

Evaluación de un inmunoanálisis rápido de cuantificación de troponina I cardiaca en el diagnóstico de infarto agudo del miocardio

D. Mainet González¹, L. Sorell Gómez^{1,2}, D. Pichardo Díaz¹, O. Reyes Acosta¹, M.B. Torres Cabrera³, A. Abdo Cuza⁴, R. Castellano Gutiérrez⁴ y N. Padrón Brito⁵

Resumen

La troponina I cardiaca es considerada el marcador bioquímico de elección para el infarto agudo del miocardio debido a su alta cardioespecificidad. Se describe la obtención de 21 anticuerpos monoclonales que reconocieron varios epítomos de la troponina I cardiaca libre y formando complejo con la troponina T y la troponina C. Se logró estandarizar un enzimoimmunoanálisis con una duración de menos de una hora para la cuantificación de troponina I cardiaca en plasma. Se evaluaron las características metrologías del método como son: coeficiente interserial e intraserial menor de un 10%, un límite de detección de 0,1 µg/L, una exactitud con un porcentaje de recuperación entre 90-110 y la ausencia de reactividad cruzada con la troponina I esquelética. La evaluación retrospectiva de esta magnitud bioquímica en donantes sanos, pacientes con angina inestable, pacientes con insuficiencia renal y pacientes con daño de músculo esquelético arrojó un 100% de especificidad diagnóstica y en pacientes con infarto agudo del miocardio, una sensibilidad diagnóstica de 100% en el período de 24 a 48 horas y de 98,2 % desde las 6 a 48 horas de inicio del dolor en el pecho. Por lo que, este método cumple con las recomendaciones sugeridas por el comité internacional de estandarización de este marcador bioquímico para la utilización en salas de cuidados coronarios.

Palabras claves: troponina I cardiaca, anticuerpos monoclonales, enzimoimmunoanálisis, infarto agudo del miocardio.

Summary. Evaluation of a rapid immunoassay for the quantification of cardiac troponin I in the diagnosis of acute myocardial infarction

Cardiac troponin I is considered the biochemical marker of choice in acute myocardial infarction due to its high cardioespecificity. Twenty one monoclonal antibodies were obtained that recognized several epitopes of the cardiac troponin I in the free form and forming complexes with troponin T and troponin C. We were able to standardize an immunoassay with a duration of less than one hour for the quantification of cardiac troponin I in plasma. The following parameters of the immunoassay were evaluated: inter-assay and intra-assay coefficients were smaller than 10%, limit of detection of 0.1 µg/L, (as percent recovery) accuracy between 90% - 110% and absence of cross reactivity with the skeletal troponin I. The clinical specificity was 100% in the retrospective evaluation of this biochemical marker in healthy donors, patients with unstable angina, patients with chronic renal failure and patients with skeletal muscle damage. The clinical sensitivity was 100% from 24 to 48 hours and 98,2% from 6 to 48 hours from the onset of chest pain in patients with acute myocardial infarction. For these reasons, this immunoassay fulfills the recommendations suggested by the international committee of standardization of this biochemical marker for the use in coronary cares units.

Key words: cardiac troponin I, monoclonal antibodies, ELISA, acute myocardial infarction.

INTRODUCCIÓN

El infarto agudo del miocardio es la primera causa de muerte en Cuba y en muchos países del mundo. En Cuba produce más de 10.000 muertes en un año con una tasa relativa de 0,19 % (1). El diagnóstico definitivo del infarto agudo del miocardio se basa en presentar al menos 2 de los tres criterios de la Organización Mundial de la Salud: la historia clínica de dolor en el pecho, electrocardiograma patológico, y elevación de marcadores bioquímicos (2). El electrocardiograma sólo aporta aproximadamente un 75% de exactitud en el diagnóstico del infarto agudo del miocardio en la evaluación de los pacientes con dolor en el pecho que acuden a los servicios de urgencia (3). La sensibilidad y la especificidad del electrocar-

diograma son solamente un 70-80% en pequeños infartos de onda Q y onda no Q (4). En estos casos los marcadores bioquímicos ayudarían al diagnóstico de esta enfermedad, entre ellos tenemos: la creatina cinasa (EC 2.7.3.2) y la isoenzima 2 (MB) de la creatina cinasa, la mioglobina, la proteína de unión de ácidos grasos; la isoenzima BB fosforilasa-cinasa (EC 2.4.1.1), la L-lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), aspartato aminotransferasa o (EC 2.6.1.1), la troponina I cardiaca y la troponina T cardiaca. La troponina I cardiaca es considerada el marcador bioquímico de elección para el infarto agudo del miocardio (5) debido a su alta cardioespecificidad, inclusive mayor que la troponina T cardiaca, que se ha informado estar moderadamente aumentada en pacientes con insuficiencia renal crónica sin un síndrome coronario agudo (6).

Los marcadores bioquímicos no son necesarios cuando el diagnóstico clínico de daño miocárdico es inequívoco, pero sí en los casos de diagnóstico de reinfarcto, estimar el tamaño del infarto, y en el seguimiento de la terapia trombolítica. Además pueden tener aplicaciones en otras enfermedades en la cual se sospecha un daño miocárdico como son: en

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Ciudad de la Habana, Cuba.

²Instituto de Angiología y Cirugía Cardiovascular, Ciudad de La Habana, Cuba.

³Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular Ciudad de La Habana, Cuba.

⁴Hospital CIMEQ, Ciudad de La Habana, Cuba.

⁵Hospital Hermanos Ameijeiras, Ciudad de La Habana, Cuba.

el seguimiento del daño miocárdico en el postoperatorio (7), en la selección de los donantes y en la predicción del riesgo de rechazo de injerto en trasplante del corazón, en el estudio de drogas cardiotoxicas, en la disfunción ventricular derecha en los pacientes con embolismo pulmonar, en las quemaduras, en el fallo ventricular izquierdo de la sepsis (8) y en las miocarditis.

La troponina I cardiaca (masa molecular 24.000) conjuntamente con la troponina T cardiaca (masa molecular 39.000) y la troponina C (masa molecular 17.000) forman el complejo de troponina que participa en la regulación de la contracción muscular del corazón. Existen 3 isoformas de la troponina I: la troponina I cardiaca, la troponina I esquelética rápida y la troponina I esquelética lenta. La troponina I cardiaca se encuentra en equilibrio de tres especies moleculares dentro del miocito cardiaco: una de ellas es formando complejo binario con la troponina C, con la cual tiene una alta afinidad (10^8 L/mol); otra es unida con la troponina T y la C formando el complejo terciario y la tercera es aquella que no está unida a ninguna molécula o forma libre. Las 3 formas moleculares de la troponina I cardiaca son liberadas en ese mismo orden en cantidades importantes hacia la circulación sanguínea después del daño celular (9). La troponina I cardiaca puede ser detectada en suero o plasma de pacientes, usando anticuerpos monoclonales específicos. Los anticuerpos deben discriminar la isoforma cardiaca de la isoforma esquelética y deben reconocer la molécula libre de la que forman complejos.

El límite de referencia superior de la troponina I cardiaca debe establecerse teniendo en cuenta el 97,5 percentil (una cola) de las concentraciones de esa magnitud bioquímica para una población sana, según recomendaciones del comité de la Academia Nacional de Bioquímicos Clínicos (10). El límite superior del intervalo de referencia de los marcadores bioquímicos cardioespecíficos –como son las troponinas cardiacas– pueden ser usados como indicadores de la presencia de daño miocárdico. En el daño miocárdico la troponina I cardiaca se comienza a liberar desde las 4 a 6 horas del inicio hasta que se alcanza un pico máximo entre las 12 y 24 horas, desapareciendo de la circulación sanguínea entre los 5-10 días posteriores (11).

En nuestro laboratorio se obtuvieron 21 anticuerpos monoclonales antitroponina I cardiaca que se caracterizan y se comparan con tres anticuerpos monoclonales comerciales. Se logró un análisis inmunoenzimático de dos sitios que dura menos de una hora, combinando los anticuerpos monoclonales del laboratorio con los anticuerpos comerciales. Se realizaron algunos experimentos para evaluar las características metrológicas del enzimoanálisis y la evaluación preliminar de algunas de muestras de donantes sanos y pacientes con síndrome agudo coronario, daño muscular esquelético e insuficiencia renal crónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de calibración

Se utilizó como calibrador del inmunoanálisis de cuantificación de troponina I cardiaca el complejo de troponina cardiaca natural humana (Hytest, Turku, Finlandia). Este reactivo se diluyó en una mezcla de sueros humanos de donantes de sangre sanos filtrada en membranas de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 μ m (Sartorius AG, Goettingen, Alemania) hasta una concentración de 1 mg/L de complejo de tro-

ponina –según instrucciones del fabricante– y se alícuotó convenientemente. Los 3 componentes del complejo de troponina se encuentran en una relación equimolar dentro de su estructura. La troponina I cardiaca humana representa un 30% del peso molecular del complejo de troponina cardiaca humano. La concentración de troponina I cardiaca en forma de complejo terciario es 300 μ g/L. Las alícuotas se conservaron a -70 °C como calibradores primarios durante 3 años (12). Las alícuotas de uso frecuente o calibradores secundarios se conservaron a -20 °C hasta 2 meses y se descongelaban a temperatura ambiente antes de usar en el análisis. Cada alícuota se usó como máximo con 5 ciclos de congelación y descongelación (13).

