

Determinación de la actividad de la dehidrasa del ácido delta-aminolevulínico (ALA-D) en sangre - Método espectrofotométrico

MTA/MB-015/A87

Palabras clave: ALA-D, sangre, plomo, espectrofotometría.

PRESENTACIÓN

El Reglamento para la prevención de riesgos y protección de la salud de los trabajadores por la presencia de plomo metálico y sus compuestos iónicos en el ambiente de trabajo (O.M. 9 de Abril de 1986, BOE 24-4-1986) incluye el nivel de la actividad de la dehidrasa del ácido delta-aminolevulínico (ALA-D) en sangre como parámetro bioquímico complementario a la plumbemia tanto en la evaluación y control de la exposición como en las medidas de prevención técnicas y medicas.

El método "*Determinación de la actividad de la dehidrasa del ácido delta-aminolevulínico en sangre- Método espectrofotométrico*" es un **MÉTODO ACEPTADO** por el [Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo \(INSHT\)](#). Como **MÉTODO ACEPTADO** se entiende un método evaluado por el INSHT, según determinados criterios de validación y que ha sido suficientemente probado mediante ensayos de colaboración entre distintos laboratorios del INSHT.

El método que se presenta es un método utilizado en el INSHT que se ajusta al Método Normalizado Europeo para la determinación de la actividad del ALA-D en sangre y redactado según ISO 78/2.

Índice

0. INTRODUCCIÓN

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

3. REACTIVOS Y PRODUCTOS

3.1. Disolución de ALA

3.2. Disolución TCA-HgCl₂

3.3. Reactivo de Ehrlich

4. APARATOS Y MATERIAL

5. TOMA DE MUESTRA

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

7. CÁLCULOS

8. BIBLIOGRAFÍA

ANEXO A

0. INTRODUCCIÓN

El método que se describe a continuación, se ajusta al Método Normalizado Europeo recogido en la [Directiva 77/312/CEE](#) (8.1 y 8.2).



1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Se describe en este método el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la determinación de la actividad de la dehidrasa del ácido delta-aminolevulínico (ALA-D) en sangre tanto a niveles fisiológicos como patológicos, utilizando un método espectrofotométrico.

La determinación de ALA-D en sangre, es aplicable, como parámetro complementario del nivel de plomo en sangre, en el estudio de poblaciones expuestas a plomo o sus compuestos iónicos, especialmente para el caso de niveles bajos de exposición (plumbemias entre 15 y 35 µg/100 ml) (8.1).

Como factores que pueden influenciar la actividad del ALA-D aparte de la exposición a plomo o sus compuestos iónicos, hay que tener en cuenta los siguientes: el cinc contrarresta el efecto del plomo sobre el ALA-D y la alcoholemia y el metil mercurio inhiben su actividad (8.4).



2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método se basa en la incubación de la enzima con un exceso de ácido delta-aminolevulínico (ALA). El porfobilinógeno (PBG), que se forma después de un cierto tiempo, se mezcla con reactivo de Ehrlich modificado y el color desarrollado se mide frente a un blanco, en un espectrofotómetro a 555 nm. La cantidad de PBG formado constituye una medida de la actividad del ALA-D.



3. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Todos los reactivos utilizados deben tener como mínimo la especificación "para análisis" y el agua bidestilada o equivalente.

3.1. Disolución de ALA

3.1.1. Reactivos y disoluciones

3.1.1.1. **Disolución A:** 1,78g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ disuelto en 100 ml de agua.

3.1.1.2. **Disolución B:** 1,38g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ disuelto en 100 ml de agua.

3.1.1.3. **Tampón 0,1 M de fosfato de sodio de pH 6,4:** 29 ml de disolución A + 71 ml de disolución B.

3.1.1.4. **Clorhidrato del ácido delta-aminolevulínico (ALA-HCl).**

3.1.2. Preparación de la disolución de ALA

Disolver 167,6 mg de ALA-HCl en la disolución B (3.1.1.2) que debe estar a pH ácido, ajustar el pH a 6,4 con la disolución A (3.1.1.1). Ajustar el volumen a 100 ml con el tampón (3.1.1.3) para obtener una disolución 0,01 M de ALA. La disolución así preparada es estable durante cinco horas.



3.2. Disolución TCA-HgCl₂

3.2.1. Reactivos

3.2.1.1. **Cloruro de mercurio II (HgCl₂)**

NOTA: SUSTANCIA MUY TOXICA. Frases (R): 26/27/28-33. Frases (S): 1/2-13-28-45. Real Decreto 2216/1985 (8.3).

3.2.1.2. **Ácido Tricloroacético (TCA)**

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 35. Frases (S): 24/25-26. Real Decreto 2216/1985 (8.3).

