

## Pueden manufacturarse "Standards" para Enzimas?

*Arthur L. Babson Ph. D. - Warner-Lambert Pharmaceutical Co.  
General-Diagnostics División - Morris Plains, N.J.*

¿Pueden manufacturarse "standards" para enzimas? Obviamente, yo creo que la respuesta es sí; de lo contrario, no me encontraría acá. Cuando empecé a trabajar para Warner-Lambert en 1954, mi primer proyecto fue el Standard enzimático. Aunque convencido de la necesidad de un suero para análisis clínicos, muy pronto llegué a la conclusión de que era más urgente la producción de un standard enzimático. En 1955, antes que nuestro standard enzimático o cualquier otro suero "standard" estuviera disponible comercialmente, empecé mi trabajo en lo que en esa época se llamó "Suero Enzimático Standard". Me embarqué en este proyecto con ciertas reservas. Comprendí que aún siendo capaces de estabilizar varias enzimas en una base de suero humano, los problemas de su estandarización serían difíciles.

Pasaron varios años antes de que Versatol-E fuera lanzado al mercado en 1962. Aunque estábamos seguros de haber producido el mejor "standard" posible en esa época, comprendimos que el mismo nunca podría ser considerado un standard primario, en el mismo sentido en que Versatol lo es. Pero, es Versatol un standard? o puede considerarse como tal? Qué es en realidad un standard?

En 1967 The Council of the American Association of Clinical Chemists acuerdo que:

"1. La palabra "standard" significa (en el sentido químico analítico aceptado) materiales que son bien caracterizados, estables y de una pureza muy alta. La clasificación sugerida por Radin define y distingue satisfactoriamente entre: (1) "standards" primarios y secundarios; y (2) muestras de referencia o derivados biológicos para control analítico.

"2. La publicidad que se hace a muestras de referencia y/o materiales derivados biológicamente para control analítico "como standards", es una práctica aceptable en las revistas de la American Association of Clinical Chemistry".

Según Radin (Aquí voy a citar lo que él dijo en su artículo titulado "Qué es un standard?") Standards son preparaciones comerciales liofilizadas que al reconstituirse simulan al suero.

El suero de laboratorio y el conjunto de los sueros alícuotas preparados comercialmente, cumplen con la definición de un suero de referencia o muestra de referencia".

Según esta clasificación, los sueros comerciales no pueden ser utilizados como "standards" ni son me-

jores que los "pools" de un laboratorio.

Debemos anotar que Radin y el Comité de standards llegaron a esta conclusión, basándose no en resultados concretos, sino solamente en determinaciones teóricas y sin consultar ninguna casa comercial experimentada en la elaboración de sueros standards. Por consiguiente, estoy muy agradecido por la invitación que se me hizo para hablar en este Simposio y así poder presentar un punto de vista diferente sobre estandarización.

En su artículo Radin trata de diferenciar entre standards primarios, soluciones standards primarias, soluciones secundarias, soluciones clínicas standards primarias, soluciones clínicas standards secundarias y muestras de referencia. Los standards primarios son sustancias bien definidas y de una alta pureza. Los standards secundarios son analizados contra un standard primario.

En realidad, el término "standard" tiene dos significados completamente diferentes, que Radin parece haber confundido. Uno se refiere al que se ha determinado por autoridad, como regla, para la medida de cualquier cantidad, y el otro se refiere, en un sentido operacional, a una cantidad de referencia. Por ejemplo, el standard de longitud es el metro, definido como 1,650,763.73 ondas luz anaranjada-roja emitidas por átomos excitados del isótopo krep-tón con masa 86. Pero nadie usa krep-tón como medida de longitud;

se usa un metro y seguramente el metro puede estar muy lejos de lo que es un standard autoritativo, y por consiguiente, según la definición de Radin, no sería ni siquiera un standard secundario, pero hace un buen trabajo.

Un ejemplo de esta confusión se encuentra en el caso de la Bilirrubina, la cual según Radin es un standard primario disponible para los laboratorios clínicos en virtud de la recomendación unánime de un Comité compuesto por Representantes de la Academia Americana de Pediatría del Colegio de Patólogos, la Asociación Americana de Química Clínica y el Instituto Nacional de Salud. El reporte del Comité fue publicado en *Clinical Chemistry* y contradice los argumentos de Radin en dos importantes aspectos:

1. Define "Bilirrubina aceptable" con base a un ensayo, por Eje.: determinación fotométrica de absorbancia.
2. Recomienda suero como el diluyente ideal.

