

Estudio comparativo de la bilirrubina indirecta según diferentes métodos *

B. A. MENDIOROZ; E. CASTRO y M. E. CAMIOU

En comunicaciones anteriores mostramos cómo se pueden obtener valores erróneos de bilirrubina indirecta cuando se usan topes.

En el presente trabajo se estudia la bilirrubina indirecta obtenida por cálculo de la diferencia entre la cantidad de pigmento obtenida en una reacción total con alcohol y otra reacción llamada directa sin alcohol o sustancias directizantes.

Particularmente nos referiremos al método Malloy y Evelyn,¹ quienes han introducido el estudio de la bilirrubina indirecta en base a diferencias de la velocidad de reacción en la reacción directa, tomada al cabo de plazos variables y arbitrarios.^{2, 3, 4}

Además estudiamos algunos sueros por diversos métodos de distinto fundamento para mostrar la heterogeneidad de valores y la dificultad de su interpretación

MÉTODOS USADOS.— Usamos el método de Malloy y Evelyn tal cual lo hacen sus autores. Consideramos la lectura de 10 minutos como de bilirrubina directa, porque después de ese plazo hay demasiada indirecta que reacciona en forma directa.²

Obtenemos la lectura de 1 minuto según Ducci y Watson en base a este argumento y a que consideran la bilirrubina directa retardada como indirecta.²

Adaptamos la técnica de Varela Fuentes⁵ al fotolorímetro Evelyn con 0,5 c.c. suero y volumen final de 10 c.c.

Hacemos la técnica de Castex, López García y Zelasco,⁷ y la de Rappaport y Eickhorn y Gray y Whidborne adaptándolas ambas a un volumen standard de 10 c.c. con una toma común a todos de 0,5 c.c. y conservando las proporciones de los demás reactivos que usan los autores.^{6, 9}

Estas adaptaciones tienen la finalidad de poder usar el fotolorímetro Evelyn y de comparar la bilirrubina en concentraciones similares en

* Centro de Hepatología del Ministerio de Salud Pública e Instituto de Patología. Facultad de Medicina. Montevideo. Presentado en sesión del 11 de diciembre de 1952.

Cuadro I.

Material estudiado	Nº de casos	Bilirrubina total			% Bilirrubina directa 10'			Desv. Stand. σ
		Prom.	Máximo	Mínimo	Prom.	Máximo	Mínimo	
Sueros normales	220	0.48	1.19	0.14	43	91	9	13.7
Sueros hemolíticos	19	2.1	3.4	1.2	20	30	13	2.8
Sueros Biliosos (en total)	447	16.6	75	1.	61	99	5	16
Sueros Biliosos 1 a 3 mgs. %	135	2.69	3.2	1.	47	99	5	15.6
Sueros Biliosos 3 a 5 mgs. %	49	4.3	5.5	3.5	59	87	30	9.5
Sueros iBiliosos 5 a 15 mgs. %	98	9.3	15	6.	65	86	30	9.3
Sueros Biliosos 15 a 30 mgs. %	65	21.5	30	16.	65	99	22	12.8
Sueros Biliosos más de 30 mgs. %	10	45.1	75	31.	67	78	52	6.5
Bilis	33	33.5	234	0.6	69	100	19	18.2
Orina	22	6.2	43.2	0.2	73	94	35	16.6
L. C. Raquídeo	6	0.21	0.35	0.1	58	85	14	21.5

Dispersión de los valores de bilirrubina directa 10' por el método de Malloy y Evelyn en función de la concentración y del material estudiado.

los distintos métodos. Los blancos se hacen todos con los solventes correspondientes, con 0,5 c.c. de suero y 1 c.c. de diazo "A" en vez del diazo reactivo completo, con lo cual se obtiene el máximo de transparencia e igualdad.

RESULTADOS.— En el cuadro I se muestran los valores de bilirrubina, directa e indirecta obtenidos en 596 sueros clasificados clínicamente, y de acuerdo a sus concentraciones en bilirrubina, así como en 33 bilis, 22 orinas y 6 líquidos céfalorraquídeos ictericos.

En el cuadro II se muestran los resultados obtenidos con bilirrubina pura diazotada en concentraciones crecientes en distintos solventes.

Cuadro II.

