

Sociedad Española de Química Clínica, Comité Científico
Comisión de Enzimas

“Consideraciones generales sobre la determinación de la concentración catalítica de una enzima en suero o plasma sanguíneo humano”

F.J. Gella⁽¹⁾ (Presidente), J. Carreras, J. Chabás, G. de la Fuente, J.J. Guinovart, J. Iglesias, J.M. Pena, M.C. Pastor y J.A. Gómez.

Documento A
Fase 3 Versión 2
17 de Enero de 1.983

1. Introducción

La Comisión de Enzimas del Comité Científico de la Sociedad Española de Química Clínica recomendará métodos para medir la actividad catalítica de enzimas cuyos niveles de actividad tengan valor diagnóstico en medicina.

En la elaboración de tales métodos, esta Comisión atenderá a las recomendaciones elaboradas por el Grupo de Expertos en Enzimas (EPE) de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC), a las recomendaciones publicadas por otras sociedades nacionales integradas en la IFCC, y a la situación actual de la metodología empleada en los laboratorios de química clínica españoles. Asimismo, la Comisión de Enzimas, recabará la colaboración de “laboratorios piloto” que trabajen en el desarrollo ulterior de los métodos recomendados y permitan coordinar su implantación progresivamente generalizada.

Al publicar un método recomendado para la determinación de la actividad de una enzima, esta Comisión comentará brevemente los conocimientos actuales sobre la metodología existente para la medición de esta actividad enzimática, haciendo hincapié en los motivos que deben conducir al progresivo abandono de los métodos no recomendados.

En aquellos casos en que la tecnología del método recomendado sea de difícil aplicación práctica o rutinaria en las condiciones de los laboratorios españoles, la Comisión de Enzimas estudiará las condiciones de aplicación de dichos métodos, elaborando normas que permitan su implantación progresiva.

En cualquier caso debe tenerse presente que los métodos recomendados por la SEQC no son “métodos de referencia”, término que queda reservado para los procedimientos descritos por el Grupo de Expertos en Enzimas de la IFCC. Estos “métodos de referencia” son, en general, de difícil aplicación rutinaria aunque sean indispensables para evaluar la validez de los métodos de rutina como el recomendado por la SEQC. Los métodos recomendados por esta Comisión irán acompañados de una traducción resumida del método de referencia de la IFCC así como de los estudios comparativos pertinentes.

(1) Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. (Hospital San Pablo). San Antonio M.^a Claret, 167. Barcelona-25.

2. Objetivos

La finalidad de los métodos recomendados de la SEQC será la de armonizar la máxima fiabilidad de los resultados con las condiciones óptimas de ensayo, así como lograr una máxima reproducibilidad en los análisis, tanto dentro de cada laboratorio como entre laboratorios españoles.

El método recomendado deberá mantener o incrementar el valor diagnóstico de la determinación enzimática, teniendo en cuenta el efecto que sobre la actividad total puedan tener las alteraciones en las proporciones de las diferentes isoenzimas.

La existencia de métodos recomendados no debe coartar esfuerzos innovadores y la investigación sistemática para mejorar las medidas de actividad enzimática. La aceptación científica de nuevas condiciones reconocidas como mejoras significativas debe conducir la adopción de un nuevo método SEQC quedando el antiguo desechado.

3. Definición de términos

Siempre que sea posible, se deberán seguir las recomendaciones sobre nomenclatura, clasificación y símbolos de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la Unión Internacional (IUB) (1) así como del Grupo de Expertos en Enzimología de la IFCC (2).

Se definen a continuación los términos más importantes que serán utilizados en éste y sucesivos documentos de la Comisión de Enzimas:

3.1. "Condiciones óptimas": Aquellas condiciones que dan lugar al máximo efecto catalítico a la temperatura elegida.

3.2. "Método óptimo": Aquel que se realiza en condiciones óptimas adaptadas a la obtención de la máxima reproducibilidad de los resultados. Deben evitarse las expresiones "optimado" y "optimizado".

3.3. "Método continuo": Aquel en que se realiza un registro continuo de múltiples puntos del curso de la reacción. Debe evitarse la expresión "método cinético" que incluye también los métodos a 1 ó 2 puntos (2).

3.4. Las expresiones que describen las reacciones individuales de un sistema de ensayo acoplado son las siguientes:

"Reacción primaria": Aquella catalizada por la enzima objeto de la determinación, cuando ésta se realiza por medio de una serie de reacciones acopladas.

"Reacción indicadora": Reacción acoplada a la primaria, directamente o mediante reacciones auxiliares, alguno de cuyos sustratos o productos es medido.

"Reacción auxiliar": Reacciones acopladas a la primaria y a la indicadora.

