

Algunas consideraciones sobre bilirrubinometría sérica

Valores de bilirrubina total y fraccionada en población universitaria adulta

Dr. German F. Sáenz*

Dr. Guido Arroyo*

Eliécer Valenciano*

INTRODUCCION

A partir de la introducción de la reacción diazo para la determinación de la bilirrubina y desde que inicialmente VAN DEN BERGH y SNAPPER, citados en BULLING (5), la usaron para la medida semicuantitativa de la misma y MALLOY y EVELYN en 1937 (22), la adaptaron para fotolorimetría, se han sugerido muchas modificaciones para esa prueba clásica. Las determinaciones correctas de la bilirrubina pueden ser difíciles; con mucha razón se ha dicho que el análisis de la bilirrubinemia es en química clínica, uno de los procedimientos menos dignos de confianza. Sin embargo, métodos simples, exactos y factibles de reproducir, están ahora a nuestro alcance, si ponemos especial atención a los detalles técnicos, utilizamos productos químicos de alta pureza y usamos soluciones de trabajo recientes y patrones adecuados.

En vista del interés de todo lo concerniente a la bilirrubinometría sanguínea, creemos conveniente mencionar algunos hechos de importancia en relación con este tema, así como señalar algunas investigaciones recientes en este interesante campo de la química clínica.

De los varios métodos asequibles para la medida de la bilirrubinemia, el de MALLOY y EVELYN (22), sigue siendo el más satisfactorio y el más difundido. Se han propuesto muchas modificaciones al método original de los autores, sin embargo, pocas se apartan del fundamento técnico originalmente propuesto. Consecuentemente, la gran mayoría de los métodos disponibles para la determinación de la bilirrubina, tanto en suero como en otros líquidos orgánicos, se basan en su reacción con el ácido sulfanílico diazotado. Cuando el ácido sulfanílico en solución de ácido clorhídrico es tratado con nitrito de sodio, se convierte en

* Departamento de Análisis Clínicos, Cátedra de Hematología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

ácido diazo-bencenosulfónico, usualmente llamado ácido sulfanílico diazotado o simplemente diazo reactivo. ERLICH en 1883, citado en BILLING (5), descubrió que cuando se trataban con este reactivo soluciones de bilirrubina, se producía un color que variaba con el pH del medio, por ejemplo, rojo a baja acidez.

En la reacción de Van Den Bergh la bilirrubina se conjuga con el ácido sulfanílico diazotado, para formar la erróneamente llamada azo-bilirrubina (10). En cuanto a la naturaleza de la reacción química que se produce al reaccionar la bilirrubina en medio alcohólico con el reactivo diazo, se han suscitado varias opiniones. Se dice que la habilidad de conjugación de una sustancia con el ácido sulfanílico diazotado, es una propiedad de los compuestos pirrólicos que poseen posiciones alfa o beta libres. Los compuestos pirrólicos sin posiciones alfa o beta libres, pueden conjugarse solamente si el grupo sustituible en su molécula, por ejemplo grupos carboxilos, es rápidamente desplazado. Si tenemos en mente la fórmula de la bilirrubina, recordaremos que no hay posiciones alfa o beta libres y que los grupos OH no podrían ser fácilmente reemplazados. Por lo tanto se ha sugerido que en la reacción del diazo del ácido sulfanílico con la bilirrubina, la molécula se "parte" en dos compuestos dipirrólicos, ácido vinyl-neoxantobilirrubínico y ácido vinyl-isonoxantobilirrubínico. Estos dos compuestos tienen posiciones alfa libres y pueden por ello dar fácilmente la reacción con el diazo (10).

Quiénes interpretan en otra forma la naturaleza de estas reacciones, señalan que fundamentalmente son dos las reacciones químicas de la bilirrubina con el reactivo diazo. En la primera de ellas, la bilirrubina se "parte" en dos dipirroles, uno de los cuales se une al diazo inmediatamente (azo-bilirrubina); seguidamente y en presencia de un exceso de reactivo diazo, el formaldehído es liberado del otro dipirrol, con la formación inmediata de otra molécula de azo-bilirrubina. De hecho, las dos azo-bilirrubinas no son idénticas, pero se comportan espectrofotométricamente igual. Entonces la reacción global consiste, en la interacción de una molécula de bilirrubina con dos moléculas de reactivo diazo, para formar dos moléculas de azo-bilirrubina, esto de acuerdo con la interpretación química de la reacción diazo de ERLICH, citado en BILLING (5).

La bilirrubina permanece soluble al pH de la sangre y es llevada en el plasma, unida principalmente a la albúmina y en menor proporción a la globulina alfa₁ (31). La bilirrubina en esta forma, es decir no conjugada, es virtualmente insoluble en agua bajo las condiciones de la reacción directa de Van Den Bergh y por ello no puede acoplarse con el reactivo diazo de Ehrlich (reacción directa negativa). La ligera reacción directa (menos de 0,25 mg%) que puede encontrarse en sueros normales, puede ser atribuida a la acción disolvente de sustancias como la urea, ácidos biliares y citrato, a la regurgitación desde el hígado de pequeñas cantidades de bilirrubina conjugada y a monoglucuronidos formados por conjugación bilirrubínica en tejidos extrahepáticos (31). La adición de sustancias que contienen grupos alcohólicos (alcoholes metílico y etílico), es entonces esencial para que la reacción completa in vitro tenga lugar, tanto en sueros normales como en los de pacientes con hiperbilirrubinemia por hemólisis aumentada. La bilirrubina libre o no conjugada, reaccionará con el reactivo diazo solamente en solución alcohólica, tal y como sucede en el procedimiento de MALLOY y EVELYN y en la gran mayoría de las modificaciones que se han introducido al método. Como ambas formas de bilirrubina son solubles en alcohol, cuando se utiliza el

alcohol metílico en los procedimientos cuantitativos, el color obtenido representa la bilirrubina total (28). El alcohol metílico se usa en una concentración necesaria (40 - 50%) tanto para disolver la bilirrubina, como para evitar la precipitación de las proteínas séricas y la pérdida de pigmento por absorción (19).