Tubo	Sol. acuosa bilirrubina c.c.	Concentr. relativa	Densidad óptica 30' 540 m μ	Densidad óptica Concentración relativa
1ª Serie: Sol. Bil. + agua c.s.p. 2 c.c. + 8 c.c. N,OH 0.05 N. + 1 c.c. D. R.				
1	0.25	1	.0099	.0099
2	0.5	2	.0269	.01345
3	1.0	3	.0642	.0214
4	1.5	4	.1010	.02525
5	2.0	5	.1221	.0244
2ª Serie: Sol. Bil. + agua c.s.p. 2 c.c. + 5 c.c. etanol + agua 3 c.c. + 1 c.c. D. R.				
1	0.25	1	.0269	.0269
2	0.5	2	.0494	.0247
3	1.0	3	.0955	.03183
4	1.5	4	.1675	.04187
5	2.0	5	.2255	.0451
3ª Serie: Sol. Bil. + agua c.s.p. 2 c.c. + 5 c.c. metanol + agua 3 c.c. + 1 c.c. D. R.				
1	0.25	1	.0235	.0235
2	0.5	2	.0982	.0491
3	1.0	3	.1973	.0657
4	1.5	4	.3050	.0762
5	2.0	5	.3850	.0770

Estudio de la desviación de la ley de Beer en la diazotación de la bilirrubina en diferentes medios en función de su concentración.

Cuadro III.

Suero N°	Técnica	B. total	B. directa	B. indirecta
I) R. C.	Malloy y Evelyn (10')	12.20	8.40	3.80
	Ducci y Watson (1')	12.20	5.51	6.70
	Varela Fuentes	12.20		0.53
	C.—L. G. y Z.	7.39	2.67	4.62
II) S. d. S.	M. E. -D. W. (1')	3.01	1.40	1.61
	Varela Fuentes	3.01		D. R. Amarill
	C.—L. G. y Z.	2.88	0.91	1.97
III) L. C.	M. E. y D. y W. (1')	0.47	0.094	0.38
	Varela Fuentes	0.47		0.15
	C.—L. G. y Z.	0.49	0.0	0.49
IV) E. M.	M. E. (10')	6.06	4.41	1.65
	M. E. y D. y W. (1')	6.06	3.57	2.49
	Varela Fuentes	6.06		0.49
	Rappaport y Eickhorn	5.31	4.80	0.51

Estudio de la bilirrubinemia por distintos métodos en 4 sueros.

En el cuadro III se muestran los resultados comparativos de bilirrubina directa e indirecta obtenidos con los métodos mencionados en algunos sueros humanos.

En el cuadro IV se dan los valores de la bilirrubina indirecta calculados según Malloy y Evelyn y los de bilirrubina cloroformo extraíble según Varela Fuentes, con sus diferencias y los diagnósticos correspondientes.

COMENTARIOS.— Observando las cifras promedio del cuadro I se ve que puede establecerse una diferencia entre los sueros provenientes de ictericias hemolíticas, por derivación biliosanguínea y los normales, en base a la cantidad de bilirrubina que reacciona en forma directa en los primeros minutos.

Sin embargo, el análisis de las cifras que integran esos promedios muestra una dispersión tal, que no permite en muchos casos distinguir el origen de un suero, borrando la distinción clara y neta que se estable-

Cuadro IV.

Caso	Método Malloy y Evelyn		Bilirrubina Cloroformo extraíble		Bilirrub. I que se dice "perdida":	Diagnóstico
	Bilirrubina total mgs. %	Bilirrubina directa 10' mgs. %	Bilirrubina indirecta B.T.—B.D. mgs. %	Varela Fuentes mgs. %	B.I.—B. Cl. E. Ext. mgs. %	
1	0.35	0.17	0.18	0.12	0.06	Normal.
2	1.2	0.81	0.39	0.17	0.22	Normal.
3	2.1	0.60	1.5	1.02	0.48	Ictérica hemolítica.
4	2.1	0.80	1.3	0.47	0.83	Cirrosis portal.
5	3.4	0.59	2.81	1.55	1.26	Ictérica hemolítica.
6	7.8	5.62	2.18	0.61	1.57	Hepatitis virósica.
7	11.78	7.64	4.14	1.69	2.45	Cirrosis con hepatosis.
8	8.38	5.16	3.22	0.50	2.72	Hepatitis virósica.
9	16.48	11.22	5.26	1.77	3.49	Hepatosi grave.
10	17.70	11.84	5.86	1.63	4.23	Hepatosi grave.
11	17.1	11.8	5.3	0.32	4.96	Obstrucción biliar sin lesión del parénquima.
12	32.4	22.5	9.9	0.81	9.09	Colédocolitiasis sin lesión parenquimatosa.
13	37.4	19.2	18.2	0.75	17.45	Obstrucción biliar sin lesión parenquimatosa.
14	73.2	50.1	20.1	1.18	18.92	Obstruc. biliar con hepat.
15	68.8	47.6	21.2	0.66	20.54	Ictericia obstruictiva pura sin hepatosis.