3.2.2. Preparación de la disolución de HgCl₂

Disolver 1,35 g de HgCl₂ en 100 ml de TCA al 10%.



3.3. Reactivo de Ehrlich

3.3.1. Reactivos y disoluciones

3.3.1.1. p-Dimetilaminobenzaldehido (pDMAB).

3.3.1.2. Ácido perclórico, d = 1,7

NOTA: SUSTANCIA COMBURENTE Y CORROSIVA. Frases (R): 5-8-35 Frases (S): 23-26-36. Real Decreto 2216/1985 (8.3).

3.3.1.3. Ácido acético glacial

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 10-35. Frases (S) 2-23-26. Real Decreto 2216/1985 (8.3).

3.3.1.4. Disolución de 0,25 g de HgCl₂ en 10 ml de ácido acético glacial.

3.3.2. Preparación del reactivo de Ehrlich

Disolver 2,5 g de pDMAB 3.3.1.1 en 50 ml de ácido acético. Añadir 24,5 ml de ácido perclórico y 4 ml de la disolución de HgCl₂ (3.3.1.4). Mezclar, enfriar y ajustar a 100 ml con ácido acético glacial en matraz aforado (si aparece coloración marrón en este punto, el reactivo se debe desechar). Debe almacenarse en botella de color topacio.



4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Tubos de polietileno o poliestireno de 5 ml, exentos de plomo, conteniendo heparina (< 5 mg).

4.2. Baño termostático, que proporcione una temperatura de 37°C ±0,2°C.

4.3. Centrífuga capaz de proporcionar 3000 rpm.

4.4. Pipetas de alta fiabilidad, capaces de dispensar 0,2 ml.

4.5. Filtros de papel Watman n° 54 o equivalente.

4.6. Espectrofotómetro o colorímetro capaz de medir la absorbancia a 555 nm.



5. TOMA DE MUESTRAS

La muestra de sangre venosa (2 ml) extraída con jeringa de polietileno o poliestireno se recoge en tubos del mismo material, conteniendo heparina (<5 mg) como anticoagulante.

Si el tiempo transcurrido entre la toma de muestra y el análisis es superior a tres horas, es necesario conservarlas refrigeradas. El periodo máximo permisible para la conservación de las muestras a esta temperatura es de 24 horas.



6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Preparación de la muestra

Preparar cuatro alícuotas de cada muestra, de 0,2 ml cada una, en tubos de plástico. Utilizar pipetas de alta fiabilidad. Tres de las cuatro alícuotas se utilizarán para determinar ALA-D y una como blanco.

Justo antes del análisis, todas las muestras se deben introducir en un baño de hielo-agua, durante 10 minutos.



6.2. Hemolisis.

Las alícuotas de sangre se hemolizan con 1,3 ml de agua, (previamente calentada a 37°C), durante 10 minutos a 37°C ±0,2°C.

Debe utilizarse una pipeta graduada de 2 ml para añadir el agua y luego mezclar cuidadosamente hasta la homogeneización.

6.3. Adición de la disolución de ALA al hemolizado.

Calentar la disolución de ALA (3.1) a 37°C, al menos 10 minutos antes de la adición. Añadir 1 ml de esta disolución al hemolizado, utilizando una pipeta aforada de 1 ml.

6.4. Preparación del blanco

Tomar una alícuota de 0,2 ml de sangre, tratada como para determinar ALA-D hasta el punto de la adición de la disolución de ALA. En lugar de esto, añadir 1 ml de la disolución TCA-HgCl₂ (3.2); seguidamente añadir 1 ml de la disolución de ALA (3.1). Para la adición de las disoluciones deben utilizarse pipetas aforadas.

6.5. Incubación

Las muestras y el blanco se mantienen durante 60 minutos a 37°C ±0,2°C en baño de agua. El tiempo de incubación comienza desde la adición de la disolución de ALA.

6.6. Interrupción de la reacción de PBG

Añadir 1 ml de la disolución de TCA-HgCl₂ (3.2) a la mezcla de incubación, utilizando una pipeta aforada de 1 ml.

6.7. Centrifugación

Centrifugar a 3000 rpm, durante 10 minutos como mínimo y filtrar con papel Whatman n° 54 o equivalente.

La fase de filtrado se incluye para evitar transferir a través de la pipeta pequeñas partículas de la superficie del líquido sobrenadante. Estas partículas producen una reacción coloreada con el reactivo de Ehrlich. Esta fase se puede reemplazar, si es necesario, por un segundo centrifugado.

6.8. Reacción con el reactivo de Ehrlich

Mezclar 1 ml del líquido sobrenadante con 1 ml del reactivo de Ehrlich (3.3) con la ayuda de una pipeta aforada de 1 ml. Utilizar un agitador para asegurar que la mezcla sea homogénea.

