

Federación Internacional de Química Clínica (IFCC)

División Científica
Comité de Enzimas

Métodos de la IFCC para la medición de la concentración catalítica de enzimas. Parte 8. Método de la IFCC para la lactato deshidrogenasa (L-lactato: NAD⁺ oxidoreductasa, EC 1.1.1.27)

R. Blais y M. Philcox^a

Traducido por Anna M.^a Padrós^b.

Revisado por la Comisión de Enzimas de la SEQC.

1. Introducción

La lactato deshidrogenasa humana es un tetrámero formado por dos tipos de subunidades, H (de *heart*, corazón) y M (de músculo). Las distintas combinaciones de estas subunidades dan lugar a las cinco isoenzimas que pueden encontrarse en los tejidos de los mamíferos. La proporción relativa de cada isoenzima que se encuentra en el suero de los pacientes está relacionada con la gravedad de la lesión en el órgano o tejido del cual procede y de la semivida de cada isoenzima específica de tejido. Es por ello que no pueden predecirse las proporciones relativas de las distintas isoenzimas en un espécimen de un paciente.

La lactato deshidrogenasa cataliza la oxidación reversible del lactato en piruvato; la reacción puede medirse fácilmente en cualquiera de los dos sentidos. Sin embargo, en este método, se ha seleccionado la reacción en sentido lactato-piruvato por los siguientes motivos: la reacción es más lineal, creciente y además permite la optimización de los sustratos (ver Apéndice A).

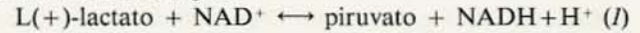
Los principios aplicados en la selección de las condiciones de medida son los mismos seguidos en las publicaciones previas del Comité (1-6). Como fuente de las enzimas se ha utilizado suero humano y extractos de tejido. La concentración final de los sustratos y el pH se han seleccionado a partir de experimentos y técnicas empíricas de optimización, y han sido confirmadas por cálculo. Las propiedades catalíticas y físicas de las isoenzimas son distintas, pero debido a la importancia de la isoenzima cardíaca (lactato deshidrogenasa 1) en el diagnóstico de la enfermedad coronaria y como marcador tumoral, este método se ha optimizado para esta isoenzima. No obstante, este método es igualmente adecuado, aunque menos óptimo, para la determinación de otras isoenzimas de la lactato deshidrogenasa que pueden encontrarse en suero.

2. Fundamento

El método propuesto para la medición de la concentración catalítica de la lactato deshidrogenasa en suero se basa en los principios subrayados por Wacker et al. (7) y Vanderlin-

de (8). Las modificaciones incluyen la optimización de las concentraciones de los sustratos y del pH así como la elección de *N*-metil-D-glucamina como solución amortiguadora.

La reacción reversible catalizada por la lactato deshidrogenasa es como sigue:



La reacción se monitoriza siguiendo la reducción del NAD⁺ a 339 nm. En equilibrio se favorece la formación de piruvato a valores de pH superiores a 9. La enzima muestra una especificidad absoluta por el isómero L(+). El L(+)- α -hidroxibutirato también puede actuar como sustrato, así como algunos de los principales α -hidroxiácidos (9).

3. Condiciones de medida óptimas

Las condiciones propuestas por la IFCC son condiciones de la reacción optimizadas, definidas (1) como aquellas más favorables tanto para las reacciones cinéticas como para los aspectos técnicos de la medición; así, por ejemplo, estas condiciones no necesariamente proporcionan la actividad máxima.

La reacción se inicia con la adición de NAD⁺ (tabla 1).

Temperatura	30,00 ± 0,05 °C
pH (30 °C)	9,40 ± 0,05
<i>N</i> -Metil-D-glucamina	325 mmol/L
L(+)-Lactato	50 mmol/L
Fracción de volumen de muestra	0,05 (1:21)
NAD ⁺	10 mmol/L

4. Instrumentación y equipo

Se requiere un espectrómetro capaz de realizar mediciones precisas a una longitud de onda de 339 nm manteniendo una temperatura constante en el compartimento de la cubeta. El equipo debe seguir las especificaciones (por ejemplo ancho de banda espectral, paso de luz, precisión en la temperatura) previamente recomendadas (1).

