

DOCUMENTO

Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la creatina quinasa en suero sanguíneo humano

Sociedad Española de Química Clínica, Comité Científico, Comisión de Enzimas

Joaquín Arenas, F. Javier Gella^a

Documento D, Fase 3, Versión 1

1. Introducción

La creatina quinasa (CK, ATP: creatina N-fosfo-transferasa, EC 2.7.3.2) es una enzima que cataliza la N-fosforilación reversible de la creatina a partir del complejo Mg^{2+}/ATP^1 .

La molécula es un dímero formado por dos subunidades muy similares en su estructura polipeptídica, denominadas M y B en función de su origen tisular mayoritario (músculo esquelético y cerebro, respectivamente). La masa molecular relativa de cada subunidad se sitúa alrededor de 41300² y contienen un centro activo que requiere un grupo sulfhidrilo para su acción catalítica³.

La isoenzima CK-BB (CK 1) tiene una amplia distribución tisular⁴, aunque es en el cerebro donde se encuentra en mayor proporción. El otro dímero homogéneo, CK-MM (CK 3), predomina en el tejido muscular, mientras que la isoenzima híbrida CK-MB (CK 2), se localiza en el músculo esquelético en desarrollo y en el miocardio. Además de estas tres isoenzimas citoplasmáticas existe una cuarta localizada en la mitocondria, de amplia distribución tisular, y con estructura dimérica de un probable tercer tipo de subunidad⁵.

La actividad catalítica elevada de creatina quinasa en suero se debe primordialmente a alteraciones del músculo esquelético y del miocardio.

Diversas miopatías primarias, secundarias, el ejercicio y el infarto agudo de miocardio son las situaciones que conducen más frecuentemente al aumento de la concentración catalítica de CK en suero.

Para la determinación de la concentración catalítica de CK en suero humano, varias sociedades de Química Clínica^{6,7} han recomendado, con ligeras modificaciones, el método originalmente descrito por Oliver⁸ y luego mejorado por Rosalki¹⁶ y Szasz⁹⁻¹⁴. La Federación Internacional de Química Clínica está preparando un método de referencia¹⁵ basado en los mismos principios.

Sin embargo, al igual que con otras enzimas, el método de referencia recomendado por la IFCC presenta ciertos inconvenientes para su implantación en la rutina de los laboratorios clínicos, ya que se requiere un tiempo de preincubación prolongado que a menudo no es posible adaptar a un analizador automático y utiliza además blancos de muestra que complican la determinación con fines de rutina.

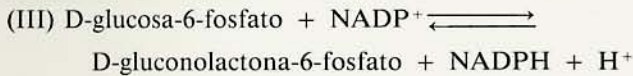
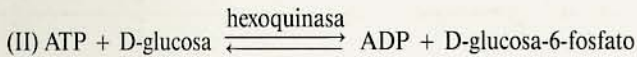
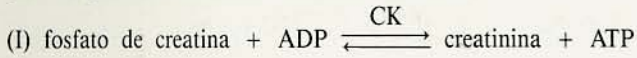
Es por ello que esta Comisión ha estudiado la adaptación de las condiciones de reacción del método de la IFCC a 37°C, así como la simplificación del procedimiento, de forma que resulte sencilla su adopción por todos los laboratorios.

2. Fundamento

El método recomendado para la determinación de creatina quinasa en suero se basa en una secuencia de tres reacciones acopladas: (I) la reacción catalizada por la creatina quinasa, (II) la reacción auxiliar catalizada por

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Barcelona. Unidad Docente del Hospital de la Sta. Creu i S. Pau, S. Antonio M. Claret, 167. 08025 Barcelona.

la hexoquinasa y (III) la reacción indicadora catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.



El equilibrio en I está desplazado hacia la formación de creatina y ATP a valores de pH entre 6-7 debido a la mayor energía del fosfato de creatina respecto al ATP y a la menor K_m para el ADP y fosfato de creatina en relación al ATP y la creatina¹⁷. Esta reacción principal es acoplada a través de la reacción auxiliar II catalizada por la hexoquinasa a una reacción indicadora formadora de NADPH, catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Para asegurar una actividad catalítica total, la molécula de creatina quinasa en suero debe reactivarse por un compuesto con grupos sulfhidrilo.