Dejar reaccionar la mezcla 5 minutos antes de medir la absorbancia.

6.9. Medida de la absorbancia

Medir las absorbancias de las muestras frente al blanco en un espectrofotómetro o colorímetro a 555 nm en una cubeta de 1 cm (ó 2 cm si la absorción es. muy baja).

Esta medida no se debe realizar en un tiempo superior a 10 minutos después de la adición del reactivo de Ehrlich.

7. CALCULOS

La actividad enzimática expresada en: mol ALA/ min x l eritrocitos = U/l se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Abs.} \times 100 \times 2 \times 35}{\text{Hct} \times 60 \times 0,062} = \text{U/l}$$

donde:

Abs. = Valor medio de las absorbancias de las tres determinaciones.

2 = Factor de conversión de PBG a ALA.

35 = Factor de dilución.

Hct = Valor hematocrito.

60 = Tiempo de incubación.

0,062 = Coeficiente de extinción en $l/\mu\text{mol} \times \text{cm}$.

Las unidades propuestas están de acuerdo con las recomendaciones de la Unión Internacional de Bioquímica sobre nomenclatura enzimática.

La determinación del valor hematocrito se describe en el [anexo A](#).

8. BIBLIOGRAFÍA

- 8.1. [Directiva 77/312/CEE](#) del Consejo de 29 de Marzo de 1977, D.O. n° L 105, de 28-4-1977.
- 8.2. **Berlin, A. Schaller, K.H. European Standardized Method for the determination delta-aminolevulinic acid dehydratasa activity in blood.** Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 389-390 (1974).
- 8.3. **Reglamento sobre declaración de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas.** Real Decreto 2216/1985 ⁽¹⁾ de 23 de Octubre (B.O.E. 27/ 9/85 y 9/5/86).
- 8.4. González Fernández E., M. Díaz González, J.M. Martínez Gil de Arana. **Consideraciones para la evaluación fiable de la intoxicación laboral por plomo inorgánico.** Medicina y Seguridad del Trabajo, XXX (120), 232-247, 1982.
- 8.5. Todd-Sanford. **Diagnóstico clínico por el laboratorio.** Salvat, Barcelona, 1978.

ANEXO A Determinación del hematocrito

El método que se describe en este anexo para la determinación del hematocrito, es el que utiliza la instrumentación más simple y al alcance de cualquier laboratorio normalmente dotado (8.5). En la actualidad es posible la cuantificación del hematocrito mediante otros procedimientos: micrométodo con tubo capilar, contadores y autoanalizadores hematológicos, etc.

A.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Una alícuota de la muestra se centrifuga en un tubo de Wintrobe, separándose los eritrocitos (más densos) del plasma sanguíneo. La relación entre las alturas de columna de eritrocitos y de la muestra de sangre total (eritrocitos y plasma), expresada en porcentaje, indica el hematocrito.

A.2. APARATOS Y MATERIAL

A.2.1. Centrifuga capaz de alcanzar 3.000 rpm.

A.2.2. Tubo para hematocrito de Wintrobe.

A.3. PROCEDIMIENTO

A.3.1. Homogeneizar adecuadamente la muestra.

A.3.2. Llenar el tubo de hematocrito de Wintrobe con la sangre problema mediante la ayuda de una pipeta capilar Pasteur con pera de goma. A medida que se vaya llenando el tubo, la punta de la pipeta se va elevando si bien, ha de permanecer por debajo del menisco de la sangre para evitar la formación de espuma.

A.3.3. Centrifugar durante 20 minutos a 3.000 rpm.

A.3.4. Medir las alturas de la columna de eritrocitos y la altura total.



A.4. CÁLCULOS

$$\text{Hematocrito (\%)} = 100 \times (L_1/L_2)$$

donde:

L_1 = es la altura de la columna de eritrocitos (no incluye la capa blancuzca de leucocitos y plaquetas).

L_2 = es la altura de la muestra total de sangre.



ADENDA

Revisión normativa

⁽¹⁾El Real Decreto 2216/1985 fue sustituido por el [Real Decreto 363/1995](#), que sufre periódicamente modificaciones por lo que es conveniente consultar los listados que en esta Web se trata de mantener actualizados



Para cualquier observación o sugerencia en relación con este Método puede dirigirse al

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo

[Centro Nacional de Verificación de Maquinaria](#)

Camino de la Dinamita, s/n Monte Basatxu-Cruces - 48903 BARACALDO (VIZCAYA)

Tfn. 944 990 211 - 9 44 990 543 Fax 944 990 678

Correo electrónico.- cnvminsht@mtas.es