

## Determinación de carnitina en plasma por un procedimiento espectrométrico. Valores de referencia para una población pediátrica

R. Artuch Iriberrí, M. Quintana Berga, D. Moyano Ontiveros, J. Moreno García, R.M.<sup>a</sup> Puig Quintana, M.<sup>a</sup>A. Vilaseca Buscá

### Resumen

*La determinación de carnitina y carnitina no esterificada en plasma es de gran interés para el diagnóstico y control del tratamiento de pacientes con errores congénitos del metabolismo intermediario. Existen diferentes procedimientos de análisis aunque por su practicabilidad, se eligió uno espectrométrico automatizado basado en la adaptación realizada por Roe et al. Se introdujeron modificaciones tanto en la fase preanalítica (en especial en el tratamiento de la muestra), como en la analítica. Una vez adaptado a nuestras condiciones de trabajo, se procedió a evaluar las características metrologías de este procedimiento, así como al establecimiento de valores de referencia para una población pediátrica. Los resultados de la calidad analítica fueron similares a los encontrados por otros autores. En los intervalos de referencia no se hallaron diferencias significativas en relación con la edad ni el sexo (exceptuando el primer mes de vida).*

### Introducción

La carnitina es un constituyente presente en fluidos biológicos y tejidos que cumple importantes funciones en el metabolismo energético celular (1):

–Transporta moléculas de acil-coenzima A de cadena larga al interior de la mitocondria, que serán oxidadas para obtener energía.

–Mantiene las concentraciones intracelulares de coenzima A, regulando su esterificación con diferentes ácidos orgánicos.

La carnitina proviene de la dieta y de la síntesis endógena a partir de los aminoácidos metionina y lisina en el hígado (1). No existe catabolización y es eliminada por el riñón, mayoritariamente ligada a grupos acilo (acilcarnitina). Cualquier proceso que afecte a la síntesis, aporte dietético, metabolismo o eliminación de carnitina, puede disminuir sus concentraciones celulares, y por tanto sus funciones fisiológicas.

Los errores congénitos del metabolismo intermediario y energético son un grupo de enfermedades que pueden provocar secundariamente situaciones de deficiencia de carnitina por diferentes mecanismos: consumo de carnitina no esterificada, causado por un incremento en la producción de ácidos orgánicos con la consiguiente eliminación por orina de acilcarnitinas; interferencia en los procesos de reabsorción tubular renal de carnitina por falta de energía; por la dieta restrictiva

### Summary

*Plasma carnitine analysis is very useful for the diagnosis and treatment follow-up of inborn errors of intermediary metabolism. Several analytical procedures for this purpose had been reported, but we adapted the automatic spectrometric method reported by other authors. We added some modifications of the original procedure either in premetrologic or metrologic steps. We evaluated metrological variables and calculated reference values for a pediatric population. Analytical quality results were similar than that of the other authors. No significant differences were found in reference values related to age and sex (except for first month newborns).*

que están obligados a llevar estos pacientes durante toda su vida. No obstante, no siempre existe relación entre las concentraciones plasmáticas y las intracelulares de este constituyente (2). Los defectos del metabolismo que pueden cursar con un déficit de carnitina afectan a (3):

– $\beta$ -oxidación de ácidos grasos.

–Metabolismo de la carnitina.

–Cadena respiratoria mitocondrial.

–Metabolismo intermediario (acidemias orgánicas y aminoacidopatías).

La carnitina está presente en dos formas: no esterificada y esterificada con diferentes grupos acilo (acilcarnitinas). La suma de carnitina esterificada y no esterificada se denomina carnitina.

La determinación de carnitina y carnitina no esterificada en plasma, así como el cálculo de la concentración de acilcarnitina (carnitina–carnitina no esterificada) y el cociente entre las concentraciones de acilcarnitina y de carnitina no esterificada resulta muy útil en el diagnóstico, seguimiento y control del tratamiento de pacientes con ciertos errores congénitos del metabolismo (4).

Existen diferentes procedimientos para la determinación de carnitina, como son los radiométricos y espectrométricos. Los radiométricos ofrecen una mayor detectabilidad analítica, si bien tienen el inconveniente de ser procedimientos radioactivos. Los procedimientos espectrométricos están ampliamente extendidos y ofrecen una buena alternativa a los procedimientos radiométricos. La automatización de los procedimientos espectrométricos mejora notablemente su fiabilidad y los hace muy adecuados para su utilización en el laboratorio clínico. Existen varias adaptaciones descritas en la literatura (5-7) para

la determinación espectrométrica de carnitina no esterificada y de carnitina (8).