Antígenos

La troponina I cardiaca recombinante y el fragmento aminoterminal fueron obtenidos por nuestro laboratorio (14). Los péptidos de los primeros 20 (1-ADGSSDAAREPRPAPAPIRR-20) y 39 (1-ADGSSDAAREPRPAPAPIRRSSNYRAYATEPHAKKKSK-39) aminoácidos de la troponina I cardiaca fueron sintetizados manualmente por el método de fase sólida (15) en el departamento de síntesis de péptidos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Ciudad de La Habana, Cuba). Los péptidos fueron conjugados con albúmina de suero bovino (BDH, Inglaterra, Reino Unido) por el método del glutaraldehído (16).

Obtención de anticuerpos monoclonales

Se utilizaron ratones BALBc, hembras de 6 a 8 semanas de edad que fueron inmunizados con la troponina I cardiaca recombinante humana y su fragmento aminoterminal recombinante. La cantidad de antígeno administrada fue 20 μ g homogenizado en igual volumen de adyuvante completo de Freund (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos de América), por vía subcutánea en varias zonas del animal en la primera inmunización y con adyuvante incompleto de Freund (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos de América) en las 3 restantes inmunizaciones cada 21 días. La inmunización final de los antígenos se hizo por vía intraperitoneal con la misma cantidad ya indicada, disuelto en la solución salina de fosfato (cloruro de sodio 138 mmol/L, cloruro de potasio 3 mmol/L, hidrógeno fosfato disódico 10 mmol/L, dihidrógeno fosfato de potasio 1,8 mmol/L pH 7,2 a 22 °C \pm 2 (temperatura ambiente) a los 3 días antes de la fusión. Los hibridomas fueron obtenidos por el método de fusión con polietilenglicol 1600 (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos de América) de los mielomas P3X63-Ag8-653 y los linfocitos esplénicos de los ratones inmunizados en una relación 10 a 1 (17). Los cultivos positivos seleccionados fueron clonados en 2 ocasiones por el método de dilución limitante. Los hibridomas secretores de anticuerpos fueron seleccionados mediante un enzimoanálisis indirecto, usando diferentes antígenos unidos a la fase sólida que se describe más adelante.

Los hibridomas específicos fueron crecidos como tumores ascíticos en ratones BALBc previamente inoculado por vía intraperitoneal con 2,6,10,14 tetrametilpentadecano o Pristane (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos de América) y purificados por cromatografía de afinidad usando proteína A sefarosa CL 4B (Farmacia, Upsala, Suecia). Los anticuerpos monoclonales purificados se dializaron en una solución salina de fosfato no esterificado a pH 7,2. Se concentraron a más de 1g/L con una presión positiva por ultra-

filtración por medio de una membrana YM10 (Amicon Ltd, Gloucestershire, Reino Unido). Se evaluó su pureza mediante electroforesis de gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (16). Se conservaron debidamente alicuotados a -20°C por 3 años y se evitaron los ciclos repetidos de congelación y descongelación (16). Los anticuerpos purificados fueron biotinilados usando NHS-LC- biotina (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos de América) según el método de Ed y Lane.

Tamizaje de anticuerpos monoclonales antitroponina I cardiaca

Las placas de ultramicrotitulación (Tecnosuma Internacional, Ciudad de La Habana, Cuba) fueron recubiertas con 10 μL /pocillo de la troponina I cardiaca recombinante, de los péptidos sintéticos, de la troponina I cardiaca natural humana (Biodesign International, Kennebruck, Estados Unidos de América), la troponina I esquelética humana (Hyttest, Turku, Finlandia) y el complejo de troponina natural cardiaca a 10 mg/L en tampón carbonato (hidrógeno carbonato 50 mmol/L pH 9,6 a $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 16 horas a 4°C toda la noche). Las placas después de 3 lavados con solución salina de fosfato (Tween 20 0,05%) fueron bloqueadas con 15 μL /pocillo de una solución salina de fosfato, leche deslipidada al 2% (Oxoid, Inglaterra, Reino Unido) y Tween 20 al 0,05% (tampón de bloqueo). Después se añadió 10 μL /pocillo del sobrenadante de cultivo diluido 1/2 en el tampón de bloqueo y se incubó 1 hora a $22^{\circ}\text{C} \pm 2$. Se lavaron las placas y se aplicó 10 μL /pocillo del conjugado anti-inmunoglobulinas G de ratón-peroxidasa diluido 1/4000 en el tampón de bloqueo. Se lavó 8 veces. Se aplicó 10 μL /pozo de la solución de 10 mL del tampón citrato-fosfato (ácido cítrico 0,1 mol/L y dihidrógeno fosfato de sodio 0,2 mol/L pH 5, $22^{\circ}\text{C} \pm 2$) que tiene disuelta 5 mg de orto-fenilendiamina y 5 μL de H_2O_2 al 30% y se incubó 15 min a $22^{\circ}\text{C} \pm 2$. Se detuvo la reacción aplicando 5 μL /pocillo de H_2SO_4 2,5 mol/L. La lectura de la placa de microtitulación fue realizada en el lector de placa PR- 521 (Tecnosuma Internacional, Ciudad de La Habana, Cuba) a una longitud de onda de 492 nm. Se consideró positivo cuando las absorbancias de los pocillos correspondientes a los sobrenadantes de cultivo a evaluar fueron mayores que la media más 2 desviaciones estándar del control negativo del método (sobrenadante de cultivo de un anticuerpo monoclonal antihepatitis B).

La especificidad de los anticuerpos monoclonales y su caracterización

Para la determinación de la subclase de los anticuerpos se empleó la técnica de inmunodifusión radial doble (18), enfrentando los sobrenadantes de cultivo concentrados 20 veces a un panel de anticuerpos clasificadores (ICN biomedical Ltd, Hampshire, Reino Unido). Los sobrenadantes fueron concentrados a presión positiva por ultrafiltración en una membrana YM-10. La especificidad de los anticuerpos monoclonales se realizó en el inmunoanálisis anteriormente descrito, recubriéndola con la albúmina bovina sérica, los péptidos no relacionados y relacionados con la secuencia de la troponina I cardiaca humana conjugados a albúmina bovina sérica. Los anticuerpos monoclonales antitroponina I cardiaca comerciales 19C7, 16A11 y 18E10 (Hyttest Ltd, Turku, Finlandia) fueron bien caracterizados por Katrukha y colaboradores (19).

Síntesis múltiple de péptidos e inmunoanálisis enzimático de manchado sobre membrana de celulosa para la detección de anticuerpos

Una serie de 51 deca péptidos que corresponden a la secuencia completa de la troponina I cardiaca (20) fueron sintetizados manualmente en membrana de celulosa por la técnica de Spot o manchado (21). El primer deca péptido comenzó en el primer residuo de la troponina I cardiaca; y el segundo, en el cuarto residuo de la troponina I cardiaca y así sucesivamente (figura 1a). El grupo de péptidos unidos a la membrana se incubaron con la solución de anticuerpo monoclonal a 1 g/L. La unión fue revelada con un anticuerpo contra inmunoglobulinas G de ratón conjugado con fosfatasa alcalina. El cromógeno añadido precipitó en la membrana. Se hizo la lectura visual del resultado cuando apareció una mancha de color azul en la zona correspondiente a un péptido unido a la membrana de celulosa (figura 1b). La membrana fue posteriormente tratada de manera que se eliminó el cromógeno precipitado y los anticuerpos unidos. La membrana pudo ser reutilizada en varias ocasiones.

Descripción del método enzimoinmunoanalítico para la determinación de la concentración de troponina I cardiaca en muestras biológicas.

Se aplicó 15 mg/L del anticuerpo CBTnI.16 en una placa de microtitulación (Marxisorp, Nunc, Dinamarca) diluido en el tampón carbonato (hidrógeno carbonato 50 mmol/L pH 9,6) aplicando 100 μL /pocillo. Luego se lavó de 3 a 4 veces con solución salina de fosfato (Tween 20 al 0,05%). A las placas se le añadió 150 μL /pocillo de tampón de bloqueo durante 1 hora a 37°C . Se lavó 3 ó 4 veces con solución salina de fosfato (Tween 20 al 0,05%). Las muestras se diluyeron en el tampón de bloqueo y se aplicó 50 μL /pocillo. Se diluyó el conjugado 19C7 biotinilado y el CBTn.11 biotinilado en un factor de 1/2000 y un 1/100 respectivamente en el tampón de bloqueo y se aplicó 50 μL /pocillo. Las muestras y el conjugado fueron incubados juntos durante 15 minutos a 37°C bajo agitación a 650 rpm en el agitador de placas de microtitulación (Titramax 100, Heidolph Instruments, Alemania). La curva patrón fue realizada con la troponina I cardiaca en forma de complejo terciario diluida en el tampón de bloqueo con una concentración final al 25 % de suero o plasma según sea la matriz biológica a estudiar. Se lavó de 4 a 6 veces con la solución de lavado. El conjugado estreptavidina-peroxidasa diluido 1/1000 en la solución salina fosfato (Tween 20 al 0,05%) a 100 μL /pocillo y se incubó durante 10 min a 37°C bajo agitación a 650 rpm. Se lavó 8 veces con la solución salina de fosfato (Tween 20 al 0,05%). Luego, se añadió 100 μL /poci-

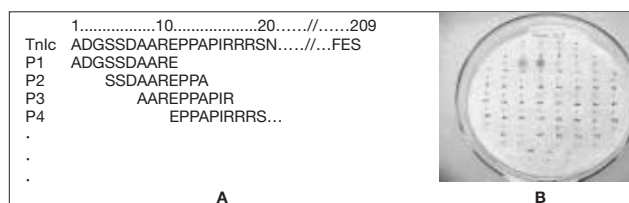


Figura 1 Inmunoanálisis enzimático de manchado en membrana de celulosa para la detección de anticuerpos monoclonales. a) Solapamiento de los deca péptidos en 7 residuos aminoacídicos a lo largo de toda la secuencia de troponina I cardiaca (TnIc). P1 corresponde al péptido 1 y P2 al péptido 2 y así sucesivamente. b) Reconocimiento de dos péptidos de la troponina I cardiaca por el anticuerpo monoclonal CBTnI.11.

llo de solución de sustrato, se paró la reacción con 50 μL /pocillo de ácido sulfúrico y se leyó la placa como se describió anteriormente.