5. Reactivos

1. *N*-Metil-D-glucamina, C₇H₁₇NO₅, *M* 195,22 g/mol.
2. Ácido L(+)-láctico; sal de litio, C₃H₅O₃Li, *M* 96,01 g/mol.

^a Division of Clinical Chemistry,
Institute of Medical and Veterinary Science,
Frome Road, Adelaide, SA 5000. Australia.

^b Servicio de Bioquímica. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona.

- Dinucleótido de β -nicotinamida y adenina, (NAD⁺), C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂, M 663,4 g/mol.
- Ácido clorhídrico, HCl, M 36,46 g/mol (1 mol/L y 5 mol/L).
- Cloruro de sodio, NaCl, M 58,44 g/mol (150 mmol/L).

6. Pureza de los reactivos

La comprobación de la pureza de los reactivos se hace a partir de sus características funcionales (prestaciones del reactivo), químicas (evaluación analítica) e instrumentales (absorbancia o fluorescencia).

Para evitar el crecimiento de microorganismos en las soluciones deben usarse recipientes esterilizados. Todas las soluciones deben prepararse en frascos calibrados con agua que reúna las siguientes características (10): resistividad eléctrica: $\geq 2,0 \times 10^4$ ohm.m a 25 °C; pH 6,0-7,0; y silicatos <0,1 mg/L.

7. Preparación de las soluciones

I. Solución amortiguadora. Solución amortiguadora *N*-metil-D-glucamina (379,2 mmol/L, pH 9,4 a 30 °C)

Disolver 74,03 g de *N*-metil-D-glucamina en aproximadamente 800 mL de agua, ajustar el pH a 9,4 a 30 °C con HCl. Ajustar el volumen hasta 1000 mL con agua.

II. Solución de sustrato tamponada. *N*-Metil-D-glucamina/lactato de litio (solución amortiguadora *N*-metil-D-glucamina 379,2 mmol/L, pH 9,4 conteniendo 58,3 mmol/L de lactato de litio).

Transferir 80 mL de la solución amortiguadora *N*-metil-D-glucamina (Solución I) a un matraz de 100 mL que contenga un agitador magnético. Disolver 0,560 g de sal de litio (de ácido láctico) bajo agitación a temperatura ambiente. Ajustar el pH, si es necesario, a 9,4 a 30 °C con HCl 1 mol/L.

Transferir la solución a un matraz aforado de 100 mL y añadir solución amortiguadora *N*-metil-D-glucamina (Solución I) hasta un volumen exacto de 100 mL.

III. Solución reactiva NAD⁺/agua (NAD⁺, 105 mmol/L en agua).

Disolver 0,697 g de NAD⁺ en 8 mL de agua destilada en un matraz aforado de 10 mL. Una vez disuelto, añadir agua hasta un volumen final de 10 mL exactos.

IV. Solución de cloruro de sodio (154 mmol/L).

Disolver 0,9 g de cloruro de sodio en 100 mL de agua.

8. Estabilidad de las soluciones

Las soluciones I y II deben almacenarse en nevera a 4 °C o en un congelador a -20 °C. La solución III puede almacenarse a 4 °C o a -20 °C (Ver Apéndice A). No se detectó ninguna disminución en la actividad catalítica de la lactato deshidrogenasa en la mezcla de sueros cuando se almacenaron los reactivos II y III a 4 °C durante 12 días como mínimo. Si se mantienen a temperatura ambiente (20-25 °C) la contaminación bacteriana de las soluciones I y II constituye el factor limitante.

9. Obtención del espécimen y estabilidad

El espécimen preferido es el suero. Debe evitarse el uso de plasma, ya que éste puede estar contaminado con plaque-

tas que contienen altas concentraciones de lactato deshidrogenasa. La sangre debe obtenerse por punción venosa con la mínima manipulación y estasis. Debe evitarse la hemólisis para minimizar la interferencia por la lactato deshidrogenasa eritrocitaria. El suero libre de células se obtiene centrifugando la sangre, tras la retracción del coágulo, durante 10 minutos con una fuerza centrífuga relativa de aproximadamente 1000 g.

La estabilidad de la lactato deshidrogenasa varía según la isoenzima (II).

10. Medida

10.1 Condiciones de medida

Longitud de onda: 339 nm (± 1 nm)

Anchura de banda: ≤ 2 nm

Paso de luz: 10,0 \pm 0,01 mm

Volumen final de la mezcla de reacción: 3,15 mL
Temperatura: 30,0 \pm 0,05 °C (compartimento de cubeta termostatazado).

