

PRÁCTICA N°14: DETERMINACIÓN DE BILIRRUBINA DIRECTA. MÉTODO DE JENDRASSIK-GROF

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

Es transportada del bazo al hígado y se excreta en la bilis.

La hiperbilirrubinemia es el resultado de un incremento de la bilirrubina en plasma. Causas más probables de la hiperbilirrubinemia:

- Bilirrubina Total: Aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas.
- Bilirrubina Directa: Colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

2. FUNDAMENTO

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucurónido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con cafeína para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total. En esta práctica solo vamos a determinar la bilirrubina directa.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada.

3. REACTIVOS Y EQUIPOS

BILIRRUBINA (DIRECTA)

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

PELIGRO: H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P303+P361+P353: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse.

BD. Reactivo. Nitrito sódico 3,5 mmol/L. Para más advertencias y precauciones, ver la ficha de datos de seguridad del producto (SDS).

AD	Ácido sulfanílico	30 mmol/L
	Ácido clorhídrico	400 mmol/L
BD	Sodio nitrito	50 mmol/L
Patrón de bilirrubina		

S. Patrón de Bilirrubina (cod 11513). Reconstituir con 5,0 mL de agua destilada. La concentración viene indicada en la etiqueta del vial

4. MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador con cubeta para lecturas a 540 nm.

- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.

5. MUESTRAS

- Suero o plasma libre de hemólisis. Proteger de la luz. Estabilidad de la muestra: 4 días a 2-8°C o 2 meses a -20°C.

6. PROCEDIMIENTO

1°. Preparar el reactivo de trabajo: vaciar el contenido de un vial de Reactivo BD 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 BD + 4 mL de Reactivo AD. Estable 20 días a 2-8°C.

2° Pipetear las siguientes cantidades:

	Blanco reactivo	Blanco muestra	Muestra	Patrón
Agua destilada	100 µl	-	-	-
Muestra	-	100 µl	100 µl	-
Reactivo AD	-	1 ml	-	-
Reactivo de trabajo	1 ml	-	1 ml	1 ml
Patrón	-	-	-	100 µl

3° Agitar bien y dejar reaccionar durante exactamente 5 minutos a 37°C. 3.

4° Leer la absorbancia (A) de los Blancos de Muestra a 540 nm frente a agua destilada.

5°. Leer la absorbancia (A) de las Muestras a 540 nm frente al Blanco de Reactivos.

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

7. CÁLCULOS

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



8. VALORES DE REFERENCIA

- Bilirrubina total en adultos: hasta 1,1 mg/dL
- Bilirrubina directa en adultos: hasta 0,25 mg/d