3. Condiciones recomendadas para la medición

Las condiciones recomendadas para la determinación en suero son las siguientes:

Temperatura	37,0°C
pH (37° C)	6,5
Fosfato de creatina	30 mmol/L
Adenosina-5'-difosfato (ADP)	2 mmol/L
Imidazol	100 mmol/L
Acido etilendiaminotetraacético (EDTA)	2 mmol/L
Acetato magnésico	10 mmol/L
N-acetilcisteína	20 mmol/L
Adenosina-5'-monofosfato (AMP)	5 mmol/L
P1, P5-di(adenosina-5'-) pentafofosfato	10 µmol/L
D-glucosa	20 mmol/L
NADP	2 mmol/L
Hexoquinasa de levadura	50 µkat/L (3000 U/L)
D-Glucosa-6-Fosfato deshidrogenasa de levadura	33 µkat/L (2000 U/L)
Fracción de volumen de muestra	0,0385 (1:26)

Las concentraciones indicadas corresponden a la mezcla de reacción final. Las concentraciones catalíticas recomendadas para la hexoquinasa y la D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa son las obtenidas por el procedimiento descrito por la IFCC¹⁵.

4. Obtención, transporte y almacenamiento de la muestra

La sangre debe extraerse con el mínimo éstasis venoso posible. Debe evitarse la hemólisis para minimizar la in-

terferencia por la adenilato quinasa eritrocitaria. No es recomendable el uso de plasma. Los tubos de recolección de muestra no deben contener aditivos y las células deben ser separadas del suero dentro de las dos horas posteriores a la venipuntura.

El ejercicio físico puede incrementar la actividad creatina quinasa sérica, por lo que debe evitarse antes de venipuntura.

La estabilidad de la creatina quinasa en suero depende en gran medida de la proporción de sus isoenzimas presentes en el mismo. La estabilidad de las isoenzimas de creatina quinasa en suero son:

CK-MM (CK 3): 2 semanas a 2°—10°C

CK-MB (CK 2): 5 días a 2°—10°C

CK-BB (CK 1): 1 día a 2°—10°C

5. Reactivos

Los reactivos empleados deben cumplir las especificaciones establecidas por la IFCC¹⁸. Las enzimas auxiliares empleadas en la reacción deben estar desprovistas de actividades catalíticas interferentes de tal forma que la velocidad media en el blanco de reactivos (sustituyendo la muestra por NaCl 154 mmol/L) sea inferior a un incremento de absorbancia por minuto de 0,001.

Composición del reactivo de trabajo:

Imidazol 104 mmol/L, EDTA 2,08 mmol/L, acetato magnésico 10,4 mmol/L, ADP 2,08 mmol/L, AMP 5,2 mmol/L, P1, P5-di (adenosín-5'-) pentafofosfato 10,4 µmol/L, D-glucosa 20,8 mmol/L, fosfato de creatina 31,2 mmol/L, NADP 2,08 mmol/L, N-acetilcisteína 20,8 mmol/L, hexoquinasa 52 µkat/L (3120 U/l), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 34,3 µkat/L (2080 U/l), pH 6,5 a 37°C.

6. Procedimiento analítico

Condiciones operatorias:

Longitud de onda: 339 (± 1 nm)

Paso de luz 1,00 ± 0,001 cm

Volumen final de la mezcla de reacción: 2,60 mL

Temperatura 37,0°C ± 0,1°C.

Esquema analítico

Preincubar la muestra (no más de 5 min) y el reactivo de trabajo a 37°C. Pipetear:

Reactivo de trabajo	2,5 mL
Muestra	0,100 mL

Mezclar e incubar inmediatamente a 37°C. A los 3 minutos de iniciarse la reacción, registrar los cambios de absorbancia durante 3 minutos.

7. Cálculos

Calcular el $\Delta A/\text{minuto}$ obtenido para el intervalo de

medicaciones. Los valores de A/t deben ser constantes durante todo el intervalo.