El reporte del comité dice:

"En vista de las observaciones frecuentemente reportadas de que las proteínas séricas pueden afectar la absorción de la bilirrubina y azobilirrubina, y de la conveniencia de calibrar los procedimientos de ensayo bajo condiciones lo más similarmente posibles a las de la muestra analizada; el Comité recomienda que las soluciones standard para el ensayo de

bilirrubina en suero sean hechas en un medio acuoso de proteínas. Para la preparación y dilución de soluciones standard, la elección obviamente se hará entre el uso de soluciones buffer de proteínas en sueros artificiales y el uso de un suero pool. Aunque ambos tienen sus desventajas, el último fue escogido por su fácil disponibilidad y probable superioridad".

El reporte sigue dando direcciones para pesar "bilirrubina aceptable" disolviendo ésta en solución de carbonato de sodio y diluyéndola con suero pool de bajo contenido en bilirrubina. En otras palabras, están recomendando que el laboratorio prepare un lote pequeño de Versatol Pediátrico.

En vista de la declaración del Comité sobre la conveniencia de calibrar los procedimientos de ensayo, bajo las mismas condiciones que la muestra analizada, parece inconsistente limitar este método solamente a la bilirrubina. Radin concede algunas ventajas a las preparaciones comerciales, pero no admite considerarlas como standards, el dice:

"En casos tales como el del reporte de Bilirrubina del Comité, en el cual se recomendó que los "standards primarios deberían ser disueltos en sueros de ciertas especificaciones, es probable que preparaciones liofilizadas de este tipo sean más estables que las preparaciones hechas y congeladas en casa. Basados en las definiciones de este documento, un standard primario clínico de una prepara-

ción de Bilirrubina en un medio de albumina de una pureza aceptable, puede llamarse solución standard primaria clínica. Si ésta se pesa dentro de un diluyente de suero, ya no es una solución standard primaria clínica; simplemente es una muestra de referencia".

La opinión de que las preparaciones séricas no pueden usarse como standards, no es compartida por todas las autoridades. Henry en su libro "Química Clínica; Principios y Técnicas", dice lo siguiente acerca de la standarización:

"Siempre que un laboratorio establezca un método determinado es inconcebible encontrar justificaciones para no estandarizar las pruebas, siempre que sea posible. No obstante fotómetros precalibrados reciben amplia publicidad y son usados generalmente con la implicación de que los ensayos no necesitan ser estandarizados por el comprador. Esta práctica se debe condenar severamente. Para determinaciones de rutina deben hacerse standards con cada serie de determinaciones, o por lo menos una vez al día. Es la opinión del autor que la falla en no estandarizar las determinaciones adecuadas y frecuentemente, es el factor que más frecuentemente determina que los trabajos ejecutados sean de baja calidad".

Hay tres tipos de "standards" disponibles para el analista:

1. *El standard puro* consistente en una solución de la sustancia de

reconocida pureza. Las ventajas de este tipo de standard son: que la pureza es generalmente conocida con exactitud y (con pocas excepciones, tal como con enzimas) estos standards están disponibles en cualquier momento.

No obstante, existe un peligro y es que, sustancias que están normalmente presentes en los desconocidos y que pueden alterar la medida, no están presentes en un standard puro. Además, los standards acuosos, como si fueran filtrados de sangre libres de proteína, omite los reactivos empleados para preparar los filtrados de proteínas de los desconocidos.

2. *Analizar Standards Internos* añadiendo una cantidad conocida de "standard" puro al desconocido. Esto es poco empleado en análisis de rutina. Su principal uso se encuentra en la investigación de algunas sustancias que pueden estar presentes interfiriendo con los análisis, y en la determinación del porcentaje de recuperación de aquellos métodos en los que los procesos tales como extracción, cromatográfica, etc., están incluidos.
3. (*Pool*) Esta puede ser el suero pool, plasma u orina. La ventaja de este tipo es que es una muestra similar al desconocido, en muchos aspectos, y puede ser analizada a través del procedimiento completo. Varios proveedores comerciales han puesto a dispo-

sición de laboratorios suero liofilizado con resultados dados para un número de análisis. Deberá recordarse que estos son los "standards secundarios", ya que los normales anotados para las diferentes sustancias, han sido determinados por otros laboratorios actuando como árbitros.