10.2 Manejo de las soluciones

Antes de pipetear las soluciones, las soluciones reactivas y el espécimen deben alcanzar la temperatura a la que se calibraron las pipetas. Sin embargo, el uso de otras temperaturas da lugar a un error relativo de tan sólo 0,000025 por cada °C de diferencia respecto a la temperatura de calibración, lo que para la mayoría de situaciones es un error despreciable.

Durante el período de preincubación las soluciones en la cubeta deben alcanzar una temperatura de 30,0 \pm 0,05 °C antes de iniciar la reacción.

10.3 Procedimiento para la medición

10.3.1 Tipo de reacciones

Ver tabla I.

Tabla I. Composición de las mezclas de reacción A, B y C necesarias para la medición de la velocidad de reacción

Tipo de reacción	Espécimen	Solución
(A) Reacción global	Suero	II y III
(B) Blanco de reactivo	Agua grado analítico	II y III
(C) Blanco de muestra	Suero	I y III

10.3.2. Reacción global

Ver tabla II.

10.3.3 Blanco de reactivo

Para la medición de la reacción de blanco de reactivo se sigue el procedimiento descrito en la tabla II, sustituyendo el suero por agua de grado analítico. El blanco de reactivo es aproximadamente 0,05 μ kat/L (3 U/L).

10.3.4 Blanco de muestra

En cada muestra se determina el blanco de muestra sustituyendo la solución I por solución II, siguiendo el mismo procedimiento descrito en la tabla II. La evidencia experimental demuestra que el blanco de muestra puede llegar a representar hasta un 10% del total de la actividad catalíti-

Tabla II. Sistema analítico para la medición de la velocidad de reacción global

Pipetear en la cubeta	Volumen	Concentración de sustancia en la mezcla final de reacción	
Solución II	2,70 mL	<i>N</i> -Metil-D-glucamina	325 mmol/L
Suero	0,15 mL	Lactato de litio	50 mmol/L
		Fracción de volumen	1: 21
Mezclar cuidadosamente, evitando la pérdida de volumen de la mezcla. Incubar la mezcla de reacción a 30 °C y esperar como mínimo 180 segundos para alcanzar la temperatura de equilibrio. Antes de continuar con el siguiente paso, debe atemperarse la solución III a 30 °C.			
Solución III	0,30 mL	NAD ⁺	10 mmol/L
Mezclar de nuevo y esperar 30 s. Monitorizar el incremento de absorbancia a 339 nm en función del tiempo, durante un mínimo de 240 s.			

ca. Sin embargo, esto parece debido al lactato presente en el espécimen (Ver Apéndice A), por lo que no debe entrar directamente en el cálculo de resultados (Ver Sección 10.5).

10.4 Intervalo de medición

Los valores de absorbancia/s en la reacción global de la lactato deshidrogenasa (A) son constantes durante un período de 240 s como mínimo para sueros con una concentración catalítica de lactato deshidrogenasa de hasta 10 $\mu\text{kat/L}$ (600 U/L). Ocasionalmente el valor de absorbancia/s puede no ser constante en el tiempo; sin embargo, si se siguen las condiciones descritas esta variación es insignificante. Si el cambio de absorbancia es superior a 0,0030 unidades/s el espécimen de suero debe ser diluido con solución IV y repetirse la medición. El período de observación para las reacciones de los blancos debe ser el mismo que para la reacción global.

10.5 Correcciones por los blancos de reacción

El índice obtenido con la reacción global (A) se corrige por el valor del blanco de reactivo (B) del siguiente modo:

$$a_{\text{corregida}} = a_A - a_B$$

Los subíndices A y B se refieren a la composición de las mezclas de reacción descritas en la tabla I. El valor corregido de a es el que se usa en los cálculos siguientes. Representa la verdadera velocidad de reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa.

El blanco de muestra no se incluye en el cálculo, ya que se considera debido a la presencia de lactato en el espécimen (Ver Apéndice A). La cantidad de lactato procedente del espécimen de suero que se encuentra en la mezcla final de la reacción global no afecta el grado de conversión por la lactato deshidrogenasa.

