

Bioquímica Médica II

Práctica: DETERMINACIÓN DE BILIRRUBINA TOTAL Y DIRECTA (basado en el sistema BioSystems)

GENERALIDADES

La bilirrubina es un producto de desecho derivado del grupo hemo de la hemoglobina de los eritrocitos dañados o senescentes, que son destruidos en las células retículoendoteliales. Una vez producida, la bilirrubina se transporta al hígado en asociación con la albúmina. La bilirrubina en el hepatocito se conjuga con el ácido glucurónico y se excreta en la bilis, la conjugación se hace a través de la enzima glucuronil uridil transferasa. Con base en lo anterior la bilirrubina se clasifica en conjugada y no conjugada. La bilirrubina no conjugada también se conoce como indirecta y la conjugada como directa, ello se deriva de que las técnicas iniciales de cuantificación solo permitían la cuantificación de la bilirrubina total y la bilirrubina conjugada, la bilirrubina no conjugada se determinaba restando de la total la conjugada, por tanto, la conjugada se llamaba directa y la no conjugada indirecta.

Existen una serie de enfermedades heredadas o adquiridas que afectan a la producción, captación, metabolismo y excreción de bilirrubina, resultando en una hiperbilirrubinemia. Se observa hiperbilirrubinemia no conjugada en recién nacidos (ictericia fisiológica), en un aumento de la destrucción de eritrocitos (anemia hemolítica, hematoma extenso), en eritropoyesis defectuosa así como en algunas enfermedades genéticas poco frecuentes (síndrome de Gilbert, síndrome de Crigler-Najjar y síndrome Dubin Johnson).

La hiperbilirrubinemia conjugada se asocia a una disminución en la excreción de bilis debida a enfermedades hepáticas (hepatitis o cirrosis) o bien a una colestasis intra o extrahepática.

La ictericia es una manifestación clínica de la hiperbilirrubinemia, que consiste en una deposición de los pigmentos biliares en la piel, originando coloración amarillenta de la piel y mucosas.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO (SULFANÍLICO DIAZOADO)

La bilirrubina directa presente en la muestra reacciona con el ácido sulfanílico diazoado, originando un complejo coloreado que puede determinarse espectrofotométricamente. La cetrimida solubiliza la bilirrubina indirecta permitiendo su reacción junto con la fracción directa. Los términos “directa” y “total” se refieren a las características de reacción en presencia o ausencia de solubilizantes (aceleradores). La bilirrubina “directa” e “indirecta” equivale sólo de forma aproximada a las fracciones conjugada y no conjugada.

COMPOSICIÓN

AT. Reactivo. Acido sulfanílico 29 mmol/L, ácido clorhídrico 0,2 mol/L, ceftriaxona 50 mmol/L.

AD. Reactivo. Acido sulfanílico 35 mmol/L, ácido clorhídrico 0,24 mol/L.

B. Reactivo. Nitrito sódico 11,6 mmol/L.

REACTIVOS AUXILIARES

S. Patrón de Bilirrubina. Reconstituir con 5,0 mL de agua destilada (Nota 1). La concentración viene indicada en la etiqueta del vial. El valor de concentración es trazable al Material de Referencia Certificado 916^a (National Institute of Standards and Technology, USA). Proteger el Patrón reconstituido de la luz. Estable 4 horas a 15-30° C o bien durante 2 meses a -18° C congelado en alícuotas.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivo de Trabajo: Vaciar el contenido de un vial de Reactivo B en un frasco de Reactivo AT para la determinación de bilirrubina total, o en un frasco de Reactivo AD para la determinación de bilirrubina directa.

Agitar suavemente. Si se desea preparar otros volúmenes, mezclar en la proporción: 1 mL de Reactivo B + 4 mL de Reactivo AT o AD. Estable 20 días a 2-8° C.

MUESTRAS

Suero recogido mediante procedimientos estándar.

La bilirrubina en suero es estable 2 días a 2-8° C si se protege de la luz.

PROCEDIMIENTO PARA BILIRRUBINA TOTAL

1. Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco Reactivo	Blanco Muestra	Muestra	Patrón
Agua destilada	100 µL	-	-	-
Muestra	-	100 µL	100 µL	-
Patrón (S)	-	-	-	100 µL
Reactivo (AT)	-	1,0 mL	-	-

Reactivo de Trabajo	1,0 mL	-	1,0 mL	1,0 mL
---------------------	--------	---	--------	--------

2. Agitar bien y dejar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
3. Leer la absorbancia (A) de los Blancos de Muestra a 540 nm frente a agua destilada.
4. Leer la absorbancia (A) de las Muestras y del Patrón a 540 nm frente al Blanco de Reactivos.

PROCEDIMIENTO PARA BILIRRUBINA DIRECTA

1. Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco Reactivo	Blanco Muestra	Muestra
Agua destilada	100 µL	-	-
Muestra	-	100 µL	100 µL
Reactivo (AD)	-	1,0 mL	-
Reactivo de Trabajo	1,0 mL	-	1,0 mL

2. Agitar bien y dejar reaccionar durante exactamente 5 minutos a 37° C.
3. Leer la absorbancia (A) de los Blancos de Muestra a 540 nm frente a agua destilada.
4. Leer la absorbancia (A) de las Muestras a 540 nm frente al Blanco de Reactivos.

CÁLCULOS

La concentración de bilirrubina en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco muestra}}}{A_{\text{patrón}}} \times C_{\text{patrón}} = C_{\text{muestra}}$$

En los cálculos de bilirrubina directa, se debe utilizar el valor de absorbancia obtenido para el patrón en el procedimiento de bilirrubina total.

Para lecturas efectuadas con cubetas de 1 cm, se puede aplicar el siguiente factor:

$$(A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco muestra}}) \times 7,74 = C_{\text{muestra}} \text{ (mg/dL)}$$

$$\text{Concentración masa (mg/dL)} \times 17,1 = \text{concentración sustancia (µmol/L)}$$

VALORES DE REFERENCIA

Adultos	
Total	Hasta 1,0 mg/dL = 17 μ mol/L
Directa	Hasta 0,2 mg/dL = 3,4 μ mol/L

Recién nacidos (bilirrubina total)		
Edad	Prematuros	No prematuros
Hasta 24 h	1,0-8,0 mg/dL = 17-137 μ mol/L	2,0-6,0 mg/dL = 34-103 μ mol/L
Hasta 48 h	6,0-12,0 mg/dL = 103-205 μ mol/L	6,0-10 mg/dL = 103-171 μ mol/L
3-5 días	10-14 mg/dL = 171-239 μ mol/L	4,0-8,0 mg/dL = 68-137 μ mol/L

Estos valores se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

- Límite de detección (bilirrubina total): 0,03 mg/dL = 0,51 μ mol/L
- Límite de detección (bilirrubina directa): 0,05 mg/dL = 0,85 μ mol/L
- Límite de linealidad: 15 mg/dL = 257 μ mol/L. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra 1/3 con agua destilada y repetir la medición.
- Interferencias: La hemólisis no interfiere (hemoglobina 10 g/L). La lipemia (triglicéridos > 5 g/L) interfiere. Otros medicamentos y sustancias pueden interferir.