Versatol-E llena los requisitos de un "standard" secundario. Yo trataré de mostrar que este es un standard enzimático, tan bueno como el mejor que se puede preparar hoy. Pero primero quiero tratar todo el problema de estandarización que aplica a los ensayos enzimáticos. En esta discusión estoy usando "standard" en el sentido operacional.

Yo creo que todos estamos de acuerdo en que el estado de análisis clínico en enzimología es hoy en día, muy malo. Pero me pregunto, es esto debido a los standards enzimáticos que poseemos o independientemente de ellos? Me inclino hacia la última conclusión. Yo creo que es muy importante que en la confusión de las definiciones, no perdamos de vista nuestros objetivos en enzimología clínica. El objetivo como en todos los análisis, debe ser el de dar a un médico la información necesaria y correcta sobre un paciente. Para que un análisis sea útil no necesariamente tiene que ser exacto. Para dar un ejemplo, un error de 5% invalidaría completamente una determinación de sodio, pero el mismo error sería muy tolerable y hasta envidiable en la mayoría de los ensayos enzi-

máticos. Es tolerable porque niveles séricos de enzimas, que no están sujetas a procesos normales de homeostasis varían mucho en estados patológicos. Puede ser envidiable porque un grado alto de precisión no es posible en ensayos enzimáticos. Y no es posible porque en ensayos enzimáticos uno no mide una sustancia, sino una actividad biológica. Esta actividad puede ser influenciada profundamente por alteraciones pequeñas en las condiciones del ensayo. Para empeorar las cosas, si isoenzimas están incluídas y por regla lo están, el ensayo viene a ser una medida de la suma de diferentes actividades biológicas. Creer que bajo estas condiciones el ensayo es muy exacto sería tanto como engañarnos a nosotros mismos, pero esto no quiere decir que no tengamos que hacer todo lo posible para hacer que un ensayo resulte lo más exacto posible.

Para mostrar a ustedes como se puede lograr esto, podemos considerar las alternativas disponibles para estandarización de enzimas y las ventajas de cada una.

Un ensayo enzimático generalizado puede incluir los tres pasos siguientes:

- (1) Substrato (C) *Enzima* (E)  
Producto (D)
- (2) Producto + Reactivos  
Color (B)
- (3) Color + fotómetro  
Lectura (A)

En algunos ensayos enzimáticos, en donde el producto del ensayo en-

zimático es coloreado, nosotros omitimos el segundo paso. Otros requieren pasos adicionales como precipitación de proteínas. Pero este esquema puede servir para ilustrar las alternativas disponibles. La determinación cuantitativa de enzima (E) se puede hacer por medio de estandarización por comparación con una referencia conocida. ¿Qué incluye cada paso?

Estandarización en el punto (A) requiere el uso de un fotómetro precalibrado, una práctica condenada por Henry y todos los que se preocupan por el control de errores de Laboratorio. A decir verdad, eso no es estandarización porque no corrige ninguno de los errores sistemáticos en los tres pasos. No obstante, esta práctica es más generalizada de lo que uno cree. Todos los llamados ensayos espectrofotométricos que miden la oxidación de NADH o la reducción de NAD están basados en el uso de espectrofotómetros precalibrados en los cuales la unidad de actividad se define en términos de un cambio de absorción por minuto. El que estos procedimientos funcionen, tenemos que atribuirlo al hecho de que la mayoría de los espectrofotómetros ultravioletas son instrumentos de precisión que emplean cubetas de cuarzo con tolerancias dimensionales muy pequeñas.

Estandarización en el punto B, usando una solución "standard" de la sustancia coloreada que se mide, corrige cualquier variación en el instrumento. Esto es particularmente importante cuando se usan coloríme-

tros de bajo costo. Sin embargo, estandarización con la sustancia coloreada final no da ningún control sobre las variantes que se puedan encontrar en las reacciones enzimáticas o químicas que deben preceder a la aparición del color. Después de la confirmación de la calibración de la onda y la linealidad del colorímetro, estandarización con el color final no da mucha más seguridad que la estandarización con la lectura del colorímetro.