Todos los reactivos utilizados no especificados son de la firma MERCK (Darmstadt, Alemania).

Obtención de las muestras de los grupos de pacientes y de los donantes sanos.

Las muestras se obtuvieron de pacientes ingresados en el departamento de Unidades de Cuidados Coronarios de 3 Hospitales de Ciudad de La Habana en el período del 1999 al 2002 y las muestras de donantes sanos del Banco de Sangre de Marianao. Los datos de la sintomatología del dolor en el pecho, electrocardiograma y marcadores bioquímicos séricos fueron recogidos por anamnesis en la historia clínica. La sangre de la muestra fue tomada desde las 6 horas del dolor en el pecho hasta las 120 horas. Se tuvieron en cuenta los principios recogidos en la Declaración de Helsinki para la evaluación de seres humanos como sujeto de investigación y revisada en la 52^{da} Asamblea General de Asociación Médica Mundial (Edimburgo, Escocia, Octubre 2000). Se aprovechó el volumen de plasma dejado en los laboratorios clínicos de los hospitales después de realizadas las pruebas solicitadas por el facultativo del paciente, se codificaron para la realización del estudio y, posteriormente, se convertirán en muestras anónimas (22). Se conservó la confidencialidad de los datos personales de los pacientes.

Los 56 pacientes con infarto agudo de miocardio tienen una edad promedio de 59 años (con un intervalo de 33 a 85 años) y un peso medio de 69 Kg (con un intervalo de 49 a 89 Kg), son de ambos sexos y 31 de ellos recibieron tratamiento trombolítico en un período desde 30 minutos hasta 9 horas del inicio del dolor en el pecho. El criterio clínico de infarto del miocardio fue dolor en la cara anterior del tórax sugestivo de isquemia miocárdica, de más de 30 min de duración que no se alivió con nitroglicerina. En el electrocardiograma se apreció una elevación del segmento ST de más de 1 mm en 2 o más derivaciones: DI, DII, DIII, aVL y aVF que registran la misma zona anatómica o de más de 2 mm en 2 o más derivaciones precordiales contiguas o bloqueo de rama izquierda o la presencia de una Q patológica en esas derivaciones. El criterio bioquímico consistió en la elevación de las enzimas en al menos 2 determinaciones por encima del límite de referencia superior de acuerdo a sus ventanas diagnósticas. La edad promedio de los pacientes con angina inestable aguda fue de 63 años (40-86 años), 4 de ellos fueron hombres y no presentaron complicaciones cardíacas. Fueron pacientes con dolor en el pecho sugestivo de isquemia miocárdica, pero que no presentaron elevación de los marcadores bioquímicos enzimáticos sanguíneos.

Dentro del grupo de individuos sin alteraciones coronarias se incluyeron donantes sanos, pacientes con daño esquelético y pacientes con insuficiencia renal crónica. Los plasmas de donantes sanos fueron recogidos del banco del sangre historia de daño cardíaco con los siguientes datos: edad promedio de 30 años (18-43 años), el peso promedio de 74 Kg (50-99 Kg) y 30 de ellos fueron hombres y 3 mujeres. Las muestras de plasma del grupo de pacientes con daño esquelético fueron obtenidas desde 1 día hasta 4 días. Este grupo de 6 personas consta de 4 pacientes con traumas craneoencefálicos, 1 con herida de arma blanca y una paciente histerectomizada. Los pacientes con insuficiencia renal crónica (n=9) estaban reci-

biendo tratamiento ambulatorio de hemodiálisis y ninguno refirió síntomas de dolor en el pecho ni tener historia de signos electrocardiográficos ni ecocardiográficos de daño miocárdico agudo.

En todos los casos, se tomó 1,5 mL de sangre del paciente, se le añadió heparina (Imefa, Ciudad de La Habana, Cuba) a una concentración final de 2000 unidades internacionales/L como anticoagulante, después se centrifugó a 2000 g durante 15 minutos y por último se recogió el sobrenadante, obteniéndose el plasma. Los plasmas con hemólisis fueron descartados. Todas las muestras recogidas fueron alicuotadas y conservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un período de 3 años (12). Se usaron 4 ciclos de congelación y descongelación como máximo (13). Después de cada descongelación las muestras fueron homogenizadas y centrifugadas a 4.000 g antes de su utilización para eliminar los restos remanentes de fibrinas. La extracción de suero siguió los mismos pasos de la obtención del plasma, excepto que no se le añadió anticoagulante y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min para favorecer la coagulación.

Otros análisis biológicos

La isoenzima 2 de la creatina cinasa (Slavo diagnostics, Siena, Italia), la creatina cinasa, la aspartato aminotransferasa, y la L-lactato deshidrogenasa (Roche-Boehringer, Mannheim, Alemania) fueron realizadas según las indicaciones de los fabricantes en un analizador automático (Hitachi 912, Tokio, Japón). La cuantificación de troponina I cardíaca se realizó en un análisis inmunoenzimométrico según las instrucciones del fabricante (Sanofi Diagnostic Pasteur, Marnes La Coquette, Francia). Los límites de referencias superiores fueron: para la creatina cinasa, 3,25 $\mu\text{Kat/L}$ (195 UI/L); para la isoenzima 2 de la creatina cinasa, 0,30 $\mu\text{Kat/L}$ (18 UI/L); para la aspartato aminotransferasa, 0,67 $\mu\text{Kat/L}$ (40 UI/L); para la L-lactato deshidrogenasa, 7,50 $\mu\text{Kat/L}$ (450 UI/L) y para la troponina I cardíaca, 0,03 $\mu\text{g/L}$. Se tomó en cuenta la cinética de liberación al torrente circulatorio de cada una de esas proteínas para el diagnóstico de infarto agudo del miocardio.

Cálculo y pruebas estadísticas usadas

Cada dilución de las muestras y de la curva de calibración se añadieron en la placa de microtitulación por duplicado. La media aritmética y las desviaciones estándar fueron calculadas en el programa Microsoft Excel, así como el coeficiente de regresión lineal y la recta de mejor ajuste por el método del mínimo cuadrado. Los valores predictivos se calcularon de la forma siguiente: sensibilidad diagnóstica $= [\text{PV}/(\text{NF}+\text{PV})] * 100$, especificidad diagnóstica $= [\text{NV}/(\text{NF}+\text{NV})] * 100$, valor predictivo positivo $= [\text{PV}/(\text{PF}+\text{PV})] * 100$, valor predictivo negativo $= [\text{NV}/(\text{NF}+\text{NV})] * 100$ y eficiencia diagnóstica $= [(\text{PV}+\text{NV})/(\text{PV}+\text{NF}+\text{PF}+\text{NV})] * 100$. La abreviatura PV se refiere a un resultado verdadero positivo, PF : falso positivo, NV: verdadero negativo y NF: falso negativo. Las variables clínicas recogidas y calculadas se informan como la media aritmética y entre paréntesis el intervalo de confianza de un 95%. El intervalo de confianza de la sensibilidad se calculó según la fórmula de las estimaciones del intervalo de confianza al 95% para proporciones ($p \pm 1,96 * (p*(1-p)/N)^{1/2}$, donde n es el tamaño muestral y p corresponde a la sensibilidad). El alineamiento de secuencias múltiples de las 3 isoformas de la troponina I se realizó con el programa CLUSTAL W (23).

El límite de detección del análisis es la mínima concentración del analito que puede ser diferenciable del valor prome-

dio más 3 desviaciones estándar de las absorbancias de 10 réplicas de una mezcla de plasmas pertenecientes a 30 donantes sanos. El límite de cuantificación se obtuvo como la menor concentración de troponina I cardiaca que dividida por su concentración estimada mediante la recta mínima cuadrática de la curva de calibración es mayor de un 90%. La precisión intraserial e interserial se demostró por el coeficiente de variación que se calculó por la división de la desviación estándar entre la media de las determinaciones realizadas a las muestras multiplicada por 100. El coeficiente de variación intraserial corresponde a las determinaciones de 10 réplicas de una muestra que se hicieron de manera independiente en un análisis. Cuando se realizaron las determinaciones de una muestra aplicada por duplicado en 8 análisis independientes se obtuvo el coeficiente de variación interserial. El porcentaje de recuperación se halló mediante la proporción de la concentración calculada del analito entre su concentración esperada multiplicada por 100. El límite de referencia superior fue calculado como la concentración de troponina I cardiaca que corresponde al 97,5 percentil (una cola) del grupo de donantes sanos de este estudio.

