días a 45 °C.³⁰ Hay autores que obtienen buenos resultados con el glicerol, pero empleando concentraciones del 50 %, en una enzima humana recombinante almacenada a 4 °C y -20 °C durante 30 días.²⁶

La temperatura es un importante factor a tener en cuenta en las mediciones enzimáticas, tanto para la preservación de los calibradores enzimáticos, como para la realización del ensayo, donde en este último caso la misma ha sido objeto de importantes discusiones y falta de consensos para definir la temperatura estándar a utilizar en las mediciones. Se plantea que la variabilidad de los resultados puede estar en función de la heterogeneidad de las isoenzimas presentes en la muestra, ya que estas pueden responder de forma diferente a cambios de temperatura; por otra parte muchas de las enzimas utilizadas en el control de calidad, son de origen animal,^{31,32} lo cual puede traer diferencias en los registros.

Es un hecho que los cambios de temperatura afectan de diferentes formas la actividad catalítica de las enzimas, por ejemplo, temperaturas de -196 °C (nitrógeno líquido) mantiene estable enzimas como la TGP, TGO, glutamato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, glutamil transferasa durante 10 meses; en cambio, la amilasa incrementa su actividad mientras que la creatina quinasa disminuye la misma.³³

La fosfatasa alcalina ha sido extraída de diferentes órganos y especies de mamíferos y entre los métodos que se utilizan está la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio) y el tratamiento con butanol, también empleado por nuestro equipo en la obtención de la fracción enriquecida. Dos tipos de FA se producen en mamífero, una en huesos, riñones, hígado y placenta, mientras que el otro tipo se produce en intestino.³⁴ Aunque existen muchos métodos descritos en la literatura para la purificación de la FA, la cristalización de 2 de estas enzimas aisladas de placenta y de intestino humano, fue obtenida gracias a una preparación suficientemente pura de estas,¹³ lo que es necesario con la finalidad de obtener buenos estándares. En este trabajo se obtuvo el extracto enriquecido de esta enzima a partir de intestino de conejo, ya que se ha descrito que la enzima obtenida a partir de mucosa intestinal es una de las más activas; por tal motivo se empleó el método descrito por *Morton* 1953 y citado por *Brenna* y otros en 1975.¹² No obstante, esta mostró una pérdida de la estabilidad posterior a los 50 días de la extracción. El método de obtención de este extracto constituye una forma fácil y barata de obtener una fracción enriquecida, pero no puede ser considerado como un método de purificación adecuado para tales fines, al estar presente en la muestra muchas proteínas y enzimas contaminantes, entre las que se encuentran proteasas capaces de degradar y por consiguiente, disminuir la actividad catalítica de las enzimas, entre ellas la de la fosfatasa alcalina.

Una tendencia actual es establecer los materiales de referencias con enzimas recombinantes con un alto grado de pureza, que garantizan la calidad de la preparación. Por ejemplo, existe una carencia en el mercado de materiales de referencias certificados para algunas enzimas como la lipasa; por tal motivo *Lessinger* y otros, 2003,³⁵ decidieron trabajar en 2 materiales de referencias certificados (MRC) para esta enzima: uno a partir de jugo pancreático humano (BCR693) y otro empleando la tecnología del ADN recombinante (BCR694) expresada en líneas celulares transfectadas. En ambos casos se utilizó la albumina bovina (BSA) para la estabilización de ambos materiales. La actividad catalítica fue ensayada con un *pool* de sueros provenientes de pacientes que sufrían pancreatitis, y se obtuvieron valores similares de 5kU con cada material, donde posteriormente a su liofilización, mostraron ser estables a -20 °C por varios años.

Un nuevo material de referencia para la aspartato aminotransferasa (ASAT) se desarrolló bajo el código ERM-AD457/IFCC. Este material de referencia certificado se obtuvo utilizando la enzima recombinante expresada en *Escherichia coli* en un tampón que contiene albúmina de suero bovina (BSA) en forma liofilizada. Su homogeneidad y estabilidad ha sido probada por 12 laboratorios utilizando el procedimiento de referencia para esta enzima a 37 °C.³⁶

En la literatura revisada no se encontraron estudios del efecto de los preservantes propilenglicol y etilenglicol (ensayados en este trabajo), sobre la actividad de las enzimas TGP, TGO, FA y amilasa. Los resultados aquí obtenidos evidenciaron la incapacidad de estos productos de mantener la estabilidad de la actividad enzimática en el tiempo, al no diferir significativamente de las muestras carentes de ambos preservativos. La actividad catalítica de las 4 enzimas ensayadas decayeron significativamente con posterioridad a los 3 meses de estudio a tiempo real, utilizando el suero bovino como matriz almacenado a 4 °C. Estos solventes se han utilizado mayormente en la preservación de sueros controles no enzimáticos para

los laboratorios clínicos. Un hemolisado humano que contiene etilenglicol almacenado a -20 °C, mantuvo las concentraciones constantes de hemoglobina durante 372 días; en cambio, a 4 °C la estabilidad del preparado solo fue por 15 días y descendió a 2 días cuando se mantuvo a temperatura ambiente.³⁷