Varios ensayos enzimáticos tales como los procedimientos de la amilasa amiloclástica y el método de la dinitrofenilazina para dehidrogenasa láctica, con estandarizados basándose en el sustrato (C) que permanece intacto después de incubación con la enzima. En este caso, es el sustrato más que el producto, el responsable del color final que se mide. Estos procedimientos se deben evitar en lo posible. Todos requieren una concentración subóptima de sustrato porque es la desaparición del sustrato y no la aparición del producto, lo que nos indica la actividad enzimática. Esto generalmente resulta en una desviación muy grande de cinéticas lineales, convirtiéndose la estandarización en algo muy arbitrario.

La mayoría de los ensayos enzimáticos son estandarizados basándose en la cantidad de producto (D) formado bajo condiciones específicas. Esto tiene la ventaja que cualquier deficiencia se hará aparente en los reactivos que se usen en las reacciones químicas subsiguientes. Entonces, por ejemplo en un ensayo Bodansky para fosfa-

tasa alcalina, cualquier deterioración en el reactivo de reducción se refleja en una disminución de absorbencia del standard de fosfato inorgánico. Por otro lado, un cambio en el pH del sustrato o de la temperatura del "baño de maría" tendrá un efecto marcado en la actividad enzimática, pero no tiene ningún efecto sobre el standard del fosfato inorgánico. Nada se gana si uno pesa fosfato de potasio monobásico anhidro puro y lo disuelve en un volumen exactamente medido, si el pH del sustrato es tan inestable, como lo es en este ejemplo, que su sola exposición al CO<sub>2</sub> atmosférico puede producir una reducción marcada en la actividad enzimática.

Es aquí en donde los standards enzimáticos, que simulan las propiedades de la muestra desconocida ofrecen las mayores ventajas. Al hacerse cada paso del ensayo enzimático de manera idéntica a la del suero desconocido, automáticamente se compensa cualquier cambio no intencional en la técnica, reactivos o condiciones del ensayo.

En otras palabras, los standards enzimáticos pueden esencialmente eliminar los errores sistemáticos de un análisis; Radín advierte contra su uso porque, mientras que admite que los "standards" corrigen errores sistemáticos, anota que no pueden corregir errores casuales. Lo que él no dice es que los llamados "standards" primarios no pueden corregir ni los errores sistemáticos ni los casuales. Nada puede eliminar los errores casuales, excepto una buena técnica. Pero la razón por la cual los ensayos enzimáticos son tan difíciles, no es porque

ellos requieran técnicas especializadas. En efecto, las manipulaciones de la mayoría de los procedimientos son extremadamente simples. Los ensayos enzimáticos son difíciles porque son muy sensitivos a pequeños cambios en el pH o composición del reactivo, lo mismo que a variaciones en temperatura, tiempo de incubación, inhibidores y activadores que son de poca o ninguna importancia en un análisis químico. Entonces pueden apreciar que son errores sistemáticos los que causan el problema.

Con esto volvemos a al pregunta original: ¿Podemos manufacturar "standards" para enzimas? Y en caso afirmativo, ¿Cómo se hacen? Pero aún más importante, una vez fabricadas, ¿cómo se puede establecer la actividad enzimáticas? La mejor manera de contestar estas preguntas sería haciendo una descripción de cómo hacemos o fabricamos nuestro standard enzimático. Yo deseo puntualizar que la descripción que voy a hacer es la de cómo se hace nuestro standard enzimático hoy en día. Como ustedes pueden comprender, este producto no salió del laboratorio de un día para otro, con las óptimas condiciones que hoy posee. El producto de hoy es la culminación de 13 años de experiencia en investigación, en producción y en control de calidad. Nosotros creemos que hoy por hoy es el mejor standard enzimático que se puede fabricar. En el futuro, será todavía mejor.

Para hacer un lote de Versatol-E o Versatol-EN nosotros comenzamos

con más de 300 litros de plasma humano. Esta enorme cantidad tiene tres implicaciones importantísimas para el producto: 1) Representa una reunión de unos 1.500 dadores de sangre normal y por consiguiente es un material de comienzo muy uniforme. 2) Cualquier aditivo que pesemos y que adicionemos a este lote lo hacemos en escala macro, donde las medidas son las más exactas. Esto es especialmente importante para las enzimas cristalinas que aún para lotes muy grandes, se adicionan en cantidades muy grandes. 3) Los costos de control de calidad para un lote de Versatol-E o Versatol-EN son muy elevados e independientes del tamaño del lote. Sólo con lotes verdaderamente grandes se justifican tales costos.