RESULTADOS

Caracterización de anticuerpos monoclonales

Se realizaron 5 fusiones produciéndose 21 anticuerpos monoclonales, 16 anticuerpos son de la subclase IgG₁ y 5 de la subclase IgG_{2b} (CB TnI_{2,5,16,17 y 21}). Todos reconocieron la troponina I cardiaca natural, 14 anticuerpos reconocieron el complejo de troponina (CB TnI_{1,2,4,6,9,10,11,15,16,17,18,19,20, y 21}), 6 reconocieron la troponina I esquelética (CB TnI_{2,3,4,5,17 y 21}) (tabla I) y 10 reconocieron el fragmento aminoterminal de la troponina I cardiaca. Ninguno de los anticuerpos reaccionó con la albúmina bovina sérica ni con otro péptido no relacionado.

Identificación de los péptidos epitópicos reconocidos por los anticuerpos monoclonales antitroponina I cardiaca

Los dieciséis anticuerpos antitroponina I cardiaca que reconocieron al complejo de troponina en la fase sólida fueron evaluados individualmente por su capacidad de reaccionar con un grupo de péptidos inmovilizados. Por ejemplo, en la figura 1b se encuentra las manchas obtenidas por el anticuerpo monoclo-

nal CBTnI.11. Por tanto, el epítipo del anticuerpo CBTnI.11 es -RAYAT- porque es el común a los 2 péptidos inmovilizados. En la tabla I se muestran los péptidos que fueron reconocidos por los diferentes anticuerpos. Como se puede ver, algunos fueron reconocidos por más de un anticuerpo, presentando similares especificidades. La parte de la troponina I cardiaca donde más se obtuvieron anticuerpos monoclonales antitroponina I cardiaca fue el extremo amino terminal. Algunos epítipos de sólo 5 aminoácidos fueron reconocidos por los anticuerpos. Los anticuerpos reconocieron péptidos sin características iónicas bien definidas. Cuando la membrana fue incubada sin anticuerpo no apareció señal. La característica cardioespecífica del epítipo del anticuerpo CBTnI.16 está dada por su diferencia en 3 aminoácidos de la isoforma esquelética lenta (-LSALQD-) y de 4 aminoácidos de la isoforma esquelética rápida (-MSEVQE-), cuando se alinean las secuencias de las 2 isoformas de troponina I esquelética (19,24) con respecto a la secuencia de la troponina I cardiaca; teniendo en cuenta la mayor homología de secuencia entre ellas.

Se ensayaron los anticuerpos monoclonales en la modalidad de parejas de anticuerpos para valorar su utilidad en un inmunoanálisis de tipo sándwich. Solo seis combinaciones de parejas de anticuerpos monoclonales reaccionaron fuertemente para la detección de troponina I cardiaca natural humana, libre y purificada (tabla II) y todas fueron cardioespecíficas, tanto para el anticuerpo monoclonal de recubrimiento como para el que está conjugado con biotina. Excasamente 2 combinaciones de parejas de anticuerpos monoclonales reaccionaron fuertemente para detectar complejo de troponina natural: CBTnI.16 - 19C7 biotinilado y 19C7- CBTnI.16 biotinilado. Esto sugiere que los anticuerpos reconocen bien el complejo de troponina unido a la placa sólida, pero no cuando están en solución. Posiblemente, el complejo al unirse a la fase sólida realiza un cambio conformacional que expone mejor los epítipos reconocidos por estos anticuerpos monoclonales.

Sobre la base de estos estudios se seleccionó una combinación de tres anticuerpos monoclonales que permiten la detección en el enzimoimmunoanálisis de 0,1 µg/L de troponina I cardiaca en forma de complejo terciario en el plasma. El CBTnI.16 fue probado como anticuerpo de recubrimiento y los anticuerpos monoclonales 19C7 biotinilado y CBTnI.11 biotinilado como anticuerpos conjugados (figura 2). Los dos anticuerpos biotinilados anteriores aumentaron los valores de absorbancias en el inmunoanálisis con respecto a cada uno de

Tabla I. Resumen con las principales características epitópicas y especificidad analítica de los anticuerpos monoclonales obtenidos. El símbolo (+) corresponde a una reacción adecuada y el (-), cuando no hubo reacción

Epítipos	Anticuerpos monoclonales	Análisis epitópico	Péptido del aminoácido	Péptido del aminoácido	CTn	TnIe
			1 al 20 de la TnIc.	1 al 39 de la TnIc.		
A	13, 14	n.d.	+	+	-	-
B	15	16-APIRRRS-22	+	+	+	-
C	6	21-RSSNYR-26	-	+	+	-
D	9, 10, 11	26-RAYAT-30	-	+	+	-
E	7, 8, 12	n.d.	-	+	-	-
F	1, 16, 18, 19, 20	89-FAELQD-94	-	-	+	-
G	2, 3, 4, 5, 17, 21	189-DWRKNI-194	-	-	+	+

Nota: n.d. significa no determinado, CTn: complejo de troponina natural, TnIe: troponina I esquelética natural, TnIc: troponina I cardiaca natural.

Tabla II. Inmunoanálisis en sándwich de doble anticuerpo monoclonal para la detección de troponina I cardiaca humana natural. Cuando se alcanza un límite de detección del componente de 4 µg/L se representa por: +++, 20 µg/L: ++, 100 µg/L: +, no señal: -.

Anticuerpo monoclonal biotinilado	Anticuerpo monoclonal inmovilizado en la fase sólida						
	8	15	6	11	16	17	19C7
8	-	-	-	-	+++	-	++
15	-	-	-	-	+++	++	++
6	-	-	-	-	++	+	+
11	-	-	-	-	++	+	++
16	++	+++	++	+++	-	++	+++
17	-	-	-	-	-	-	-
19c7	++	++	++	++	+++	++	-

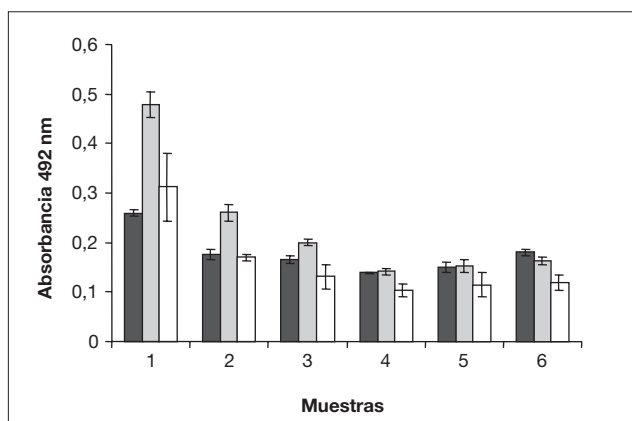


Figura 2 Enzimoanálisis de cuantificación de troponina I cardiaca donde se combina los anticuerpos 19C7 y el CBTnI.11 en el conjugado con el anticuerpo de recubrimiento CBTnI.16. Las barras gris oscuro representan las absorbancias obtenidas con el conjugado CBTnI.11-biotinilado, las barras gris claro; el conjugado CBTnI.11-biotinilado conjuntamente con el conjugado 19C7-biotinilado y las barras blancas, el conjugado 19C7-biotinilado. Las muestras 1, 2 y 3 son de pacientes con infarto agudo del miocardio y las muestras 4, 5 y 6 son de donantes sanos. Las barras representan la media de un duplicado +/- 2 desviaciones estándar.

ellos usados solo. Es de notar como el anticuerpo CBTnI.11 que no reconoce la troponina I cardiaca en forma de complejo terciario cuando se combina con el anticuerpo monoclonal CBTnI.16 es capaz de reconocer la troponina I cardiaca en muestras de pacientes con infarto agudo del miocardio con valores de absorbancias similares al anticuerpo monoclonal 19C7 con ese mismo anticuerpo de recubrimiento. El anticuerpo 19C7 tiende a dar valores de absorbancia más bajo en las muestras de donantes sanos. Se comparó el CBTnI.16 con los anticuerpos 8E10 y 16A11 (ambos anticuerpos reconocen el epitopo 87-LGFAE-91 de la troponina I cardiaca) como anticuerpos de recubrimiento y el anticuerpo 19C7 biotinilado en el inmunoanálisis de troponina I cardiaca (figura 3). Se obtuvieron similares curvas de cuantificación de troponina I cardiaca en forma de complejo terciario para las diferentes combinaciones de anticuerpos. Ese resultado sugiere una similitud del anticuerpo CBTnI.16 con los dos anticuerpos comerciales en la afinidad hacia el complejo de de troponina natural en solución.

Evaluación metrológica del método de determinación de la concentración de troponina I cardiaca

Algunos experimentos fueron realizados para optimizar las condiciones del análisis. El recubrimiento final y la dilución del conjugado descritos en Materiales y Métodos fueron seleccionados según la mayor intensidad y reproducibilidad de la relación señal positiva/fondo. La albúmina bovina sérica, la caseína, la gelatina, la leche deslipidada y la polivinilpirrolidona fueron probadas en el enzimoanálisis como agentes bloqueantes y la leche deslipidada al 2% fue la mejor condición (datos no mostrados).