Nuestro objetivo fue: a) la determinación espectrométrica de las concentraciones plasmáticas de carnitina y carnitina no esterificada por un procedimiento automatizado descrito por Roe y adaptado a nuestras condiciones de trabajo; b) el establecimiento de valores de referencia en la población pediátrica que permitan la interpretación de los resultados tanto en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con errores congénitos del metabolismo, como en diversos problemas nutricionales en la edad infantil.

## Material y métodos

### Población

Para la obtención de valores de referencia de carnitina y carnitina no esterificada se analizó el plasma de 58 pacientes preoperatorios de cirugía menor (1 mes-18 años,  $\bar{x}$  = 11 años; 32 niños y 26 niñas), en los que se descartaron enfermedades metabólicas, renales, hepáticas, problemas nutricionales y tratamiento con valproato. A 25 de ellos se les determinó simultáneamente la concentración de acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato en sangre desproteinizada (9), para evaluar el efecto del ayuno sobre la carnitina.

Además, en el momento del diagnóstico se determinó la concentración de carnitina plasmática de 4 pacientes con las siguientes alteraciones:

- Paciente 1, sexo masculino de 1 año de edad. Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (EC 1.3.99.3).
- Paciente 2, sexo femenino de 15 años de edad. Deficiencia de carnitina O-palmitoiltransferasa (EC 2.3.1.21).
- Paciente 3, sexo masculino de 2 años de edad. Deficiencia de NADH: ubiquinona oxidoreductasa (EC 1.6.5.3).
- Paciente 4, sexo masculino de 5 años de edad. Deficiencia de citocromo c oxidasa (EC 1.9.3.1)

### Procedimiento

#### Fase preanalítica

El espécimen adecuado para la determinación de carnitina es suero o plasma con heparina de sodio o EDTA tripotásico. Se necesita un mínimo de 100  $\mu$ L para cada determinación. Las muestras se congelaron a  $-20$  °C hasta el momento de su procesamiento.

**Carnitina:** hidrólisis del espécimen mediante KOH 0,2 mol/L (30 minutos a 37 °C). Neutralización a pH 7 con HEPES 0,5 mol/L. (dilución final 1:3). De este modo, se separan los grupos acilo de las acilcarnitinas presentes en el plasma.

**Carnitina no esterificada:** Dilución del espécimen 1:3 con una solución KOH + HEPES (pH 7), para tratarlo con las mismas soluciones que para la carnitina, y que el intervalo de concentraciones sea también similar.

A continuación se filtran los especímenes en pocillos Ultrafree-MC de 10000 u.a.m mediante centrifugación a 5000 g durante 40 minutos a temperatura ambiente, para eliminar interferentes.

#### Fase analítica

Determinación espectrométrica de carnitina no esterificada y carnitina con el analizador centrífugo Cobas Fara II (Roche Diagnostic Systems, Nutley, EEUU), según el procedimiento descrito por Roe adaptado a nuestras condiciones de trabajo (tabla I).

**Reactivos.** Todos se han obtenido de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania) excepto aquellos en los que se indica su procedencia:

Solución 1: Acido 2-nitrobenzoico 2,7 mmol/L (ref. 104477)

+ HEPES 0,5 mmol/L (ref. 516945) + EDTA disódico 10 mmol/L (ref. 808261) ajustada a pH 7,5 con NaOH 1 mol/L (Merck, Darmstadt, Alemania; ref. 6498). Es estable a  $-20$  °C al menos 1 mes.

Solución 2: Acetil coenzima A 12 mmol/L (ref. 504084). Estable a  $-20$  °C al menos 3 semanas.

Solución 3: Carnitina acetil transferasa (EC; 2.3.1.7) 290,6  $\mu$ kat/L (ref. 505137). Se prepara extemporáneamente.

En el momento del análisis, se mezclan 1,8 mL de la solución 1 con 0,3 mL de la solución 2. La solución resultante es el primer reactivo de la reacción (tabla I). El reactivo final es la solución 3.

**Patrones de calibración.** L-carnitina, 1 mmol/L (Sigma Chemical Co., St Louis, EEUU; ref. C-7518) estable al menos 4 meses a  $-20$  °C. A partir de esta solución se preparan cada día 4 patrones a concentraciones de 5, 10, 20 y 40  $\mu$ mol/L.