Teniendo en cuenta que el coeficiente de absorción molar del NADPH a 339 nm es de $630 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$ se deducen las siguientes ecuaciones:

$$\Delta A/\text{min} \times 68756 = \text{nkatal/L}$$

$$\Delta A/\text{min} \times 4127 = \text{U/L}$$

8. Linealidad

La concentración catalítica de creatina quinasa es proporcional a la velocidad de transformación hasta 39840 nkat/L (2400 U/L) siempre y cuando el espectrofotómetro sea capaz de medir con fiabilidad absorbancias de hasta 2,000.

Cuando las muestras tienen alta concentración de creatina quinasa la mayor parte del NADP puede ser consumido antes de iniciarse el periodo de lecturas. En estos casos diluir la muestra de 5 a 10 veces con solución salina fisiológica (cloruro sódico 154 mmol/L) y repetir el ensayo.

9. Valores usuales

Los valores usuales que se hallan en el suero de personas sanas se reflejan en la siguiente tabla.

	nkat/L	U/L
Mujeres	400-2850	24-170
Hombres	400-3250	24-195

10. Interferencias

Se ha demostrado que la administración de diversos medicamentos a los pacientes va acompañada de cambios en la actividad de creatina quinasa en suero. No en todos los casos se sabe si el efecto es debido a factores fisiológicos, patológicos o farmacológicos, o si es debido a una interferencia con el método analítico.

Bibliografía

- Morrison JF, James E. The mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate-creatinephosphotransferase. *Biochem J* 1965; 97: 37-52.
- Yue RH, Palmieri RH, Olson OE, Kuby SA. Studies on adenosine-triphosphate transphosphorylases. V. Studies on the polipeptide chains of the crystalline adenosine triphosphate transphosphorylases. V. Studies on the polipeptide chains of the crystalline adenosine triphosphate-creatine transphosphorylase from rabbit skeletal muscle. *Biochemistry* 1967; 6: 3204-27.
- Watts DC. Creatine kinase (adenosine-5'-triphosphate-creatine phosphotransferase). En: Boyer PD, ed. *The Enzymes*, Vol. 8. New York/London: Academic Press, 1973: 383-455.
- Urdal P, Urdal K, Strome JH. Cytoplasmic creatine kinase isoenzymes quantitated in tissue specimens obtained at surgery. *Clin Chem* 1983; 29: 310-13.
- Blum HE, Weber B, Deus B, Gerok W. The mitochondrial creatine kinase isoenzyme from human heart muscle. En: Lang H, ed. *Creatine kinase isoenzymes, Pathophysiology and Clinical Applications*. New York: Springer-Verlag, 1981: 19-30.

- The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. Recommended method for the determination of creatine kinase in blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1976; 36: 711-23.
- The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. Recommended method for the determination of creatine kinase in blood modified by the inclusion of EDTA. *Scand J Clin Lab Invest* 1979; 39: 1-5.
- Oliver IT. A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem J* 1955; 61: 116-22.
- Szasz G, Gruber W, Bernt E. Creatine Kinase in serum: 1 Determination of optimum reaction conditions. *Clin Chem* 1976; 22: 650-56.
- Szasz G, Gerhardt W, Gruber W, Bernt E. Creatine kinase in serum: 2. Interference of adenylate kinase with the assay. *Clin Chem* 1976; 22: 1806-11.
- Szasz G, Gerhardt W, Gruber W. Creatine Kinase in serum: 3 Further study of adenylate kinase inhibitions. *Clin Chem* 1977; 23: 1888-92.
- Szasz G, Gruber W. Creatine kinase in serum: 4. Differences in substrate affinity among the isoenzymes. *Clin Chem* 1978; 24: 245-49.
- Szasz G, Gerhardt W, Gruber W. Creatine kinase in serum: 5. Effect of thiols on isoenzyme activity during storage at various temperatures. *Clin Chem* 1978; 24: 1557-63.
- Szasz G, Waldenstrom J, Gruber W. Creatine kinase in serum: 6. Inhibition by endogenous polyvalent cations, and effect of chelators on the activity and stability of some assay components. *Clin Chem* 1979; 25: 446-52.
- Horner M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, Sampson EJ. Provisional recommendations of IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase. *Expert Panel on Enzymes. IFCC Document Stage 2, Draft 1, 1986.*
- Rosalki SB. An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. *J Lab Clin Med* 1967; 69: 696-705.
- Saks VA, Chernousova GB, Gukovsky DE y col. Studies of energy transport in heart cells. Mitochondrial isoenzyme of creatine phosphokinase: kinetic properties and regulatory action of Mg ions. *Eur J Biochem* 1975; 57: 273-90.
- Bowers Jr. GN, Bergmeyer HU, Horner M and Moss DW. Approved recommendations of IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 1. general considerations concerning the determination of the catalytic concentration of an enzyme in the blood serum or plasma of man. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18: 89-95.