La combinación de los anticuerpos CBTnI.16 - CBTnI.11 biotinilado + 19C7 biotinilado fue probada en suero y plasma. Las concentraciones de troponina I cardiaca en 3 determinaciones en el suero de un paciente fueron 40 % mayores que las concentraciones obtenidas en el plasma- heparina de las mismas extracciones de ese mismo paciente. Se ha informado hasta un 30% de disminución de los valores de concentración de troponina I cardiaca en plasma con respecto a suero (13). La manipulación de la sangre para la obtención de plasma es más rápida que la obtención de suero y garantiza una información más rápida del resultado final. Por tal motivo, los experimentos siguientes de validación del análisis se realizaron en plasma, a pesar de que las concentraciones séricas de troponina I cardiaca fueron más altas.

En la evaluación metrológica del enzimoanálisis se siguieron las recomendaciones descritas por Deshpande (25). Con la combinación de los tres anticuerpos monoclonales anti-troponina I cardiaca se detectaron concentraciones de 0,1 µg/L de troponina I cardiaca en forma de complejo de terciario en plasma. El límite de detección fue considerado el mínimo valor de concentración de troponina I cardiaca en forma de complejo terciario que garantiza una confiabilidad mayor de 90% y fue 0,2 µg/L.

Este método presentó una curva de calibración que se extiende de 0,2 µg/L a 3,5 µg/L (figura 3). Todos los pares de anticuerpos monoclonales probados en el inmunoanálisis de cuantificación de troponina I cardiaca presentaron una buena

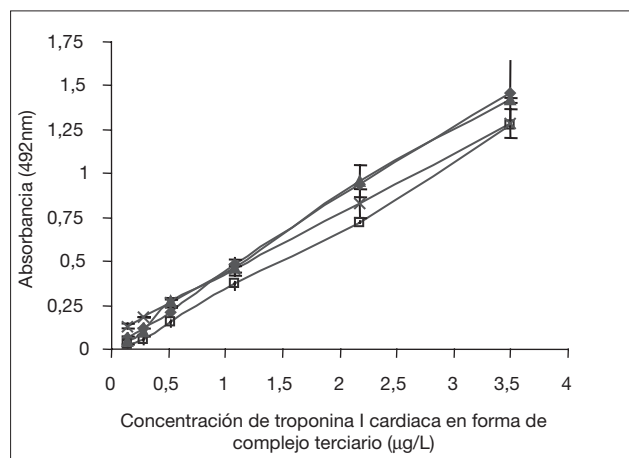


Figura 3 Comparación de las curvas de calibración de diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales. El marcador en forma de triángulo representa CBTnI16- 19C7 biotinilado (y=0,398x + 0,027); el cuadrilátero, 8E10-19C7 biotinilado (y=0,373x-0,031); el rombo, 16A11-19C7 biotinilado (y=0,412x+0,013); la cruz, CBTnI16-19C7 biotinilado+CBTnI11 biotinilado (y=0,343x+0,084). Las barras representan la media de un duplicado +/- 2 desviaciones estándar.

linealidad. La linealidad del método es donde se obtiene una respuesta (absorbancia) directamente proporcional a la concentración del analito. La combinación seleccionada de anticuerpos presentó una alta linealidad como se ve en la figura 3 y se corrobora con la media del coeficiente de correlación lineal de la curva de calibración de 10 análisis, que es de 0,9986 (0,9968-1,0004).

Este método presentó una precisión intraserial e interserial con un coeficiente de variación menor de un 10% cuando se analizan tres intervalos dentro de la curva de calibración. Se evaluaron tres mezclas de plasma de pacientes con infarto agudo del miocardio que presentaron concentración de troponina I cardiaca en tres intervalos de la curva patrón de troponina I cardiaca como complejo terciario. Los coeficientes de variación intraserial para 10 réplicas diluidas 1/4 son 8,7% para el intervalo bajo, 5,8% para el intervalo medio y 4,6% para el intervalo alto. Los coeficientes de variación interserial para 8 análisis con muestras diluidas 1/4 son 11,3% para el intervalo bajo, 6,3% para el intervalo medio y 5,4% para el intervalo alto.

Las dos mezclas de plasmas de humanos con una alta concentración troponina I cardiaca fueron diluidos 1/4, 1/8 y 1/16 con un plasma procedente de individuos sanos. Los experimentos de recuperación y de dilución son una forma de probar la exactitud relativa del método. Los experimentos de exactitud arrojaron en la prueba de dilución entre un 93% y 108% de recuperación; lo cual habla de una alta linealidad para la medición de troponina I cardiaca en complejo terciario y sugiere la ausencia de interferencia por los constituyentes de la matriz biológica en el análisis (tabla III). En la prueba de recuperación se obtuvo entre un 90% y 107% de concordancia entre los

valores medidos y los valores esperados de troponina I cardiaca en forma de complejo terciario en tres intervalos de la curva de calibración y confirma la existencia de una fuerte homología entre la troponina I cardiaca en forma de complejo terciario y la troponina I cardiaca del plasma humano (tabla IV).

La incubación de las muestras conjuntamente con la aplicación del conjugado biotinilado puede favorecer la saturación de los sitios de unión de los anticuerpos de recubrimiento y de conjugado a altas concentraciones de troponina I cardiaca y no detectarse una adecuada señal de absorbancia. Este fenómeno se llama efecto prozona. Este efecto no se obtuvo para los valores de 500 µg/L de troponina I cardiaca libre y en forma de complejo terciario. No se detectó concentraciones de troponina I esquelética a una concentración de 400 µg/L en este inmunoanálisis (figura 4). Se observa que en concentraciones entre 25 y 50 µg/L se obtienen mayores valores de absorbancias para la troponina I cardiaca en forma de complejo terciario que para la troponina I cardiaca libre. Posiblemente se deba a una mayor afinidad de los pares de anticuerpos por el complejo, una mayor estabilidad de la troponina I cardiaca en complejo terciario que la troponina I cardiaca libre y por último, una diferencia en la determinación de las concentraciones de esas moléculas. La concentración de troponina I cardiaca libre purificada es obtenida por espectrofotometría y la de troponina I cardiaca en forma de complejo terciario a través de la densitometría de láser mejorada, en los dos casos se utilizó el dato informado por los respectivos fabricantes. Ambas preparaciones tienen una pureza mayor del 95% en electroforesis en gel de poliácridamida con dodecil sulfato de sodio (tomado de las especificaciones del producto).

Tabla III. Exactitud del inmunoanálisis por medio de la prueba de dilución de las muestras de plasma con altas concentraciones de troponina I cardiaca.

Muestra	Dilución	Valor medido (µg/L)	Valor esperado (µg/L)	Porcentaje de recuperación
M1	1/4	13,2	12,9	102,5
	1/8	13,3	12,9	103,2
	1/16	12,0	12,9	93,2
M2	1/4	12,9	12	107,8
	1/8	11,5	12	95,5
	1/16	11,5	12	95,8

Tabla IV. Experimento de recuperación de la troponina I cardiaca en forma de complejo terciario purificada de corazón humano añadida a 3 muestras de plasma humano con diferentes concentraciones de troponina I cardiaca en 3 rangos de la curva de calibración. La concentración está dada en µg/L.

Muestra con su concentración	Rango	Concentración añadida	Concentración obtenida	Concentración esperada	% de Recuperación
M3 2,6	bajo	1,8	4,6	4,4	104,2
		3,9	6,9	6,5	105,4
		5,9	9,1	8,5	107,0
M4 8,7	medio	1,8	10,2	10,5	97,4
		3,9	12,7	12,6	100,7
		5,9	15,0	14,6	102,8
M5 10,5	alto	1,8	12,0	12,3	97,5
		3,9	13,0	14,4	90,4
		5,9	16,1	16,4	98,3

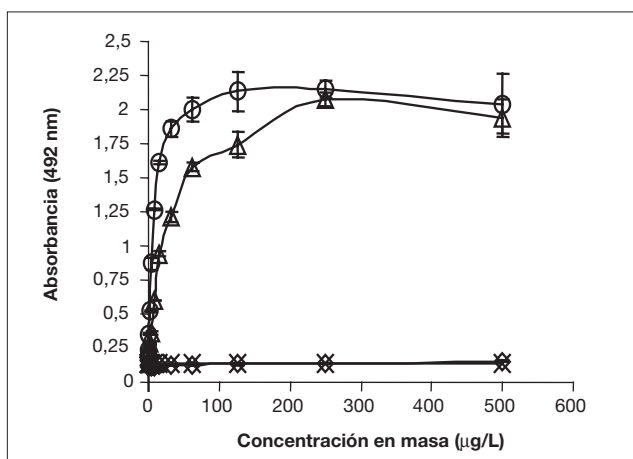


Figura 4 Curva de detección de troponina I cardíaca –libre y en forma de complejo terciario– y de troponina I esquelética en un enzimoimmunoanálisis de cuantificación de troponina I cardíaca con los anticuerpos CBTnI.16, 19c7-biotinilado y CBTnI.11-biotinilado. La línea con marcadores redondeados representan la troponina I cardíaca en forma de complejo terciario; la línea con marcadores triángulos, la troponina I cardíaca; la línea con marcadores rómbicos, la troponina I esquelética y la línea con marcadores cuadrados, el límite de detección. Las barras en las curvas representan la media de un duplicado \pm 2 desviaciones estándar.