**Método de medida.** Se basa en la reacción catalizada por la carnitina acetiltransferasa que libera coenzima A que reacciona con el ácido 2-nitrobenzoico produciendo el ion tiofenilato. Las lecturas de las absorbancias se realizan a 412 nm.



### Características metrológicas

Se han determinado las siguientes variables metrológicas:

**Tabla I. Programación del analizador Cobas Fara II para la determinación de carnitina no esterificada y carnitina**

<b>GENERAL</b>			
Measurement mode	ABS		
Reaction mode	P-I-SRI-A		
Calibration mode	Lin reg		
Reagent blank	Reag/Dil		
Wavelength	412		nm
Temperature	37		°C
Unit	$\mu$ mol/L		
<b>ANALYSIS</b>			
P	Sample volume	25	$\mu$ L
	Diluent	H <sub>2</sub> O	
	Volume	5	$\mu$ L
	Reagent volume	30	$\mu$ L
I	Incubation	150	s
	M1	20	s
	M2	140	s
	SRI Srat reag 1	10	$\mu$ L
	Diluent name	H <sub>2</sub> O	
	Volume	5	$\mu$ L
A	Readings		
	First	1	s
	Number	27	
	Interval	20	s
	M	No	
<b>CALCULATION</b>			
	Reaction direction	Increase	
	Conversion factor	3	
	Number of steps	1	
	Calculation step A	Endpoint	
	First	1	
	Last	27	
<b>CALIBRATION</b>			
	Calibration interval	Each run	
	Number of standards	5	
	STD 1: 2.5	STD 2: 5	STD 3: 10
			STD 4: 15
			STD 5: 20

Imprecisión mediante el cálculo de los coeficientes de variación intraserial e interserial en plasmas de pacientes a diferentes concentraciones (este mismo material se ha utilizado para el control interno de la calidad). Inexactitud relativa en relación a un material de referencia (control de la calidad externo del programa ERNDIM). Límite de detección: media de un «blanco» analizado 20 veces intraserialmente más 3 desviaciones típicas. Intervalo analítico mediante el análisis de diferentes patrones a concentraciones conocidas (2,5-100  $\mu\text{mol/L}$ ). Como control interno de la calidad se han utilizado plasmas de pacientes a diferentes concentraciones.

#### Estudio estadístico

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar la distribución de los resultados de la población de referencia. Prueba *U* de Mann-Whitney para comparar resultados de diferentes grupos de edad y sexo. Cálculo de la mediana y de los percentiles 2,5 y 97,5 para el establecimiento del intervalo de referencia. Coeficiente de correlación de Spearman para correlacionar las concentraciones de carnitina con las de metilcetona (acetacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato).

### Resultados

#### Características metrológicas

**Imprecisión:** para la carnitina no esterificada, los coeficientes de variación intraserial fueron de 3,4% (66  $\mu\text{mol/L}$ ), 1,9% (39  $\mu\text{mol/L}$ ) y 5,5% (25  $\mu\text{mol/L}$ ), mientras que los interseriales fueron de 7,6% (33  $\mu\text{mol/L}$ ) y de 7% (40  $\mu\text{mol/L}$ ). Para la carnitina, los coeficientes de variación intraserial fueron de 4,5% (70  $\mu\text{mol/L}$ ) y 4% (52  $\mu\text{mol/L}$ ), mientras que los interseriales fueron de 7,5% (58  $\mu\text{mol/L}$ ) y 6,4% (43  $\mu\text{mol/L}$ ).

**Inexactitud relativa:** para la carnitina no esterificada, se observó una recuperación frente a cada material de referencia analizado 5 veces de un 88% (25  $\mu\text{mol/L}$ ), 91% (143  $\mu\text{mol/L}$ ), y 93% (64  $\mu\text{mol/L}$ ). Para la carnitina, fue de 87% (35  $\mu\text{mol/L}$ ), 90% (153  $\mu\text{mol/L}$ ) y 94% (70  $\mu\text{mol/L}$ ).

**Límite de detección:** para ambas magnitudes es el mismo, ya que el procedimiento de medida es común. El resultado fue de 2,5  $\mu\text{mol/L}$ .

**Linealidad:** El procedimiento es lineal al menos hasta una concentración de 100  $\mu\text{mol/L}$ .

**Valores de referencia.** Los resultados de los valores de referencia, así como los de los pacientes diagnosticados de los errores congénitos del metabolismo anteriormente citados se exponen en la tabla II. La prueba de Kolmogorov-Smirnov demostró que la distribución de datos es no paramétrica para

nuestra población, por lo que se calcularon los intervalos de referencia por medio de los percentiles 2,5 y 97,5. No existieron diferencias significativas por edades ni por sexos, por lo que se estableció un único intervalo de referencia para toda la población.