ANEXO I

Método de referencia de la Federación Internacional de Química Clínica para la determinación de creatina quinasa en suero humano

El método que se describe a continuación es un resumen del borrador preparado por la Comisión de Expertos en Enzimas (EPE) de la Federación en 1986¹⁵, basado en los mismos principios enunciados en la descripción del método de rutina recomendado por la Sociedad Española de Química Clínica en este documento.

Reactivos

Los reactivos utilizados deben cumplir las condiciones de pureza y calidad establecidas¹⁵.

SOLUCIÓN I: Imidazol 115 mmol/L, EDTA 2,3 mmol/L, acetato magnésico 11,5 mmol/L, ADP 2,3 mmol/L, AMP 5,7 mmol/L, P1, P5-di (adenosin-5') pentafofato 11,5 $\mu\text{mol/L}$, D-glucosa 23 mmol/L, NADP 2,3 mmol/L, N-acetilcisteína 23 mmol/L, hexoquinasa 57,5 $\mu\text{kat/L}$ (3450 U/L), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 38,2 $\mu\text{kat/L}$ (2300 U/L), pH 6,6 a 30°C.

SOLUCIÓN II: Fosfato de creatina 45 mmol/L
 SOLUCIÓN III: Cloruro sódico 154 mmol/L

Mezclar e incubar 5 minutos a 30°C. Añadir:

Iniciador (solución II o agua)	0,200 mL
--------------------------------	----------

Procedimiento analítico

CONDICIONES OPERATORIAS

- Longitud de onda: 339 (± 1 nm)
- Paso de luz: 1,00 (± 0,001 cm)
- Volumen final de la mezcla de reacción: 2,30 mL
- Temperatura: 30,0°C (± 0,05°C)

Cada medida es el resultado de la determinación de 3 velocidades de transformación: la de la reacción total (A) la del blanco de muestra (B) y la del blanco de reactivos (C).

Tipo de determinación	Muestra	Reactivo	Iniciador
Reacción total (A)	Suero	Solución I	Solución II
Blanco de muestra (B)	Suero	Solución I	Agua
Blanco de reactivos (C)	Sol III	Solución I	Solución II

En cada caso, las soluciones empleadas deben ser previamente atemperadas a 30°C.

ESQUEMA ANALITICO

Pipetear en la cubeta:

Solución I	2,00 mL
Muestra (suero o solución III)	0,100 mL

Mezclar e incubar otros 2 minutos. Registrar el cambio de absorbancia durante un período de al menos 1 minuto.

Cálculos

El valor promedio del incremento de absorbancia con respecto al tiempo ($\Delta A/t$) para la reacción total, debe ser corregido por los valores de las velocidades de transformación en las mezclas de reacción utilizadas como blancos.

$$(\Delta A/\text{min}) \text{ corregido} = (\Delta A/\text{min})A - (\Delta A/\text{min})B$$

A y B indican los tipos de determinación referidos anteriormente.

El blanco de reactivos (C) debe mostrar un incremento de absorbancia por minuto inferior a 0,0007, valor despreciable para considerarlo en los cálculos.

En los cálculos debe utilizarse el valor corregido de $\Delta A/\text{min}$. Si el $\Delta A/\text{min}$ es superior a 0,60, debe diluirse la muestra de 5 a 10 veces con solución III y repetir la determinación.

La concentración catalítica se calcula utilizando los factores siguientes:

$$\Delta A/\text{min} \times 3651 = U/L$$

$$\Delta A/\text{min} \times 60603 = \text{nkatal/L}$$