Pocos trabajos reportan el empleo de estos preservantes en la estabilidad de enzimas. Es importante destacar que su acción sobre las enzimas varía, pues no todas las enzimas reaccionan de igual forma ante los solventes orgánicos. La estabilidad de una proteasa extracelular producida por *Natrialba magadii* fue ensayada en una variedad de mezclas de solventes orgánicos acuosos como son: 1.5 M NaCl y glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO), N,N-dimetilformamida, propilenglicol y dioxano; de ellos, el DMSO, propilenglicol y el glicerol mostraron efectividad al preservar la estabilidad de la enzima a concentraciones bajas de NaCl.³⁸

El proyecto alemán "Calibración 2000" evaluó la comutabilidad de materiales de armonización con criolioprotectantes obtenidos de La Fundación Alemana para la Evaluación de la Calidad en los Laboratorios Clínicos, con la intención de armonizar las mediciones de actividad enzimática. Se analizaron las concentraciones catalíticas de las enzimas fosfatasa alcalina, ASAT, ALAT, lactato deshidrogenasa, gamma glutamiltransferasa y creatina quinasa en mezclas de suero de pacientes y en material de referencia en 14 laboratorios. La actividad enzimática cayó en la línea de regresión calculada en la actividad medida en muestras de sueros. Esta pérdida de la actividad se debe según los autores, a la presencia de sacarosa en el crioprotector empleado en el material de armonización. Así, el empleo de aditivos al material de referencia puede alterar la matriz en forma tal que interfiera con el análisis en ciertos ensayos. Por tal motivo, los autores proponen utilizar matrices sin aditivos como materiales de referencia.^{35,36}

CONCLUSIONES

- Se evidenció la pérdida de la actividad enzimática de los extractos obtenidos de órganos de conejo a partir de los 15 días, donde solamente la TGP mostró ser estable en presencia de glicerol al 20 % independientemente de la temperatura por el período de tiempo estudiado (105 días), no sugiriéndose el uso de estas fracciones con la finalidad de enriquecer el suero bovino utilizado como matriz.
- Los preservantes empleados, tanto en las fracciones enriquecidas como en el suero bovino enriquecido, no brindaron el efecto protector esperado sobre la estabilidad de la actividad catalítica de las enzimas seleccionadas. Por tal motivo, el suero control de enzimas propuesto en este trabajo no presenta una estabilidad superior a los 3 meses, aspecto a tener en cuenta para su futura comercialización.

RECOMENDACIONES

Ensayar nuevos aditivos y combinaciones de estos como preservantes de la actividad catalítica de estas enzimas con la finalidad de incrementar su estabilidad en el tiempo, así como evaluar nuevos protocolos de purificación con la finalidad de incrementar la estabilidad de las enzimas en el suero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Medical laboratories particular requirements for quality and competence. En: ISO 15189, I.O.f. Standardization. Editor. Geneva; 2003.
2. Panteghini MCF, Schumann G, Siekmann L. Establishing a reference system in clinical enzymology. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39(9):795-800.
3. Rej R. Accurate enzyme activity measurements. Two decades of development in the commutability of enzyme quality control materials. *Arch Pathol Lab Med.* 1993;117:352-64.
4. Panteghini MBR, van Solinge WW. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th ed. En: Burtis CA, Bruns DE, editors. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
5. Panteghini M., Traceability, reference systems and result comparability. *Clin Biochem Rev.* 2007;28:97-104.
6. Panteghini M, Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine. *Clin Biochem.* 2009;42:236-40.
7. Vesper HWTL. Traceability in laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med.* 2009;55:1067-75.
8. Regulación número 25/00. Requerimiento de los estudios de estabilidad para el registro de productos biológicos / biotecnológicos. CECMED 2000. Disponible en: http://www.cecmed.sld.cu/Docs/RegFarm/DRA/EEstabilidad/Reg/Reg_25-00.pdf
9. Infusino ISG, Ceriotti F Panteghini M. Standardization in clinical enzymology: a challenge for the theory of metrological traceability. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(3):301-07.
10. Regulación número 19/06. Requisitos y procedimientos para la liberación de lotes de productos biológicos. CRECED 2006. Disponible en: http://www.cecmed.sld.cu/Docs/RegFarm/DRA/LibLotes/Reg/Reg_19-06.pdf
11. Doellgast GFW. Purification of human placental alkaline phosphatase. Salt effects in affinity chromatography. *Biochem J.* 1974;141:103-112.
12. Brenna OPM, Pace M, Pietta PG. Affinity-chromatography purification of alkaline phosphatase from calf intestine. *Biochem J.* 1975;151(2):2916.
13. Latner A, Hodson A. Human liver alkaline phosphatase purified by affinity chromatography, ultracentrifugation and polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem J.* 1976;159:697-705.
14. Bermeyer UH. Determination of GPT activity in blood. *Ann Biol Clin.* 1986;44:481-9.
15. Vassault A, Gafmeyer D, Naudin C, Dumont G, Bailly M, Henny J, et al. Validation de techniques de la SFBC. Protocole de validation de techniques (Document B). *Ann Biol Clin.* 1986;44:686-745.