Estudio de la diferencia existente entre la bilirrubina indirecta calculada según Malloy y Evelyn y la bilirrubina indirecta extraíble por el cloroformo. Nótese que la cantidad de pigmento que se dice se pierde por "insuficiente extracción" está en relación directa con la concentración de bilirrubina total del suero y que cifras de tal magnitud son hasta cuarenta veces superiores a las pérdidas reales comprobadas por diversos investigadores. En cambio, la B. I. Cl. Extr. se vincula al diagnóstico independientemente de la concentración.

ce con la simple y rápida diazoreacción directa de Vanden Bergh hecha con un poco de suero y una gota de diazo reactivo. La razón de este fenómeno está en que, como lo hemos demostrado en trabajos anteriores, el porcentaje de pigmento que reacciona en forma directa y su apreciación colorimétrica, depende no solamente de las verdaderas condiciones del suero, sino también de otros factores no tenidos en cuenta hasta ahora.

Estos promedios son mayores a medida que aumenta la concentración de B. en la toma de ensayo. Esto está comprobado además en el cuadro II, donde se muestra, dividiendo la densidad óptica máxima alcanzada en el período de estabilización, entre la concentración relativa de bilirrubina en la muestra, que donde mayor es la concentración, mayor es el porcentaje de pigmento que se combina al diazonio.

Considerando, de acuerdo a los promedios de porcentajes de reacción directa que hay: 20, 43, 61, 69, 73 y 58 % de bilirrubina directa en sueros hemolíticos, normales, de derivación bilio sanguínea, y en bilis, orina y líquido céfalorraquídeo, respectivamente, habría que admitir que los valores de 80, 57, 39, 31, 27 y 42 % son de bilirrubina indirecta, lo cual no concuerda con los conceptos fisiológicos sostenidos hasta el presente.

En el cuadro III se muestran los valores comparativos de bilirrubina indirecta según Malloy y Evelyn y los de bilirrubina cloroformo-extraíbles, de Varela Fuentes. Las diferencias entre ambos valores muestran que no pueden atribuirse, como hacen algunos autores, a insuficiencia de extracción por el cloroformo o a pérdidas por evaporación. Sepúlveda y Osterberg⁸ han demostrado que no hay grandes pérdidas por extracción insuficiente. Heilbrun y Hubbard⁹ dicen que las pérdidas por evaporación no alcanzan al 50 % del pigmento. Estas cifras las hemos confirmado en experiencias personales, y añadimos además que las pérdidas son de ese porcentaje en las concentraciones bajas de pigmento, del nivel de las cifras normales, pero en concentraciones mayores las pérdidas son aún relativamente menores.

Por consiguiente, no puede admitirse que se pierdan cantidades tales como 17, 18 y 20 mg. de bilirrubina que representana de 20 a 30 veces la cantidad de pigmento hallado por la extracción cloroformica.

¿De dónde proviene esta cantidad "extra" de bilirrubina indirecta calculada? Recordando experiencias anteriores,¹⁰ donde se muestra la influencia de la naturaleza de los solventes sobre los coeficientes de absorción de la bilirrubina diazotada y sobre la posición de las bandas de máxima absorción, llegamos a la conclusión de que la bilirrubina indirecta calculada es solamente un factor de relación entre la densidad óptica de los colores obtenidos con la misma cantidad de bilirrubina en distintas condiciones y las diferencias de velocidad de reacción que ellas determinan.

En efecto, el método de Malloy y Evelyn compara una reacción directa en medio acuso y que no ha llegado a su fase de estabilización con

una reacción total en alcohol metílico al 50 % medidas con una calibración hecha en alcohol etílico con trazas de cloroformo y agua, y luego resta las dos primeras entre sí. Las experiencias de Miguel García y Betolazza,¹¹ realizadas precipitando la bilirrubina directa de la bilis con sales a saturación, extrayendo con cloroformo el pigmento liberado de esa manera de sus complejos lipídicos¹² y determinando sucesivamente la bilirrubina directa e indirecta por el método de Malloy y Evelyn después de cada extracción clorofórmica, hasta casi agotamiento del pigmento de la bilis, muestran que nada tiene que ver el pigmento cloroformo soluble con la cifra constante de bilirrubina indirecta hallada por dichos autores después de sucesivas adiciones de sal, y de sucesivos agotamientos con cloroformo. Esta cifra casi constante de 12 mg. hallada cuando la bilis tiene 93 mg. % y cuando tiene 43 y 33 y 18 y 17 mg. %, representa objetivamente nada más que una relación constante entre dos circunstancias distintas en que se coloca al mismo pigmento.