Las concentraciones de troponina I cardíaca de 9 muestras de sueros de 4 pacientes con infarto agudo del miocardio obtenidas por el enzimoimmunoanálisis en optimización fueron correlacionadas mediante un ajuste de regresión lineal con las concentraciones obtenidas de ese componente en un análisis inmunoenzimométrico comercial de cuantificación de troponina I cardíaca. Se obtuvo un bajo coeficiente de correlación lineal ($r = -0,124$). La pendiente a y la interceptación con el eje b de la recta de mejor ajuste ($y = ax + b$) en la correlación de los dos grupos de concentraciones del componente fueron diferentes de 1 y 0 ($y = -0,134x + 2,95$), respectivamente. Sin embargo, por ambos inmunoanálisis todas las muestras pre-

sentaron concentraciones por encima del límite de detección del método, lo cual indica que todas ellas fueron correctamente diagnosticadas como necrosis miocárdica.

Se estudió la interferencia *in vitro* de la hemólisis para el enzimoimmunoanálisis, por medio de la comparación de los valores de absorbancias de 6 muestras de plasmas extraídas en días diferentes provenientes de una paciente con dolor en el pecho. De una misma extracción se obtuvieron plasmas hemolíticos y no hemolíticos de concentraciones de troponina I cardíaca por debajo del límite de detección del análisis. Ambos tipos de plasmas presentaron valores de absorbancias iguales. Cuando a esas 6 muestras se le adicionó en el laboratorio 5 $\mu\text{g/L}$ de complejo de troponina, se obtuvieron valores de absorbancias para los plasmas hemolíticos (intervalo de confianza al 95% de las absorbancias: 0,684-1,436) menores que para los plasmas no hemolíticos (0,97-1,521); pero no significativamente diferentes.

Evaluación clínica del método de determinación de la concentración de troponina I cardíaca.

El límite de referencia superior de la población de donantes sanos estudiada es menor de 0,1 $\mu\text{g/L}$. Las concentraciones mayores de troponina I cardíaca que el intervalo de referencia superior puede considerarse indicador de lesión miocárdica. Este método presenta una especificidad clínica de un 100% para donantes sanos, pacientes con insuficiencia renal crónica y para pacientes con daño muscular esquelético (Tabla V) y una sensibilidad mayor del 95% para pacientes con infarto agudo del miocardio en dependencia del tiempo transcurrido desde inicio del dolor en el pecho (Tabla VI). Sin embargo; se pueden ver que se logró una sensibilidad del 100% en el período de 25 a 48 horas, que es uno de los dos períodos con concentraciones mayores de troponina I cardíaca en su liberación. El paciente no detectado por el método de troponina I cardíaca fue diagnosticado en el electrocardiograma como un infarto Q de cara diafragmática y fue negativo también a los marcadores enzimáticos. Este paciente se le recogió muestra solo

Tabla V. Especificidad clínica del enzimoimmunoanálisis cuantitativo de troponina I cardíaca.

Grupo diagnóstico	Número de individuos	Muestras positivas	Muestras negativas	Porcentaje de especificidad
Donante sano	33	0	33	100
Angina Inestable aguda	9	0	9	100
Insuficiencia Renal Crónica	13	0	13	100
Politraumatizado	6	0	6	100
Total	61	0	61	100

Tabla VI. Sensibilidad clínica del enzimoimmunoanálisis en función del tiempo desde el inicio del dolor en el pecho en los pacientes con infarto agudo del miocardio.

Intervalos de tiempo en horas	Número de muestras	Muestras positivas	Porcentaje de sensibilidad	Intervalo de confianza al 95%	TnIc en $\mu\text{g/L}$	
					Media (DE)	Mediana (IIC)
6-24	33	31	94,2	86,2-100	3,7 (3,4)	3 (0,6- 5,4)
25-48	34	34	100	100	3,3 (3,3)	2 (0,8 – 5,4)
49-72	20	18	90,9	78,3-100	1,7 (1,6)	1 (0,5- 2,5)
73-148	13	12	92,8	78,7-100	2,4 (2,3)	1,4 (0,6- 3,3)
Total de muestras	100	95	95,2	91-99,4	nd	nd
Total de pacientes	56	55	98,2	94,7-100	nd	nd

Nota: TnIc significa troponina I cardíaca; DE, desviación estándar; IIC, intervalo intercuartil (25 percentil- 75 percentil); nd, no determinado.

a las 72 horas y fue intervenido rápidamente a los 90 minutos con el tratamiento trombolítico. Posiblemente, la lesión miocárdica fue muy pequeña, no evolucionó a muerte celular y no hubo liberación de los marcadores bioquímicos. La capacidad de predecir un diagnóstico positivo de infarto agudo de miocardio fue de un 100% (valor predictivo positivo) y de predecir un diagnóstico negativo de esta entidad nosológica fue 98,4% (valor predictivo negativo) como promedio y un máximo de 100% entre las 25 a 48 h de inicio de los síntomas. La eficiencia diagnóstica de este método fue de un 99,1%.

DISCUSIÓN

El complejo de troponina natural presenta algunas diferencias estructurales con respecto a la troponina I cardiaca libre como son: la menor reactividad de sus grupos sulfhidrilos (26), la inhibición de la fosforilación de troponina I cardiaca por diferentes proteínas cinasas cuando está presente la troponina C (27), la inaccesibilidad de sus residuos de lisina a la modificación química por la presencia de la troponina C y troponina T (28); la inaccesibilidad de los anticuerpos a las regiones de la molécula de troponina I cardiaca que está interactuando con la troponina C y la troponina T cardiaca (29) y a una mayor resistencia a la degradación proteolítica. Los anticuerpos producidos contra la troponina I altamente purificada reconocerán ciertos epítomos que estarán ausentes o significativamente modificados en el complejo de troponina natural o en el complejo binario de troponina I con la troponina C. Por tanto, en el proceso de selección de los hibridomas de interés se debe incluir un paso de reconocimiento del complejo de troponina natural en la fase sólida y en solución. Varios anticuerpos obtenidos en nuestro laboratorio reconocieron el complejo de troponina natural, cuando estuvo inmovilizado en la fase sólida, pero no reconocieron esa molécula en un inmunoanálisis de doble anticuerpo. Ese fenómeno no ocurrió cuando se utilizó la proteína natural purificada.

Los anticuerpos monoclonales antitroponina I cardiaca que se deban usar en un análisis de cuantificación de troponina I cardiaca deben reconocer a la molécula en forma libre y formando complejo binario (C-I) y terciario (C-T-I). No deben reconocer epítomos que se eliminen por la degradación proteolítica de esa molécula cuando es liberada a la circulación sanguínea y además, que las parejas de anticuerpos usados detecte concentraciones de troponina I cardiaca lo más bajo posible. Ese enfoque nos permitió seleccionar los anticuerpos monoclonales CBTnI.16 y CBTnI.11 conjuntamente con el anticuerpo comercial 19C7 para este enzimoanálisis. El anticuerpo CBTnI.11 reconoce el epítomo encontrado entre el aminoácido 26 al 30 de la secuencia aminoacídica de la troponina I cardiaca; el CBTnI.16 reconoce entre el aminoácido 89-94 y el 19C7 entre el aminoácido 41- SASRKLQLK- 49. Esos epítomos pertenecen a la región central de la secuencia aminoacídica (del aminoácido 28 a 110) de la troponina I cardiaca que es la parte más estable de la molécula, posiblemente debido a su interacción con la troponina C (11,19).

En la evaluación de este análisis se usó como material de referencia el complejo de troponina natural debido a la mayor estabilidad de esta forma de troponina I cardiaca con respecto a las demás formas liberadas existente después de la necrosis miocárdica (30). Los anticuerpos que reconozcan esa molécula garantizan una mayor sensibilidad del método analítico. El complejo de troponina purificado de tejido cardiaco humano repre-

senta la conformación más natural en que se libera la troponina I cardiaca hacia la sangre después de una lesión miocárdica. Primero, porque es purificada en condiciones no desnaturantes: no se emplea soluciones con urea ni con pH extremos (31). Segundo, la curva de calibración realizada con esta molécula natural comparada con los patrones propios de 5 inmunoanálisis comerciales -AxSYM (Abbott), IMMUNO 1 (Bayer), OPUS MAGNUM (Behring), DIMENSION (Dade - Behring), ACCESS (Sanofi) - disminuye el intervalo de concentraciones de troponina I cardiaca de las muestras analizadas de 10 a 1,4 veces. Tercero, los umbrales de corte de necrosis miocárdica de cada uno de esos inmunoanálisis comerciales, oscilan de 0,1 - 2 µg/L con sus patrones propios, cuando se usa la curva calibración realizada con el complejo de troponina natural esa oscilación solamente varía entre 0,1 - 0,2 µg/L. Los patrones de esos estuches comerciales incluyen las diferentes formas purificadas natural y recombinantes de la troponina I cardiaca libre o formando complejo reconstituido *in vitro* con las troponinas cardiacas T y C. Todos esos elementos sugieren que el complejo de troponina natural puede ser un candidato fuerte como material de referencia inmunológico internacional para un enzimoanálisis de cuantificación de troponina I cardiaca.