16. Caraway T. Selected methods for the small clinical chemistry laboratory. Faulkner WR, Meites S. Vol. 9. Washington: AACC; 1982.
 17. Örnemark U, Van Nevel L, Smeyers P, Harper C, Taylor PD. The international measurement evaluation program IMEP-17. Trace and minor constituents in human serum. EUR 20694 En: Report to participants. Part 2: Methodology and quantity specifications. Disponible en:
http://www.irmm.jrc.be/html/interlaboratory_comparisons/imep/imep-7/IMEP17_report_part2
 18. Infusino IBR, Panteghini M. Traceability in clinical enzymology. Clin Biochem Rev. 2007;28(4):155-61.
 19. Lessinger JSF, Vialle A, Férand G, Myara A, Guéchot J, Imbert-Bismut F, et al. Le calibrage en enzymologie clinique: principe, conditions d'application et résultats. Anne Biol Clin 2002;60(3):281-6.
 20. Schiele GF JM, Lessinger J. Henny Harmonisation des pratiques: application à la mesure d'activités enzymatiques utilisées en prévention, dépistage, diagnostic et surveillance thérapeutique. Ann Biol Clin 2001;59(3):291-7.
 21. Gubern G, Canalas F, Gella FJ. Determination of a-amylase activity: methods, comparison and commutability study of several control materials. Clin Chem. 1995;43(4):342-6.
 22. Férand G, Imbert-Bismut F, Messous D, Piton A, Ueda S, Poynard T, et al. A reference material for traceability of aspartate aminotransferase (AST) results. Clin Chem Lab Med. 2005;43(5):549-53.
 23. Kuwa K, Umemoto M. Certified multi-enzyme reference material using recombinant enzymes for JCTLM traceability chain. Clin Chem. 2008;54(Suppl):A17980.
 24. Koedam JC, Buitenhuis S, Schmidt E, Klauke R. Production and certification of secondary enzyme reference materials (ERMs). Part 1: Preparation of the sera and some of their properties. Clin Chem. 1986;32(10):1901-5.
 25. Pazhang MKK, Ranjbar B, Hosseinkhani S. Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. J Biotechnol. 2006;127(1):45-53.
 26. Nascimento C, Lino PR, Ramos L, Almeida AJ, de Almeida IT, Leandro P. Polyol additives modulate the in vitro stability and activity of recombinant human phenylalanine hydroxylase. Appl Biochem Biotechnol. 2010;162(1):192-207.
 27. Feng S. Effects of glycerol on the compaction and stability of the wild type and mutated rabbit muscle creatine kinase. Proteins. 2008;71(2):844-54.
 28. Lavery CB, Macdonald MJ, Williams JB, Spencer CA, Burke AA, Irwin DJ, et al. Purification of peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. J Agric Food Chem. 2010;58(15):8471-6.
 29. Polonis A. Effect of a thermal factor on various biochemical indicators in the plasma of chickens. Pol Arch Weter. 1982;23(3):49-55.
-

30. Miller KD, Light RW. Stability of adenosine deaminase during transportation. *Chest*. 2004;126(6):1933-7.
31. Copeland W, Nealon DA, Rej R. Effects of temperature on measurement of alkaline phosphatase activity. *Clin Chem*. 1985;31(2):185-90.
32. Eto A, Nakano N, Chikaura Y. Multienzyme control serum (Seraclear-HE) containing human enzymes from established cell lines and other sources. Evaluation as candidate working enzyme reference material for γ -glutamyltransferase. *Clin Chem*. 1996;42(12):2008-14.
33. Jung K, Grützmann KD. Long-term stability of enzymes in human serum stored in liquid nitrogen. *Enzyme*. 1984;31(4):209-16.
34. Goldstein D, Harris H. Expression of alkaline phosphatase loci in mammalian tissues. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1980;77(5):285760.
35. Lessinger JM, Arzoglou P, Ramos P, Visvikis A, Parashou S, Calam D, et al. Preparation and characterization of reference materials for human pancreatic lipase: BCR 693 (from human pancreatic juice) and BCR 694 (recombinant). *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(2):169-76.
36. Toussaint B, Emons H, Schimmel HG, Bossert-Reuther S, Canalias F, Ceriotti F, et al. Traceability of values for catalytic activity concentration of enzymes: a certified reference material for aspartate transaminase. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(6):795-803.
37. Franzini C. Ethylene glycol-stabilized haemolysates as control material in haemoglobinometry. *Clin Chim Acta*. 1983;135(2):175-9.
38. Ruiz D, De Castr, RE. Effect of organic solvents on the activity and stability of an extracellular protease secreted by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2007;34(2):111-5.

Recibido: 30 de marzo del 2012.

Aprobado: 1 de junio del 2012.

Dr.Cs. Oscar Hernández Betancourt. Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI). Universidad de Ciencias Médicas "Carlos J. Finlay". CP 70100. Apartado 150. Camagüey, Cuba. Teléfono: 53-32-293321. Correo electrónico: ohdez@infomed.sld.cu