

El nuevo material de referencia para las proteínas séricas (CRM 470/RPPHS)^a

Comisión de Proteínas^b

Resumen

En los últimos años, los diferentes controles externos de la calidad han demostrado la existencia de una pobre reproducibilidad entre laboratorios en la medida de las proteínas séricas. Los calibradores producidos por las casas comerciales y diversas organizaciones profesionales difieren significativamente, a pesar de referenciarse frente a materiales de referencia internacionales, lo cual ha contribuido a generar una cierta confusión.

Se describe brevemente el proceso de estandarización de las proteínas séricas llevado a cabo por el Comité de Estandarización de Proteínas Plasmáticas de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC).

Introducción

Durante los últimos 25 años, se han utilizado de forma universal un elevado número de materiales de referencia de proteínas séricas. Estos materiales presentan valores de concentraciones asignados por un gran número de procedimientos diferentes. Como resultado de ello, los valores para una determinada proteína pueden variar hasta un 50 o un 100 %, en función del tipo de proteína y del material de referencia usado. Esta variación ha sido puesta de manifiesto en diferentes programas de control externo de la calidad (1). Aunque las posibles soluciones a este problema son complejas, la utilización por parte de los laboratorios y de los fabricantes de reactivos de un único material de referencia internacional debería disminuir en gran medida la gran variabilidad existente.

En 1989, el Comité de Estandarización de Proteínas Plasmáticas de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) comenzó un proceso de preparación, caracterización y calibración de una nueva preparación de referencia internacional para 14 proteínas séricas (2-7):

- | | |
|--------------|---------------------------------|
| —prealbúmina | —transferrina |
| —albúmina | —componente C3c del complemento |

Summary

In recent years, several quality-control surveys have shown a very poor between-laboratory agreement for the measurement of serum proteins. Despite the existence of international reference materials distributed by international organizations, standards produced by diagnostics manufacturers and professional organizations differ significantly in their ascribed values, producing an important confusion. This unfortunate situation led the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Committee for Plasma Protein Standardization to begin a process of preparing, characterizing, and calibrating a new international secondary matrix reference preparation for serum proteins. A brief description of this process is given here.

- | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| — α_1 -glicoproteína ácida | —componente C4 del complemento |
| — α_1 -antitripsina | —inmunoglobulina G |
| —ferroxidasa | —inmunoglobulina A |
| —haptoglobina | —inmunoglobulina M |
| — α_2 -macroglobulina | —proteína C reactiva |

El objetivo a largo plazo de este comité fue el desarrollo de un material de referencia que tuviera todos sus valores asignados, frente a proteínas perfectamente caracterizadas y purificadas. Sin embargo, no existen actualmente materiales apropiados para todas las proteínas propuestas y por ello se decidió asignar los valores del nuevo material frente al correspondiente material de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) expresado en unidades internacionales y frente a las preparaciones de proteínas purificadas siguientes: prealbúmina, α_1 -glicoproteína ácida, α_1 -antitripsina y transferrina. La preparación de la OMS para la proteína C reactiva (1 UI = 1 mg) y frente a la preparación nacional americana (*US National Reference Preparation for Serum Proteins*) para el resto de las proteínas. El nuevo material ha sido preparado con la financiación conjunta del Bureau Communautaire de Référence (BCR) de la Comunidad Económica Europea y el College of American Pathologists (CAP) y será distribuido por ambas organizaciones.

Fases de la preparación del nuevo estándar internacional (CRM 470/RPPHS)

Todos los procedimientos usados en la preparación de este nuevo material fueron probados en estudios pilotos previos que demostraron la obtención de un material claro y muy estable que podía ser usado en todos los métodos comunes

^aDebido al notable interés científico de la nota informativa elaborada por la Comisión de Proteínas de la Sociedad, la Dirección de la Revista ha acordado incluir la misma como Nota Técnica.

^bComposición de la comisión: E. Bergón, L. Borque (Presidente), M. Cortés, M. García, C. Martínez, A. Ruzafa, P. Rosique.

de inmunoanálisis. Además, todas las fases de preparación se han documentado en detalle, con lo cual el material puede ser exactamente reproducido cuando se precisen nuevos lotes.

Las principales fases de la preparación han sido las siguientes:

1.— Obtención de sueros (procedentes de sangre coagulada espontáneamente), aproximadamente 175 mL por donante, de varios cientos de individuos sanos de 5 países europeos. Se recogieron los datos demográficos de cada individuo: raza, edad, sexo, peso, grupo sanguíneo y país de origen.