En uno de los períodos de máxima liberación de la troponina I cardiaca en la necrosis miocárdica no aparecieron falsos negativos en el inmunoanálisis. Cuando se añadieron de 2 a 4 veces las concentraciones promedio superiores de troponina I cardiaca que pueden ser encontradas en pacientes con infarto del miocardio (32,33,34); no ocurrió una disminución de la señal de absorbancia. No hubo interferencia de ningún elemento de la matriz en la determinación de troponina I cardiaca como pudo ser el anticoagulante añadido. La heparina, que posee una carga negativa y es capaz de formar complejos con la troponina I cardiaca cargada positivamente en algunos de sus sitios; no interfiere en la unión del anticuerpo con el antígeno en este análisis. Se ha informado la existencia de un paciente sometido a una cirugía electiva para una derivación aortocoronaria que presenta dos resultados de troponina I cardiaca negativa en un enzimoanálisis de 2 sitios, fluorimétrico de troponina I cardiaca Stratus™ (Baxter Diagnostic) y otro en un enzimoanálisis de Opus™ (Behring Diagnostic) posiblemente a la presencia de autoinmunoglobulinas G circulantes con alta afinidad por el analito (35). El primer análisis utiliza anticuerpos monoclonales murino en su funcionamiento y el segundo utiliza anticuerpos policlonales en carnero. La muestra de ese paciente falso negativo a troponina I cardiaca es positiva en un enzimoanálisis de dos sitios, fluorimétrico para la isoenzima 2 de la creatina fosfo-transferasa Stratus™ (Baxter Diagnostic).

En este grupo de muestras de pacientes sin daño miocárdico no existió falsos positivos en este análisis. Tampoco hubo interferencia por reactividad cruzada cuando se añadió 2000 veces las cantidades informadas de troponina I esquelética que existen en individuos sanos o 16 veces las informadas en pacientes con lesión muscular esquelética (36). Se ha informado la presencia de algunos sueros no completamente coagulados que dan falsos positivos en un enzimoanálisis de Stratus II (Dade International) y con el uso rutinario de plasma se ha favorecido la eliminación de esa interferencia (37). No se ha descrito interferencia por la bilirrubina, la hemoglobina, los triglicéridos y el factor reumatoideo en un inmunoanálisis de cuantificación de troponina I cardiaca (38,13). La interferencia por la presencia de anticuerpos heterofílicos en este enzimoan-

munoenálisis debe ser eliminada por la inclusión de apropiados reactivos bloqueadores de esos anticuerpos en el protocolo final. En este estudio se usaron los sueros o las plasmas no hemolizados debido a la tendencia a la disminución de los valores de absorbancias en el inmunoanálisis cuando las muestras tienen hemólisis.

En nuestro estudio teniendo el umbral de corte de 0,1 µg/L para la troponina I cardiaca nos permitió alcanzar una sensibilidad diagnóstica adecuada para el infarto agudo del miocardio. Lo ideal para establecer el diagnóstico de infarto agudo del miocardio es considerar varios umbrales de corte de este marcador para cada uno de los pacientes a estudiar y después de 4 a 6 semanas evaluar en un análisis retrospectivo cómo ha sido la evolución de los pacientes en ese período. Existen algunos estudios que han considerado como umbral de corte de lesión miocárdica las concentraciones de troponina I cardiaca por encima o igual de 0,1 µg/L y han encontrado un aumento del riesgo de muerte o infarto agudo del miocardio de los pacientes en 30 a 43 días independientemente del resultado electrocardiográfico (39,40). En uno de esos estudios se han descrito pacientes con síndrome agudo coronario y troponina I cardiaca positiva que presentan la probabilidad de infarto agudo del miocardio y muerte en 30 días aproximadamente de un 20% y cuando esa magnitud bioquímica es negativa la probabilidad es solo 1% (41). La concentración de 0,1 µg/L de troponina I cardiaca ha sido el límite de detección de cada uno de los inmunoanálisis de esos estudios. Todo lo anterior sugiere que un paciente con troponina I cardiaca mayor o igual a 0,1 µg/L representa un caso de alto riesgo que debe ser hospitalizado y valorarse el tratamiento con heparina de bajo peso molecular o un antagonista de los receptores de glicoproteína IIb/IIIa. Se ha informado inmunoanálisis más sensible con un límite de detección de 0,001µg/L, donde la concentración de troponina I cardiaca en donantes sanos y pacientes hospitalizados sin historia clínica de lesión miocárdica es 0,025 µg/L. No se ha demostrado si esa concentración es producto de la liberación de esa proteína estructural por un fenómeno de muerte celular programada o por interferencias en el intervalo bajo de la curva de calibración en análisis muy sensibles (42).

Los pacientes con infarto agudo del miocardio de tipo no Q al cabo de 2 años producen la misma cantidad de muertes que los infarto agudo del miocardio de tipo Q, por tanto es importante la detección de los primeros como los segundos. Los marcadores bioquímicos sanguíneos permite diferenciar el infarto agudo del miocardio de tipo no Q de la angina inestable aguda. Se plantea que 1/3 de los pacientes diagnosticados como negativos a lesión miocárdica con los marcadores bioquímicos enzimáticos se ha visto después que tienen elevado la troponina I y T cardiaca y ha coexistido con evidencias histológicas de focos de miocitos cardiacos necróticos. Es decir, que estos marcadores bioquímicos de proteínas estructurales presentan mayor sensibilidad en detectar pacientes con infarto agudo del miocardio de tipo no Q que los marcadores bioquímicos enzimáticos. Actualmente, se plantea que todo paciente con elevación de troponina I o T cardiaca por encima de su límite de referencia superior en 2 o más determinaciones dentro de las primeras 24 h o 48 h de inicio del cuadro clínico es suficiente para que sea diagnosticado como necrosis miocárdica aún cuando el criterio electrocardiográfico no sea concluyente. En nuestro caso los pacientes con angina inestable aguda diagnosticados por los marcadores enzimáticos negativos no tuvieron elevados la troponina I cardiaca y no tuvieron

complicaciones entre las 48 h y 120 h. En este estudio no existió esa discordancia en las concentraciones entre los marcadores bioquímicos enzimáticos y los marcadores bioquímicos de proteínas estructurales en la muestra pequeña analizada. En nuestro país la mitad de los fallecidos por infarto agudo del miocardio se producen fuera de las instituciones de salud (43). Es posible que el reconocimiento de un mayor número de pacientes con infarto agudo del miocardio de tipo no Q de manera ambulatoria disminuya esas muertes extrahospitalarias.

En pacientes con fallo renal crónico el diagnóstico de daño miocárdico ha sido siempre importante debido a la alta incidencia de enfermedades de cardiopatía isquémica o dolor en el pecho de origen no miocárdico en este grupo de pacientes (44). Se ha demostrado que el aumento de troponina I cardiaca en ausencia de daño miocárdico es extremadamente raro en pacientes con disfunción renal (45,46). Existe un estudio (47) en que hubo una especificidad en pacientes hemodializados de 96% sin signos de daño miocárdico cuando se usó un inmunoanálisis fluorimétrico de dos sitios Stratus II (Dade International, Miami, EUA) y de 100% cuando se usó un inmunoanálisis de dos sitios de Access (Sanofi Diagnostics, Pasteur, Francia). Los valores de las determinaciones en el primer inmunoanálisis mencionado estuvieron muy cerca de su límite de detección (0,4 µg/L *versus* 0,3 µg/L). En este estudio con un tamaño muestral pequeño los resultados coincidieron con el consenso sobre la especificidad de la troponina I cardiaca en los pacientes con insuficiencia renal crónica sin daño miocárdico que debe ser de un 100% de especificidad.

La ausencia de estandarización entre los análisis de cuantificación de troponina I cardiaca no posibilita la comparación de los valores absolutos entre los distintos métodos analíticos comerciales. Existen varios sistemas de diagnóstico en el mercado que se diferencian en 10 ó más veces en las concentraciones de troponina I cardiaca que cuantifican en las muestras biológicas de los pacientes (9,31,48,49). Sin embargo, todos diagnostican daño miocárdico demostrando su utilidad en la práctica médica (9,49). En la pequeña muestra de pacientes que se evaluaron por el análisis desarrollado en este trabajo con respecto al análisis de cuantificación de troponina I cardiaca comercial se reproduce lo que se ha descrito anteriormente. La ausencia de materiales de referencia para la troponina I cardiaca contra los cuales los fabricantes pueden asignar valores a sus calibradores principales o primarios hacen que no exista trazabilidad en la medición de troponina I cardiaca en los laboratorios clínicos. La exactitud puede ser garantizada cuando se use un solo patrón primario puro, homogéneo, bioquímicamente bien caracterizado y estable; ya sea complejo binario o terciario de troponina I cardiaca y además, los anticuerpos monoclonales en uso deben reconocer epítopos conservados y las diferentes formas en que se libera la troponina I cardiaca al torrente sanguíneo.

A manera de resumen, este método se realiza en menos de 1 hora y presenta una precisión intraserial e interserial menor de un 10%, detecta las diferentes formas de liberación de la troponina I cardiaca hacia el plasma y presenta un límite de detección de 0,1 µg/L. Presenta una sensibilidad clínica mayor de un 95% para el tamaño de muestra analizado, llegando a un 100% en el período de máxima liberación del analito y una especificidad clínica de un 100%. Las características de su ejecución cumplen con las recomendaciones del comité de estandarización de marcadores de daño miocárdico en síndromes

coronarios agudos (2,10) y permitiría su uso en salas de Unidades de Cuidados Coronarios. Aunque este estudio debía enriquecerse con un aumento de la muestra de pacientes con daño muscular esquelético, enfermos con angina inestable aguda y de pacientes con insuficiencia renal aguda y de las posibles interferencias de algunos compuestos biológicos en este enzimoimmunoanálisis.

AGRADECIMIENTOS

Nuestras gracias al Dr. Jesús Benitez por suministrar los anticuerpos comerciales para la realización de este trabajo. Agradecemos al personal técnico de laboratorio y de enfermería de las Unidades de Cuidados Coronarios de los Hospitales Hermanos Ameijeiras y CIMEQ y del Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular por suministrar las muestras de los pacientes ingresados y al personal técnico del laboratorio SUMA del Banco de Sangre del municipio de Marianao por suministrar las muestras de donantes sanos.