Enseguida, tratamos este plasma con un proceso en el que incluye la extracción del Fibrinógeno, diálisis, calentamiento con un pH y concentración iónica controlados, filtración y adición de sales y compuestos orgánicos. Una porción pequeña de este lote que se asemeja en esta etapa al Versatol se envasa y se liofiliza. Estos frascos se usarán para determinar el nivel residual, si lo hay, de las enzimas en el material básico. Luego enzimas purificadas de actividad conocida se pesan y se adicionan al resto del lote, con lo cual se llenan los frascos que luego se liofilizan.

Antes de explicar cómo se estandarizan los frascos liofilizados, deseo decir unas pocas palabras sobre las enzimas purificadas. El mayor problema que encontramos al desarrollar

el Versatol-E fue la obtención de las enzimas satisfactorias para el producto. Para que una enzima sea satisfactoria debe llenar tres requisitos:

- 1) Debe ser suficientemente pura, pero sí libre de activadores, inhibidores y otras impurezas que pueden interferir con las actividades enzimáticas.
- 2) Cinéticamente la enzima debe comportarse en forma similar a una enzima sérica, bajo iguales condiciones de ensayo. Debe tener el mismo pH óptimo y las mismas afinidades del sustrato. Este es un objetivo al que solamente podemos aproximarnos en muchos casos. Con enzimas como la fosfatasa alcalina y la dehidrogenasa láctica, en donde se incluyen isoenzimas, ningún standard enzimático puede simular todos los sueros de pacientes. Ni tampoco es necesario, siempre y cuando que el standard enzimático se estandarice por el mismo método que el suero del paciente.
- 3) Las enzimas usadas en el standard deben ser estables en estado seco y tan estables como las enzimas séricas correspondientes.

Cuando empezamos a desarrollar el Versatol-E prácticamente ninguna de las enzimas purificadas disponibles llenaba estos 3 requisitos por lo tanto, nos vimos obligados a preparar la nuestra. Y todavía lo hacemos para la mayoría de las enzimas, pero desde entonces hemos sustituido dos enzimas cristalinas por dos que están

disponibles comercialmente. Fuimos criticados en el pasado por no publicar la fuente de donde obteníamos nuestras enzimas. Nuestra renuencia se basó únicamente en que esa fuente de enzimas fue una de las grandes ventajas que presentaba Versatol-E sobre la competencia, la que además no estaba protegida por patente alguna. Todavía creemos que esta información es de gran beneficio comercial para nuestros competidores, pero para demostrar nuestros sinceros deseos de cooperar con cualquier persona dedicada, como nosotros, al desarrollo de la enzimología clínica, vamos a hacer esta información pública.

La fosfatasa ácida es fosfatasa ácida prostática humana, y nosotros mismos la preparamos. La fosfatasa alcalina, es purificada de riñones de ganado vacuno. También la preparamos nosotros mismos. La amilasa, es amilasa pancreática cristalina de cerdo, la cual conseguimos comercialmente. La transaminasa oxalacetoglúamica es purificada por nosotros del corazón de cerdo. La dehidrogenasa láctica es una enzima cristalina del corazón vacuno, que se obtiene comercialmente. La lipasa, es pancreática de cerdo la cual nosotros preparamos. Estas enzimas purificadas son estandarizadas rigurosamente por los métodos que se usarán más tarde con Versatol-E.

Regresando a la producción de nuestro standard enzimático, una vez que los viales son liofilizados, los va-

lores para las diferentes enzimas deben establecerse. Obvio, cuando la cantidad que debemos determinar es una actividad biológica, el valor depende de un ensayo. Pero con nuestro standard enzimático\*, al contrario de lo que ocurre con un suero pool, por ejemplo: nosotros tenemos varios métodos independientes para aproximarnos más al valor real. Nosotros tenemos una actividad de base baja y hemos establecido valores de actividad para las enzimas purificadas, los cuales son determinados en enzimas a concentraciones óptimas, para cada ensayo, en ausencia de activadores o inhibidores. El conocimiento de la actividad base y de la actividad de la enzima purificada, nos permite calcular con anticipación la actividad total de cada enzima. El ensayo final debe confirmar el valor calculado, dentro de la reproductibilidad establecida del método para asegurar que la enzima no ha sido alterada durante su elaboración y que la base del suero no ha contribuido con ningún inhibidor. Finalmente, para aquellas enzimas que, como la fosfatasa alcalina, son estandarizadas por varios métodos nosotros tenemos las relaciones conocidas dentro de los mismos, las cuales se han establecido a través de muchos lotes de Versatol-E.