2.— Análisis en cada espécimen de los siguientes agentes infecciosos: virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (HIV 1 y 2), virus linfotrópico T humano de tipo 1 (HTLV 1), antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos contra el virus de la hepatitis C y anticuerpos contra *Treponema pallidum*.

3.— Análisis de cada espécimen para valorar la presencia de: factor reumatoide, paraproteínas y otras anomalías identificables mediante electroforesis sérica. Se realizaron estudios de los fenotipos de α_1 -antitripsina y de haptoglobina de cada espécimen.

4.— Control óptico de cada espécimen para detectar hemólisis, ictericia o turbideces apreciables.

5.— Exclusión de todos aquellos especímenes que presentaron alteraciones en los análisis anteriores.

6.— Adición de azida sódica e inhibidores de proteasas (aprotinina), congelación y envío a un laboratorio central de procesamiento.

7.— Descongelación y mezcla de los especímenes individuales y deslipidación con dióxido de silicón. Reconstitución del volumen inicial por concentración.

8.— Adición de conservantes: azida sódica, aprotinina y benzamida.

9.— Adición de proteína C reactiva purificada hasta una concentración final aproximada de 40 mg/L.

10.— Amortiguamiento a pH 7,2 con solución amortiguadora HEPES y filtración estéril posterior y finalmente,

11.— Llenado de los viales con 1 mL, liofilización y sellado.

Asignación de valores

La asignación de valores se ha realizado mediante la colaboración de diferentes laboratorios de Estados Unidos, Europa y Japón, utilizando un estricto protocolo en el que se realizaron mediciones repetidas del nuevo material y de los materiales de referencia utilizados para cada proteína en serie y corregidos mediante pesada. Para asegurar que los diferentes materiales presentaban un comportamiento similar (por ejemplo: no presentaban interferencias, efecto matriz o efecto prozona) se exigió que las rectas obtenidas mediante el análisis de regresión pasasen por el origen o por una ordenada en el origen común y que existiese linealidad en un determinado intervalo de medida.

Los principios de medida utilizados fueron: inmunodifusión radial, turbidimetría y nefelometría. Cinco diluciones de cada proteína se midieron por duplicado durante 3 ó 4 días, usando viales nuevos cada día.

Los valores asignados al nuevo material de referencia difieren significativamente, en algunos casos, de los materiales de referencia previos. Los principales cambios corresponden a la prealbúmina, α_1 -glicoproteína ácida, α_1 -antitripsina e inmunoglobulina M. Estos cambios son del orden del 10 al 40%. Además, las equivalencias encontradas entre las unidades de masa y las unidades internacionales fueron diferentes a las equivalencias previas, llegando a diferir hasta un 15%, aproximadamente.

Tabla I. Intervalos de referencia obtenidos para las proteínas séricas utilizando la nueva estandarización internacional de las proteínas

	Grupo Italiano (7) g/L	Grupo Escandinavo (8) g/L
AAG	0,5-1,1	0,40-1,17
AAT	1-2	0,97-2,23
ALB	39,2-51,8	36,6-51,1
HPT	0,4-2	0,2-2,05
IgA	0,9-3,95	0,81-4,85
IgG	8,4-16,6	6,1-15,7
IgM	0,48-2,2	0,39-2,30
TRF	2-3,3	1,94-3,85
PALB	0,2-0,4	0,23-0,45
A2M	1,3-3,2	
C3c	1-1,85	
C4	0,2-0,47	
FER	0,23-0,54	
PCR	0-0,01	

AAG: α_1 -glicoproteína ácida; AAT: α_1 -antitripsina; ALB: albúmina; HPT: haptoglobina; IgA: inmunoglobulina A; IgG: inmunoglobulina G; IgM: inmunoglobulina M; TRF: transferrina; PALB: prealbúmina; A2M: α_2 -macroglobulina; C3c: componente C3c del complemento; C4: componente C4 del complemento; FER: ferroxidasa; PCR: proteína C reactiva.

Las concentraciones de ferroxidasa, componente C4 del complemento e inmunoglobulina M en el nuevo material de referencia son bajas en relación al suero humano, lo que refleja la afinidad de estas proteínas por el agente deslipidante (dióxido de silicón). Esto puede ser particularmente importante para algunos analizadores porque el valor de la concentración de ferroxidasa, de inmunoglobulina M y del componente C4 del complemento en el nuevo estándar están muy cerca del límite inferior del intervalo analítico. Esto puede dar lugar a una menor precisión (repetibilidad) analítica que requeriría un mayor número de mediciones para transferir adecuadamente los valores a los materiales de referencia terciarios.