Correspondencia:
D Mainet González
Centro de Ingeniería Genética y
Biotecnología de La Habana.
Apartado postal 6162. Ciudad Habana
10600 Cuba.
correo electrónico:
damian.mainet@cigb.edu.cu.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dirección Nacional de Estadística del Ministerio de Salud Pública de Cuba. Mortalidad de 1998. Anuario estadístico de salud 1999: p21-62.
- Panteghini M, Apple F, Christenson RH, Dati F, Mair J, Wu AH. Proposals from IFCC Committee on Standardization of markers of cardiac damage (C-SMCD): Recommendations on use of Biochemical markers of cardiac damage in acute coronary syndromes. *Scan J Clin Lab Invest* 1999; 59: 103-112.
- Rude RE, Poole WK, Muller JE, et al. Electrocardiographic and clinical criteria for recognition of acute myocardial infarction based on analysis of 3697 patients. *Am J Cardiol* 1983; 52: 936-42.
- Wong SS. Strategic utilization of cardiac markers for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann Clin Lab Sc* 1996; 26: 301-312.
- Keffer JH. The cardiac profile and proposed practice guideline for acute ischemic heart disease. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 398-409.
- Keffer JH. Myocardial markers of injury. evolutions and insights. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 305-20.
- Etievant JP, Chocron S, Toubin G et al. Use of cardiac troponin I as a marker of perioperative myocardial ischemia. *Ann Thorac Surg* 1995; 59: 1192-4.
- Ver Elst KM, Spaden HD, Nguyen DN, Garbar C, Huyghens LP, Gorus FK. Cardiac Troponins I and T are biological markers of Left ventricular dysfunction in septic shock. *Clin Chem* 2000; 46: 650-57.
- Wu AHB, Feng YJ, Moore R, et al. Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. *Clin Chem* 1998; 44: 1198-208.
- Wu AHB, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes R. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: Recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chem* 1999; 45:1104-21.
- Larue C, Calzori C, Bertinchart JP, Leclercq F, Grollue R, Pau B. Cardiac specific immunoenzymometric assay of troponin I in the early phase of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1993; 39: 972-979.
- Collinson PO, Wiggins N and Gaze DC. Clinical evaluation of the ACS:180 cardiac troponin I assay. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 509-519.
- Lars-Peter K, Hannsjörg B, Schweigert R, Hafner G, Prellwitz W, Neumeier D. Evaluation of a rapid, quantitative cardiac Troponin I immunoassay. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 399-404.
- Mainet D, Sánchez L, Nazábal M, Echevarria M, Sorell L. Clonación, expresión y purificación de la troponina I cardiaca humana y su fragmento aminoterminal en *Echerichia Coli*. *Biotecnología Aplicada* 2000; 17: 116-22
- Larue C, Defacque- Lacquement H, Calzolari C, Le Nguyen D, Pau B. New Monoclonal antibodies as probes for human cardiac troponin I: Epitopic analysis with synthetic peptides. *Mol Immunol* 1992; 29: 271-78.
- Ed H, Lane D. *Antibodies: A laboratory Manual*. New York: Colds Spring Harbor Laboratory; 1988.
- Gavilondo-Cowley JV. Anticuerpos monoclonales. Ciudad de La Habana: Elfos Scientiae; 1995: p. 110-120.
- Ouchterlony O, Nielsson LA. Immunodifusion and immunoelectrophoresis. En Weir DM, dir. *Handbook of Experimental Immunology*. England: Blackwell Sci Pub. Oxford; 1978: 196.
- Katruxha AG, Bereznikova AV, Filatov VL et al. Degradation of cardiac troponin I : implication for reliable immunodetection. *Clinical Chemistry* 1998; 44 (12): 2433-40.
- Armour KL, Harris WJ, Tempest PR. Cloning and Expression in *Escherichia Coli* of the cDNA encoding human cardiac troponin I. *Gene* 1993;131: 287-292.
- Frank R. Spot- Synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 1992; 48: 9217-32.
- National Bioethics Advisory Comission. Research involving human biological materials: Ethical issues and policy Guidance 1999. http://www.goergetown.edu/research/nrcbl/nbac/hbm_exec.pdf [Consulta 2002-11-27].
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-80.
- Zhu L, Perez-Alvarado G, Wade R. Sequencing of a cDNA encoding the human fast-twitch skeletal muscle isoform of troponin I. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1217: 338-40.
- Deshpande SS. Assay development, evaluation, and validation. In *Enzyme immunoassays from concept to product development*. New York: Chapman and Hall. 1996: 275-353.
- Ingraham RH, Hodges RS. Effects of Ca²⁺ and subunit interaction on surface accessibility of cysteine residues of cardiac troponin. *Biochem* 1988; 27: 5891-8.
- Cole HA, Perry SV. The phosphorylation of troponin I from cardiac muscle. *Biochem J* 1975; 149: 525-33.
- Hitchcock-De Gregori SE. Study of the structure of troponin I by measuring the relative reactivities of lysines with acetic anhydride. *J Biol Chem* 1982; 257: 7372-80.
- Zot AS, Potter JD. Structural aspects of troponin -tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu Rev Biophys Chem* 1987;16: 535-59.
- Severina M, Katrukha A, Petterson K, Lovgren T, Bereznikova A, Esakova T. Troponin complex for the preparation of troponin I calibrators and standards. *Clin Chem* 1997; 43: S160.
- Katruxha AG, Bereznikova AV, Petterson K. New approach to standardization of human cardiac troponin I. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59: 124-27.
- Zaninotto M, Altinier S, Lachin M, Carraro P, Plebani M. Fluoroenzymometric method to measure cardiac troponin I in sera of patients with myocardial infarction. *Clin Chem* 1996; 42: 1460-66.
- Bodor GS, Porter S, Landt Y, Ladenson JH. Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. *Clin Chem* 1992; 38: 2203.
- Bertinchant JP, Larue C, Pernel I et al. Release Kinetics of Serum cardiac Troponin I in ischemic myocardial injury. *Clin Biochem* 1996; 29: 587-94.
- Bohner J, von Pape KW, Hannes W, Stegmann T. False negative immunoassay result for cardiac troponin I probably due to circulating troponin I autoantibodies [letters]. *Clin Chem* 1996; 42: 2046.
- Takahashia M, Leea L, Qinweia S, Gawada Y, Jackowskia G. Use of Enzyme Immunoassay for Measurement of Skeletal Troponin-I Utilizing Isoform-Specific Monoclonal Antibodies. *Clin Biochem* 1996; 29: 301-8.
- Prevention of analytical false-positive increase of cardiac troponin I on the Stratus II analyzer [letter]. *Clin Chem* 1997; 43: 860-1.
- Davies E, Gawad Y, Takahashi M, Shi Q, Lam P, Styba G et al. Analytical performance and clinical utility of a sensitive immunoassay for determination of human cardiac troponin I. *Clin Biochem* 1997; 30: 479-80.
- Hamm CW, Goldmann BU, Heesch C, Kreyman G, Berger J, Meintert T. Emergency room triage of patients with acute chest pain by means of rapid testing for cardiac troponin T or troponin I. *N Engl J Med* 1997;337:1648-53.

40. Morrow DA, Rifai N, Tanasijevic MJ, Wybenga DR, de Lemos JA, Antman EM. Clinical efficacy of three assays for cardiac troponin I for risk stratification in acute coronary syndromes: A thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) IIB substudy. *Clin Chem* 2000; 46: 453-60.
41. Hamm CW. Acute Coronary Síndromes. The diagnostic role of troponins. *Thromb Res* 2001;103: s63-s69.
42. Missov E, Calzolari C, Pau B. Circulating cardiac troponin I in severe congestive heart failure. *Circulation* 1997; 96: 2953-58.
43. Dirección Nacional de Estadística del Ministerio de Salud Pública. Tendencia y situación actual de la enfermedad isquémica del corazón en Cuba. Temas de estadísticas de salud. 2001; Septiembre. [http://www.sld.cu/ Estadísticas de Salud.htm](http://www.sld.cu/Estadisticas%20de%20Salud.htm) [Consulta 2003-02-04].
44. Willging S, Keller F, Steinbach G. Specificity of cardiac troponins I and T in renal disease. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 87-92.
45. Ossendorf M, Eberle B, Ehrental W et al. Analytical and Clinical Evaluation of the Access® Troponin I Immunoassay. *Clin Lab* 1997; 43: 627-36.
46. Bhayana V, Gougoulas T, Lohoc S, Henderson AR. Discordance between results for serum troponin T and I in renal disease. *Clin Chem* 1995; 41: 1201-02.
47. Musso P, Cox I, Vidano E, Zambon D, Panteghini M. Cardiac troponin elevations in chronic Renal failure: Prevalence and clinical significance. *Clin Biochem* 1999; 32: 125-130.
48. Tate JR, Heathcote D, Rayfield J, Hickman PE. The lack of standardization of cardiac troponin I assay systems. *Clin Chim Acta* 1999; 284: 141-9.
49. Shi Q, Ling M, Zhang X, Zhang M, Kadjevic L, Liu S et al. Degradation of cardiac troponin I in serum complicates comparisons of cardiac troponin I assays. *Clin Chem* 1999; 45: 1018-25.