\* Versatol-E.

Todos los factores anteriores deben ser considerados para determinar la cifra de cualquier actividad enzimática. Cada lote es ensayado repetidamente por diferentes analistas, por un determinado período de tiempo. Cada vez que un lote de prueba

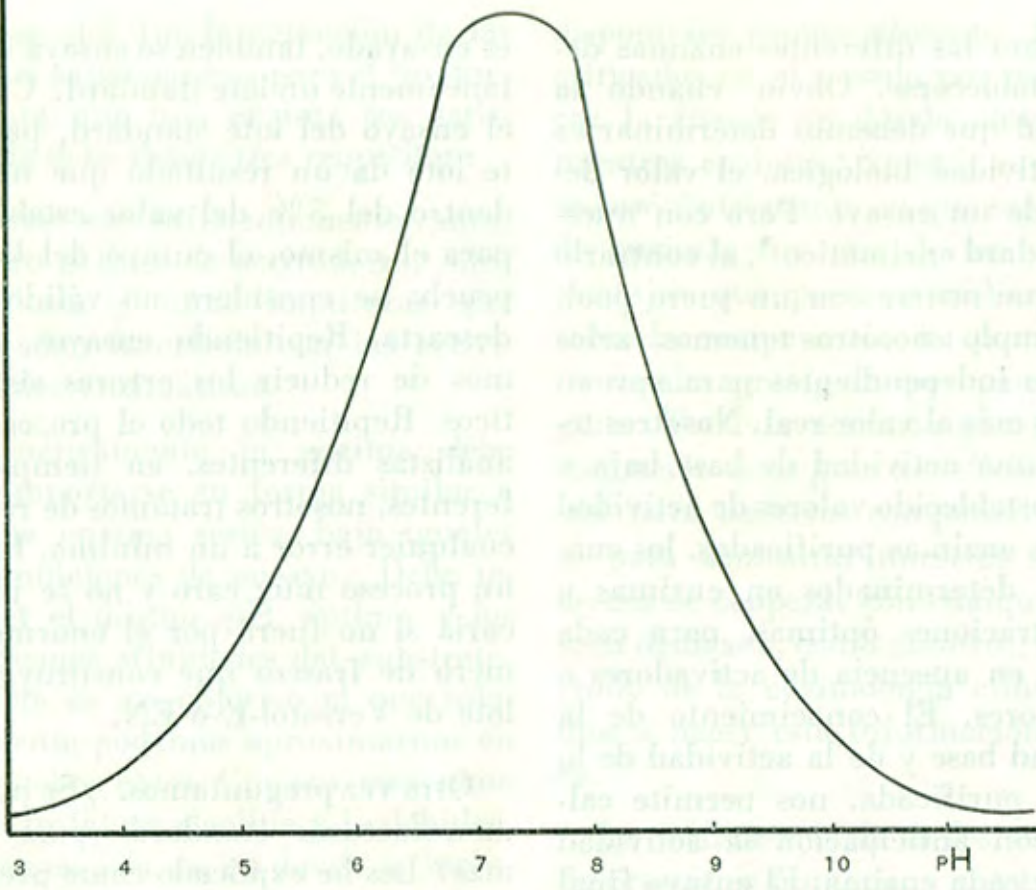
es ensayado, también se ensaya simultáneamente un lote standard. Cuando el ensayo del lote standard, para este lote da un resultado que no está dentro del 5% del valor establecido para el mismo, el ensayo del lote de prueba se considera no válido y se descarta. Repitiendo ensayos, tratamos de reducir los errores sistemáticos. Repitiendo todo el proceso con analistas diferentes, en tiempos diferentes, nosotros tratamos de reducir cualquier error a un mínimo. Este es un proceso muy caro y no se justificaría si no fuera por el enorme número de frascos que constituyen un lote de Versatol-E o EN.