Disponibilidad y utilización del nuevo material de referencia.

El nuevo material de referencia de proteínas comenzó a estar a disposición de los fabricantes en 1993 y ha sido a lo largo de 1994 el período durante el cual han podido adaptar sus materiales de calibración y control a los nuevos valores.

El nuevo material de referencia secundario debe ser utilizado para transferir valores a otros materiales de referencia terciarios y no debe ser utilizado de forma directa como calibrador en los laboratorios clínicos de rutina. De esta manera el nuevo material de referencia puede estar vigente durante varios años.

El comité de la IFCC recomienda que la transferencia de valores se realice mediante protocolos similares a los utilizados para asignar valores al nuevo material de referencia secundario.

Aplicación práctica

Los resultados obtenidos en un reciente estudio (7), demuestran que existe una importante reducción de las diferencias obtenidas por los diferentes métodos, lo que supone un obvio beneficio diagnóstico. Otra consecuencia importante es que resulta necesario modificar los intervalos de referencia, obteniéndose variaciones, en algunos casos, importantes para

ciertas proteínas con respecto a los valores previos. Desde el punto de vista práctico, los fabricantes han calculado los factores de conversión que permiten obtener los nuevos valores corregidos. En un principio se ofrecen como una medida opcional, para en una segunda fase utilizar de forma rutinaria los nuevos valores.

En cuanto a los valores de referencia es posible, simplemente utilizando los factores de conversión, calcular los nuevos intervalos de referencia, no obstante será necesario verificarlos para cada laboratorio. A modo informativo se expresa en la tabla I, los intervalos de referencia obtenidos en dos recientes estudios llevados a cabo en dos países europeos (7,8).

Conclusiones

La utilización del nuevo material de referencia no va a solucionar todos los problemas actuales de la medida de las proteínas séricas en el laboratorio clínico, sin embargo, es de esperar que se produzca una mejora importante en la transferibilidad de los resultados entre los diferentes procedimientos de medida y que su utilización permita establecer unos nuevos intervalos de referencia para las concentraciones de proteína séricas. Las diferencias producidas por los especímenes, la variación fenotípica, los antisueros utilizados, los medios de reacción y los aditivos, aún producirán cierta variabilidad. Además, los futuros materiales de referencia tendrán indudablemente diferentes valores asignados para algunas proteínas conforme vayan apareciendo nuevas

preparaciones de proteínas purificadas y será necesario introducir ciertas modificaciones.

Correspondencia:
L. Borque de Larrea
Laboratorio de Bioquímica
Hospital San Millán
C/ Autonomía de La Rioja, 1
26004 Logroño

Bibliografía

1. Bullock DG, Dumont G, Vassault A, et al. Immunochemical assays of serum proteins: a European external quality assessment survey and the effects of calibration procedures on interlaboratory agreement. *Clin Chim Acta* 1990; 187: 21-35.
2. Johnson AM. A new international reference preparation for proteins in human serum. *Ach Pathol Lab Med* 1993; 117: 29-31.
3. Baudner S. Why a new international reference preparation (IRP) for human plasma proteins? *J Clin Lab Analysis* 1993; 7: 273-77.
4. Baudner S. Modern aspects and requirements for the standardization of immunoassays for human plasma proteins. *J Clin Lab Analysis* 1993; 7: 278-82.
5. Whicher JT, Ritchie RF, Myron Johnson A, Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S, et al. New international reference preparation for proteins in human serum (RPPHS). *Clin Chem* 1994; 40: 934-38.
6. Baudner S, Haupt H, Hübner R. Manufacture and characterization of a new reference preparation for 14 plasma proteins/CRM470 = RPPHS lot5. *J Clin Lab Analysis* 1994; 8: 177-90.
7. Aguzzi F, Gasparro C, Merlini G, Nespolo A, Petrini C. Il nuovo materiale de riferimento internazionale per le proteine (CRM 470 e/o RPPHS). *Biochimica Clinica* 1994; 18: 603-16.
8. Blaabjerg O, Blom M, Gry H, Carlstrom A et al. Faelles referencintervaller i norden for 9 plasmaproteiner. *Klinisk Kemi i Norden* 1994; 5: 13-7.