3.5. "Actividad catalítica": Es una propiedad que se mide a través de la velocidad de una reacción química catalizada, en un sistema de ensayo específico (2). Sustituye a términos como: cantidad de enzima, cantidad catalítica, actividad enzimática, etc.

4. Unidad de actividad catalítica

La unidad de expresión de la actividad catalítica según el sistema SI es el mol por segundo ($\text{mol/s, mol. s}^{-1}$); sin embargo se recomienda el nombre especial de "katal"

($\text{mol/s, mol. s}^{-1}$).

La "unidad enzimática" (U) ó $\mu\text{mol/min}$ es equivalente a $16,67 \text{ nmol/s}$ ó $16,67 \text{ nkat}$.

Si el método empleado no permite la utilización del katal, se definirá una unidad arbitraria apropiada.

La concentración de actividad catalítica ("concentración catalítica") se expresará en katal referidos a 1 litro del sistema que contiene la enzima (suero, plasma, orina, etc.). $1 \text{ U/l} = 16,67 \text{ nkat/l}$.

5. Temperatura de reacción

Ha existido notable controversia sobre la conveniencia de realizar las determinaciones de la concentración catalítica de las enzimas a una u otra temperatura, aduciendo suficientes razones como para adoptar o eliminar cualquiera de las temperaturas más comúnmente utilizadas: 25°C , 30°C y 37°C . El Grupo de Expertos de Enzimas de la IFCC utiliza en sus métodos de referencia la temperatura de 30°C (2). No obstante muchos prefieren los 37°C por razones prácticas, instrumentales, climáticas y económicas. De hecho, el Grupo de Expertos en Instrumentación de la propia IFCC ha recomendado la temperatura de 37°C para todas aquellas técnicas que precisen una incubación (entre ellas, las determinaciones de concentraciones catalíticas de enzimas).

Esta Comisión de Enzimas, ante la imperiosa necesidad de unificar este factor entre los laboratorios españoles y atendiendo a la relativamente elevada temperatura de muchas regiones de nuestra geografía, a imposiciones de instrumentación y económicas, así como a datos obtenidos sobre las temperaturas mayoritariamente utilizadas en nuestro país en estos momentos; ha decidido recomendar la adopción de la temperatura de $37,0^\circ\text{C}$. para las determinaciones de la concentración catalítica de enzimas.

La temperatura de la mezcla de reacción insertada en el diseño de medida debe variar menos de $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

6. Selección de métodos

En la selección de métodos recomendados por la SEQC además de los criterios generales indicados en la introducción, se adoptarán los establecidos por el Grupo de Expertos en Enzimología de la IFCC (2).

7. Instrumentación, equipo y reactivos

Los instrumentos y equipo empleados deben cumplir las especificaciones establecidas a fin de reducir los errores de medida entre laboratorios.

7.1. Las cubetas deberán tener caras paralelas de vidrio, cuarzo u otro material que transmita la luz sin reducir significativamente su intensidad por efectos de absorción, reflexión o dispersión.

El camino óptico interno debe ser de longitud perfectamente conocida.

7.2. Las superficies en contacto con cualquier parte de la muestra, reactivos o mezcla de reacción han de estar químicamente limpias y libres de trazas de ácidos, metales, detergentes u otros compuestos con capacidad para interferir con las medidas de actividad enzimática.

7.3. El material volumétrico de vidrio y muy especialmente las pipetas y micropipetas deben estar exactamente calibradas.

7.4. Los reactivos químicos y enzimáticos deben ser de una pureza conocida y calidad garantizada, exentos de contaminantes de los que se conozca interferencia con la reacción a medir (3, 4 y 5).

7.5. El agua utilizada en la preparación de reactivos, lavado de material, etc., debe cumplir una serie de requerimientos y especificaciones (6.7). Para la preparación de reactivos que han de conservarse por algún tiempo puede requerirse agua estéril.

7.6. El pH de los tampones debe ajustarse a la temperatura de reacción (37,0°C) y utilizando pH-metros calibrados a la misma temperatura con soluciones tampón de referencia.

7.7. Los reactivos preparados por firmas comerciales para la determinación de actividades catalíticas de enzimas, deben especificar claramente las concentraciones finales de todos los componentes de la mezcla de reacción.

8. Obtención y conservación del espécimen

La determinación de la concentración catalítica de una enzima forma parte de un proceso analítico destinado a la obtención de un resultado del que se espera una utilidad clínica. Para que ésta utilidad sea máxima las fuentes de variación que incidan sobre el resultado en cuestión deben ser conocidas y reducidas a un mínimo. Asimismo, el resultado generado será comparado con un intervalo de referencia que permita establecer la normalidad o anormalidad biológica del mismo. En todo este proceso se hace necesario establecer unas condiciones que deben aplicarse tanto a la población utilizada como referencia como a los individuos en estudio, y que tiendan a conseguir que las variaciones de los resultados sean indicativas más de los procesos patológicos en investigación que de fuentes de variación incontroladas y generadoras de confusión.