La concentración de metilcetonas no mostró correlación con las concentraciones de carnitina, si bien en los tres casos en que estaban más incrementados (concentraciones de acetato + hidroxibutirato > 0,5 mmol/L) se pudo apreciar un ligero descenso de la concentración de carnitina no esterificada (22, 24 y 23  $\mu\text{mol/L}$ ), con una concentración de carnitina en el intervalo de referencia y un notable incremento del cociente acilcarnitina/carnitina no esterificada.

### Discusión

Existen diversos procedimientos de medida de la concentración de carnitina descritos en la literatura basados en diferentes principios analíticos. Nosotros hemos utilizado el procedimiento inicialmente descrito por Marquis y Fritz (10) y automatizado por Roe et al que determina el coenzima A liberado que reacciona con el ácido 2-nitrobenzoico produciendo el ion tiofenilato. Según nuestra experiencia, la determinación de la concentración de carnitina no esterificada no ofrece ninguna dificultad y de hecho nuestras condiciones de trabajo son prácticamente idénticas a las propuestas por el autor. En cambio, la determinación de la concentración de carnitina según las condiciones de Roe presentó muchas dificultades. Nosotros optamos por hidrolizar la carnitina ligada a grupos acilo bajo las condiciones anteriormente descritas y cuantificar la carnitina del mismo modo que la no esterificada, ya que no pudimos obtener una hidrólisis correcta de las acilcarnitinas según su procedimiento. La razón de este problema está probablemente en que se utilizan para la hidrólisis y neutralización volúmenes muy pequeños (5  $\mu\text{L}$ ) de soluciones muy concentradas, por lo que cualquier error aleatorio en el procesamiento de la muestra provoca una alteración notable en el resultado. Por otro lado, la dilución que realizamos para la hidrólisis (y también para la carnitina no esterificada y los patrones de L-carnitina con el fin de tratar de igual forma los especímenes) no supone ningún problema para la cuantificación, ya que el límite de detección del procedimiento es de 2,5  $\mu\text{mol/L}$ , y el intervalo de concentraciones en las que habitualmente trabajamos están por encima de este valor. Solamente en algún caso excepcional de deficiencia sistémica de carnitina o de alteración del metabolismo de la carnitina (tabla II) se pueden encontrar valores cercanos al límite de detección. En el caso que se presen-

**Tabla II. Valores de referencia para una población pediátrica. Contraste con 4 pacientes con errores congénitos del metabolismo**

Valores de referencia en plasma ( $\mu\text{mol/L}$ )				
1 mes-18 años ( <i>n</i> = 58)	Carnitina no esterificada	Carnitina	Acilcarnitina	Acilcarnitina/Carnitina no esterificada
<i>P</i> <sub>50</sub>	34,3	45,3	9,6	0,32
<i>P</i> <sub>2,5-97,5</sub>	25,5-49	33-58,2	1,2-19,3	0,17-0,49
Resultados de pacientes en plasma ( $\mu\text{mol/L}$ )				
	Carnitina no esterificada	Carnitina	Acilcarnitina	Acilcarnitina/Carnitina no esterificada
Paciente 1	13,2	24,9	11,7	0,89
Paciente 2	3,1	15,4	12,3	3,9
Paciente 3	24	47	23	0,96
Paciente 4	18,1	30,8	12,7	0,7

ta en la tabla, la muestra fue procesada sin diluir para la determinación de carnitina no esterificada.

El cálculo de las diferentes características metroológicas aporta unos resultados de imprecisión e inexactitud que hacen a este procedimiento apto para su utilización en el laboratorio, de acuerdo con los resultados obtenidos en el programa ERN-DIM de control externo de la calidad.

Respecto a los valores de referencia, los resultados son similares a los descritos por otros autores en la bibliografía (1,8,11). No hemos encontrado diferencias significativas por edades ni por sexo en la población pediátrica, por lo que hemos calculado un intervalo único para cada magnitud. No obstante, no disponemos de suficientes datos en niños menores de 1 mes de edad como para agruparlos junto a los demás. Este grupo requiere una evaluación muy cuidadosa, ya que están descritas situaciones de deficiencia de carnitina especialmente en el período neonatal (12). No existe relación aparente entre las concentraciones de carnitina y de metilcetonas, aunque una situación de ayuno prolongado o de cetosis intensa puede desencadenar un aumento en la formación de acilcarnitinas con la consiguiente pérdida de carnitina por orina. Esto causa un descenso ligero en la concentración de carnitina no esterificada con aumento de las acilcarnitinas que ocasiona un perfil de insuficiencia de carnitina pasajera (en nuestra experiencia, los controles preoperatorios con mayor cetosis tenían este perfil). Esto ocasiona que el intervalo de referencia pueda ser muy amplio si no se tiene en cuenta este factor.