11. Cálculo

El coeficiente de absorción molar, ϵ , del NADH (30°C, 339 nm) es 630 m^2/mol (12,13). La longitud del paso de luz, l , es 0,01m (=10 mm). El incremento de absorbancia por segundo a 339 nm se representa por a/s . El volumen total, V , es $3,15 \times 10^{-3}$ L. El volumen de muestra, v , es $0,15 \times 10^{-3}$ L.

$$b = a \frac{3,15 \cdot 10^{-3}}{630 \cdot 0,01 \cdot 0,15 \cdot 10^{-3}} \cdot \frac{s^{-1} \cdot L}{\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{m} \cdot L}$$

$$= a \frac{3,15}{0,945} \cdot \frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$= a \cdot 3,333 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$$

$$= a \cdot 3,333 \text{ kat} \cdot \text{m}^{-3}$$

$$= a \cdot 3333 \mu\text{kat/L}$$

Nota: Este valor se calculó para un tiempo de medición de 1 s.

Si el incremento de absorbancia por 60 s a 339 nm es $A \cdot (60\text{s})^{-1}$, luego

$$b = A \cdot 3333 \mu\text{mol} \cdot (60\text{s})^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$= A \cdot 3333 \text{ U/L}$$

12. Variabilidad analítica

La imprecisión intraserial del método se ha determinado por mediciones repetidas a tres concentraciones de lactato deshidrogenasa (tabla III).

Tabla III. Imprecisión intraserial

Especimen	<i>n</i>	\bar{x}	<i>s</i>	CV (%)
Bajo	20	137,9	1,33	0,96
Medio	18	310,0	2,98	0,97
Alto	20	469,9	4,58	0,97

Actualmente se está llevando a cabo un estudio internacional de transferibilidad.

13. Intervalo de referencia

El intervalo de referencia a 30°C para este método no ha sido establecido. Sin embargo se ha determinado un intervalo de referencia a 37°C a partir de una población sana seleccionada de los exámenes de entrada a la *Medical University* de Lübeck, Alemania. Los resultados se muestran en la tabla IIA del Apéndice A.

Correspondencia:
Anna M^o Padrós
Hospital Germans Trias i Pujol
Servicio de Bioquímica
Crta. del Canyet, s/n.
08916 Badalona

Bibliografía

- Bowers GN Jr, Bergmeyer HU, Horder M, Moss DW. Approved recommendations on 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. *Clin Chim Acta* 1979; 98: 163F-74F, *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18: 89-95.

2. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1). *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24: 497-510.
3. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase; EC 2.6.1.2). *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24: 481-95.
4. Shaw LM, Stromme JH, London JL, Theodorsen L. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for γ -glutamyltransferase [γ -glutamyl(-peptide: amino acid γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.2)]. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 633-46, *Clin Chim Acta* 1983; 135: 315F-38F.
5. Tietz NW, Rinker AD, Shaw LM. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 731-48, *Clin Chim Acta* 1983; 135: 339F-67F.
6. Hørder M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, Sampson EJ. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). *JIFCC* 1989; 1: 130-9, *JIFCC* 1990; 2: 26-35, *JIFCC* 1990; 2: 80-83. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 435-45.
7. Wacker WEC, Ulmen DD, Vallee BL. Metalloenzymes and myocardial infarction II. Malic dehydrogenase and lactic dehydrogenase activities and zinc concentration. *N Eng J Med* 1956; 255: 449-56.
8. Vanderlinde R. Measurement of total lactate dehydrogenase activity. *Annals Clin Lab Science* 1985; 15: 13-31.
9. McComb RB. The measurement of lactate dehydrogenase. Homburger HA, dic. En: *Clinical and Analytical Concepts in Enzymology*. Skokie: College of American Pathologists, 1983; 157-171.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Preparation and testing of reagent water in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. NCCLS Document C3-A2. Villanova: NCCLS, 1991; 11 (13).
11. Maekawa M. Lactate dehydrogenase isoenzymes. *J Chromatog* 1988; 429: 373-98.
12. Ziegenhorn J, Senn M, Bücher T. Molar absorptivities of β -NADH and β -NADPH. *Clin Chem* 1976; 22: 151-60.
13. McComb RB, Bond LW, Burnett RW, Keech RC, Bowers GN Jr. Determination of the molar absorptivity of NADH. *Clin Chem* 1976; 22: 177-80.