Sin desistir de los comentarios específicos que cada tipo de determinación requiera, y que se realizarán en su momento, esta Comisión de Enzimas cree necesario establecer unas normas generales a seguir en las etapas previas al ensayo de la concentración catalítica de una enzima, y que son las siguientes:

8.1 Preparación del paciente. El individuo en estudio debe mantener un ayuno previo a la extracción de 10 a 12 horas. Un período de ayuno más corto puede favorecer la presencia de quilomicrones en la muestra, dependiendo de la cantidad y calidad de la última ingesta. La presencia de estas partículas, puede provocar interferencias técnicas dependientes del tipo de procedimiento utilizado, y de tipo físico, al variar la cantidad de agua libre presente en un determinado volumen de muestra. La presencia de quilomicrones puede obligar a realizar manipulaciones de la muestra con la consiguiente modificación de la matriz que luego será utilizada para el ensayo.

Por otra parte, se han observado elevaciones de los niveles séricos de alguna enzima en el período postprandial, como es el caso de la fosfatasa alcalina.

El ayuno prolongado también puede dar lugar a resultados enmascarados debido a los cambios fisiológicos que origina en el individuo.

Los hábitos del individuo no deben ser alterados en los

días previos a la extracción. Es evidente que con la evaluación de un resultado analítico se pretende conocer el estado de un individuo. Por lo tanto, la modificación accidental de los hábitos capaces de alterar los resultados analíticos puede dar una idea falsa de dicho estado. Así por ejemplo, no es recomendable suprimir la ingesta de etanol en un bebedor habitual el día antes de la extracción, puesto que no obtendríamos una imagen de su situación habitual.

La extracción debe ser realizada en condiciones basales. Debe evitarse la realización de ejercicios importantes en las 24 horas previas a la extracción, a menos que estos sean habituales para el paciente.

Debe tenerse en cuenta, en todo caso, la medicación a que ha estado sometido el individuo en los días previos a la extracción con objeto de evaluar posibles interferencias en el ensayo.

8.2. Condiciones de la extracción. El paciente ambulatorio debe estar sentado por los menos 1 minuto antes de realizarse la extracción. Por otra parte, debe tenerse presente que un paciente encamado tiene un aumento relativo del agua intravascular, lo cual supone una dilución de los elementos no difusibles (como las enzimas), y que esta alteración en la distribución del agua corporal puede verse agravada con determinados procesos patológicos.

Debe evitarse al máximo la venostasis o reducir ésta a la mínima expresión posible.

Es preferible utilizar suero como muestra para evitar las posibles interferencias de determinados anticoagulantes. En el caso de que sea necesario utilizar plasma, deberán consultarse los anticoagulantes utilizables.

La separación del suero debe realizarse a temperatura ambiente y lo más rápidamente posible tras la extracción. En cualquier caso no debe retrasarse más de dos horas a causa del riesgo de liberación de las enzimas contenidas en los elementos celulares de la sangre aún en ausencia de hemólisis manifiesta. En cualquier caso un suero con signos de hemólisis no debe ser procesado.

8.3. Conservación de la muestra. Una vez obtenido el suero, éste debe ser conservado a 4°C y en tubos tapados hasta el momento de realizar la determinación, que no debe retrasarse más de 48 horas. Esta es una norma general encaminada a evitar los errores por evaporación del agua de la muestra e inactivación de las enzimas presentes en la misma. No obstante la estabilidad de cada una de las enzimas es variable y oportunamente se emitirán recomendaciones particulares.

Referencias

1. **Commission on Biochemical Nomenclature** (aprobada por la IUPAC y la IUB). Enzyme nomenclature. Recommendation of the Commission on Biochemical Nomenclature on the nomenclature and classification of enzymes together with their Units and the symbols of enzyme kinetics. Amsterdam, Elsevier, 1972.

2. **International Federation of Clinical Chemistry. Committee on Standards. Expert Panel on Enzymes.** Approved recommendation (1978) on IFCC Methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 1. General considerations concerning the determinations of the catalytic concentration of an enzyme in the blood serum or plasma

of man. Clin Chim Acta, 1979; 98:163 F - 174 F.

3. **American Chemical Society.** Reagent Chemicals. 4^a ed. Washington D.C., 1968.

4. **National Academy of Sciences, National Research Council Public.** Specifications and criteria for biochemical compounds. 3^a ed. Washington D.C., 1972.

5. **Bergmeyer HU.** Methods of Enzymatic Analysis. New York: Academic Press. 1974; 417-556.

6. **Winstead M.** Reagent Grade Water. American Society of Medicinal Technologists. Philadelphia, 1970.

7. **College of American Pathologists.** Water Specifications. Chicago, 1974.