Para la interpretación de los resultados en los casos de pacientes con alteraciones secundarias de la carnitina causadas por un error congénito del metabolismo, la determinación de carnitina y carnitina no esterificada y el cálculo del cociente acilcarnitina/carnitina no esterificada son de gran utilidad. En el diagnóstico, el interés de esta determinación estriba en determinar situaciones de deficiencia o insuficiencia de carnitina. Respecto al seguimiento, interesa monitorizar las concentraciones de carnitina como fármaco utilizado en el tratamiento de estos pacientes. El cálculo de las acilcarnitinas en cambio puede estar dentro del intervalo de referencia, especialmente cuando las concentraciones de carnitina y carnitina no esterificada son bajas. Los resultados hallados en los pacientes y reflejados en la tabla II demuestran diferentes alteraciones secundarias de la carnitina. Las más leves son las de los pacientes 3 y 4, en los que las pérdidas de carnitina no son todavía considerables pero existe un estado de insuficiencia provocado por diferentes mecanismos (aumento de acilcarnitinas que se eliminan por orina que a la larga produce un consumo de carnitina). En el caso de los pacientes 1 y 2, se ha instaurado una deficiencia clara de carnitina que requiere tratamiento inmediato.

En resumen, la determinación de las concentraciones de carnitina y carnitina no esterificada por el procedimiento espectrométrico descrito es practicable y fiable para su adaptación al laboratorio clínico. La cuantificación de ambas magnitudes puede ser de gran utilidad para el diagnóstico y control del tratamiento de los errores congénitos del metabolismo intermedio.

## Agradecimientos

Agradecemos el competente trabajo técnico realizado por Antònia Mestres y Maribel Hernández, así como el asesoramiento científico por parte de la Dra. Paz Briones. Este trabajo está financiado por la beca FIS 95/0040.

Correspondencia:  
R. Artuch Iriberrí  
Servei de Bioquímica  
Hospital Sant Joan de Déu  
Passeig Sant Joan de Déu 2  
08950 Esplugues (Barcelona)

## Bibliografía

1. Carter LA, Abney TO, Lapp DF. Biosynthesis and metabolism of carnitine. *J Child Neurol* 1995; 10: 2S3-2S7.
2. Roe CR, Coates PM. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, dirs. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995: 1501-33.
3. Brenningstall GN. carnitine deficiency syndromes. *Pediatr Neurol* 1990; 6: 75-81.
4. Pons R, De Vivo DC. Primary and secondary carnitine deficiency syndromes. *J Child Neurol* 1995; 10: 2S8-2S21.
5. Takahashi M, Ueda S, Misaki H, Sugiyama N, Matsumoto K, Matsuo N, et al. Carnitine determination by an enzymatic cycling method with carnitine dehydrogenase. *Clin Chem* 1994; 40: 817-21.
6. Cederblad G, Harper P, Lindgren K. Spectrophotometry of carnitine in biological fluids and tissue with a Cobas Bio centrifugal analyzer. *Clin Chem* 1986; 32: 342-6.
7. Rodríguez-Segade S, Alonso de la Peña C, Paz JM, del Río R. Determination of L-Carnitine in serum and implementation on the ABA-100 and Centrifichem 600. *Clin Chem* 1985; 31: 754-7.
8. Roe DS, Terada N, Millington DS. Automated analysis for free and short-chain acylcarnitine in plasma with a centrifugal analyzer. *Clin Chem* 1992; 38: 2215-20.
9. Artuch R, Vilaseca MA, Farré C, Ramón F. Determination of lactate, pyruvate, acetoacetate and  $\beta$ -hydroxybutyrate with a centrifugal analyzer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 529-33.
10. Marquis NR, Fritz IB. Enzymological determination of free carnitine concentrations in rat tissues. *J Lipid Res* 1964; 5: 184-7.
11. Farriol M, Schwartz S. Plasma carnitine reference values. *Ann Clin Biochem* 1994; 31: 188-9.
12. Borum PR. Carnitine in neonatal nutrition. *J Child Neurol* 1995; 10: 2S25-2S30.