Otra vez preguntamos. ¿Se pueden manufacturar standards para enzimas? Les he explicado como preparamos nuestro standard enzimático y si alguien puede decirme una manera mejor, me encantaría saberla. Todavía creo que es un "Standard Enzimático de Suero", pero si ustedes prefieren llamarlo "control de referencia para calibración", en lugar de "Standard Enzimático", también estoy de acuerdo con Uds. A mi me importa más como se usa, que como se llame y a mi me importa más la calidad del análisis enzimático, que las definiciones. Estoy convencido que se harán análisis enzimáticos más precisos por medio de estandarizaciones contra muestra de referencia enzimática. Y con eso estamos cumpliendo con nuestra obligación para con el paciente, cuyo bienestar es la única razón para estar aquí reunidos.

° Versatol-E EN.

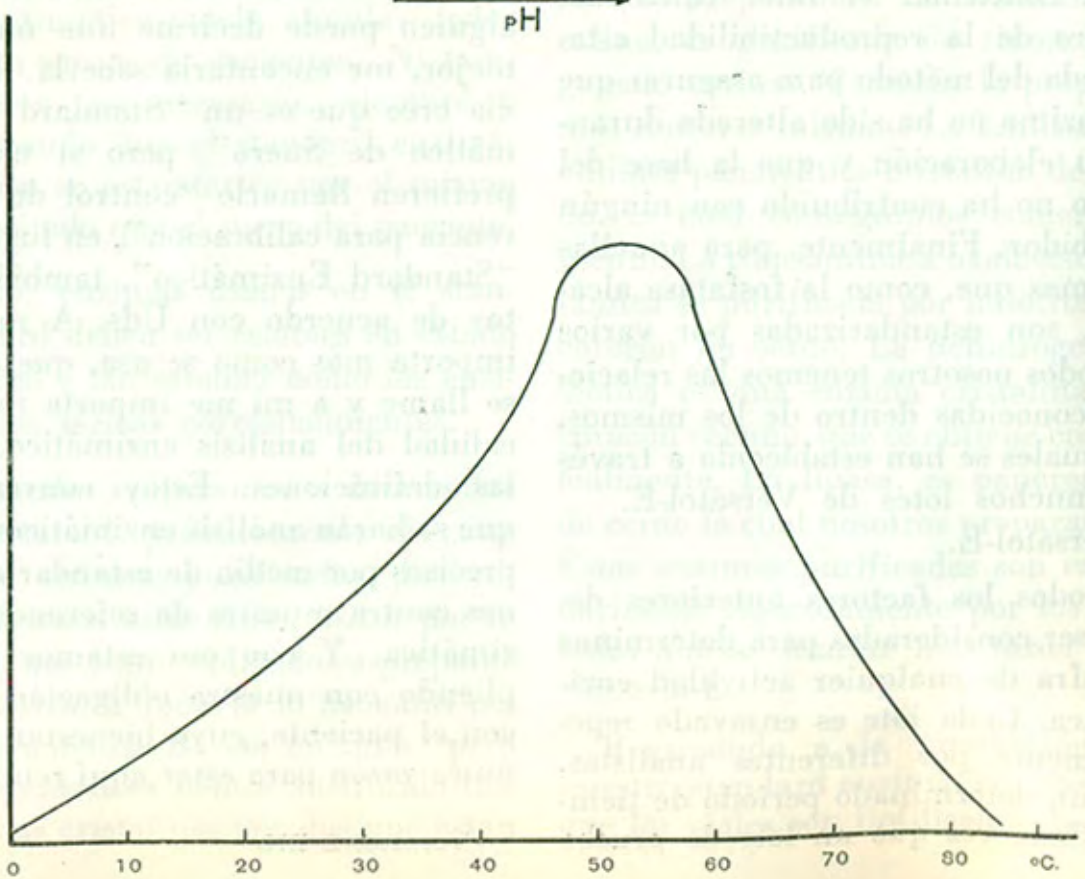
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA



pH

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA



- VERSATOL* Es un standard en suero normal para 14 constituyentes.
- VERSATOL-A* Es un standard en suero ANORMAL para 16 constituyentes.
- VERSATOL-A ALTERNATE* Es el standard en suero alternado para 16 constituyentes.
- VERSATOL ACID-BASE* Es una referencia de calibración y control en suero humano para determinaciones de pH, CO<sub>2</sub> y Pco<sub>2</sub>.
- VERSATOL E-N* Es un standard de referencia en suero para 6 enzimas de suero en el rango normal.
- VERSATOL-E* Es un standard de referencia en suero para 6 enzimas de suero en el rango ANORMAL.
- VERSATOL PEDIATRIC* Es un standard de referencia en suero para suero de infantes.