En sueros humanos ictericos hemos hallado casi lo mismo: después de agotar con cloroformo se obtienen los mismos valores diferenciales de bilirrubina indirecta que antes de la extracción, lo cual demuestra que la pequeñez de la cifra de la bilirrubina indirecta cloroformo-extraíble no interviene en los porcentajes de la reacción directa y que es otro el factor que los determina.

En el cuadro IV se muestran algunos valores de sueros estudiados paralelamente con las técnicas señaladas y se aprecian las dificultades para interpretar los resultados.

La técnica de Castex, López García y Zelasco⁶ se funda en que la bilirrubina indirecta reacciona en forma directa en un 60 % de la cantidad total. Hace una reacción directa a pH 1,7, aproximadamente y una reacción total a pH 5,7, aproximadamente, con cafeína-benzoato. Tiene el mérito de que se restan reacciones obtenidas ambas en su fase de equilibrio por lo cual sus porcentajes de reacción directa tienen un carácter erróneo pero sistemático. Aplicando la fórmula de los autores al cálculo de la bilirrubina en mg. %, se obtienen valores de B. indirecta superiores a la bilirrubinemia total, lo cual prueba que el color medido lleva un incremento extraño a la concentración del pigmento y que nosotros atribuimos a las diferencias de solventes y de condiciones.

La técnica de Rappaport y Eickhorn ya fué comentada en comunicaciones anteriores, y mostramos también la artificiosidad de la bilirrubina indirecta calculada, con soluciones de bilirrubina pura en topes.

6. VARELA FUENTES, B. y RECARTE, P.— *Compt. rend Soc. de Biol.*, 116, 1193; 1934.
7. CASTEX, M.; LÓPEZ GARCÍA, J. y ZELASCO, P.— *Anal. Inst. Fis. apl. Pat. Hum.*, I, 109; 1940.
8. RAPPAPORT y EICKHORN.— *Lancet*, I, 62; 1943.
9. GRAY, C. H. y WHIDBORNE, J.— *Biochem. J.*, 41, 155; 1947.
10. SEPÚLVEDA y OSTERBERG.— *J. Lab. & Clin. Med.* 28, 1959; 1943.
11. HEILBRUN, N. y HUBBARD, A. S.— *J. Lab. & Clin. Med.*, 26, 577; 1941.
12. MIGUEL, E. J.; GARCÍA, P. y BETOLAZA, A.— *pR. (Montevideo)*, I, 114; 1951.
13. BÉNARD, H.; POLONOVSKI, M.; GAJDÓS, A.; BOURILLON, R. et TISSIER, M. *Compt. rend. Acad. sc.*, 231, 721; 1950.

Después de haber realizado este estudio tuvimos conocimiento de la comunicación de Ducci y Roeschmann confirmando nuestras conclusiones, por lo cual omitimos muchos datos referentes a la lectura de 1'.

Especificidad de la ponzoña de *Loxosceles læta* *

JUAN E. MACKINNON y JASKEL WITKIND

La gravedad de los accidentes provocados por la mordedura de la araña *L. læta* en el hombre ^{1, 2, 3, 5} nos ha inducido a probar diversos sueros antiponzoñosos, antiofídicos y antiaracnídicos contra el emponzoñamiento por *L. læta* a la vez que un suero específico.

MÉTODO.—Para preparar el suero antiloxosceles se hizo picar repetidamente en las orejas a tres conejos de más de 3 kilos de peso por ejemplares hembras de *L. læta*. El intervalo entre una y otra mordedura fué de siete a quince días. Al cabo de un número variable de mordeduras (6 a 14) ya no se observó la producción de necrosis y éscaras ni de edema equimótico. Se realizaron sangrías parciales y el suero fué conservado en la refrigeradora a 2°C con mertiolato al 1/10.000. Los otros sueros probados fueron los siguientes:

1) Suero antilatrodectus. Preparado contra *Latrodectus mactans* o "araña del lino" en el Instituto Bacteriológico C. Malbrán, de Buenos Aires.

* Departamento de Parasitología del Instituto de Higiene. Facultad de Medicina. Montevideo, Uruguay. Presentado en sesión del 23 de abril de 1953.