Aunque otras sustancias pueden usarse para asegurar la reacción entre la bilirrubina libre o no conjugada y el reactivo diazo, entre ellas cafeína, urea y benzoato de sodio, el alcohol metílico es el más satisfactorio.

Los factores responsables de las reacciones directa e indirecta de Van Den Bergh, han sido motivo de controversia por muchos años. Evidencias relativamente recientes, han abolido completamente la idea de que tales diferencias se deben a la participación de las proteínas séricas, toda vez que ambos tipos de bilirrubina se encuentran normalmente unidos a la albúmina (25). Como el complejo bilirrubina-albúmina se disocia a un pH inferior a 5 y la reacción clásica de Van Den Bergh se lleva a cabo a un pH entre 2 y 4, ambas bilirrubinas se encuentran libres de la proteína, por lo que su acoplamiento con el reactivo diazo, con o sin alcohol, no depende de una diferente unión con las proteínas séricas (25). Como veremos más adelante, después de las experiencias cromatográficas realizadas por varios autores, se demostró que la reacción directa se debe a los mono y diglucuronatos de bilirrubina, solubles en agua y que la bilirrubina libre no conjugada es responsable de la reacción indirecta.

COLE y LATHE (11) prepararon en 1953, extractos libres de proteínas de sueros de pacientes ictericos, que analizaron por procedimientos especiales de cromatografía, logrando separar un pigmento de movimiento lento y otro más rápido. El pigmento lento dio la reacción indirecta de Van Den Bergh y era el mayor componente en los sueros de pacientes con ictericia hemolítica. El pigmento rápido, más polar, era soluble en agua y daba la reacción directa, estando presente en pequeñas cantidades en los sueros de pacientes con enfermedad hemolítica y muy abundante en los casos de ictericia obstructiva. A partir de estas notables investigaciones, se llegó a la conclusión de que la naturaleza de la reacción de Van Den Bergh depende fundamentalmente de la existencia de dos tipos de pigmento. BILLING *et al.* (6) lograron establecer la naturaleza completa de la reacción diazo de la bilirrubina y de sus glucurónidos, también por procedimientos especiales de cromatografía. De esta manera encontraron la formación de un pigmento A, dipirrólico, a partir de la bilirrubina libre diazotada, de un pigmento B, dipirrólico, a partir de la bilirrubina monoglucuronada (pigmento I). Posteriormente BILLING (5) refinó la técnica y logró cuantificar cada fracción (libre, mono y diconjugada), aplicando su método a la interpretación clínica de las ictericias.

Luego POLITTE y LUCAS (29) adaptaron el procedimiento de BILLING para uso rutinario y llegaron a la conclusión de que los cambios en el pigmento II, reflejan fielmente el grado de daño hepatocelular. De esta forma, conforme la ictericia progresa, la cantidad de pigmento II disminuye, mientras aumenta la de pigmento I y la bilirrubina no conjugada. El pigmento I se eleva primero, seguido de un aumento de la bilirrubina no conjugada. Esto sugiere que el pigmento II es un indicador sensitivo de la capacidad conjugadora del hígado, lo cual refleja la integridad funcional del órgano. BILLING (5) ha sugerido que además de la obstrucción que prevé la excreción adecuada de los pigmentos biliares, existe tam-

bién un impedimento a nivel hepático en la conversión de la bilirrubina a monoglucuronato y de ésta a diglucuronato. Por otra parte, en pacientes con ictericia obstructiva se han encontrado altos niveles de diglucuronato en la obstrucción aguda, mientras que en la ictericia hepatógena se señala elevación de los monoglucuronatos. Sin embargo, en la actualidad no poseemos una técnica analítica cuantitativa simple, para el fraccionamiento de la bilirrubina en sus formas libre y conjugada. En esto uno de los más importantes obstáculos es la falta de preparados puros de bilirrubina conjugada, que puedan servir como patrones de referencia (19, 26).

En vista de que no contamos en la actualidad con facilidades para estudios cromatográficos, seguimos utilizando el procedimiento de MALLOY y EVELYN para la estimación de los niveles de bilirrubina directa y total, aunque no tengan ningún valor para el diagnóstico diferencial de las ictericias obstructiva y hepatógena, aunque sí en el de las hiperbilirrubinemias pre hepáticas y las hepáticas y post hepáticas.

En ciertos especímenes de sueros ictericos, la reacción directa toma lugar más lentamente que en otros y este tipo de reacción ha sido la base para la clasificación de la bilirrubinemia en pronta, bifásica y retardada. Estos términos han llegado a ser anticuados y de poca utilidad práctica a pesar de la opinión de autores de tanto renombre como DUCCI y WATSON (13).

Las principales modificaciones al método químico de MALLOY y EVELYN (22), consisten en la variabilidad de los pasos que permiten el desarrollo de la reacción de color, tanto en la determinación de la bilirrubina total como de la directa. Hay procedimientos que determinan la bilirrubina total, leyendo el color desarrollado quince minutos después de que la muestra en estudio entró en contacto con el diazo reactivo de Ehrlich en solución alcohólica; en otros la lectura del color debe hacerse a los veinte o treinta minutos. Respecto a la lectura de la bilirrubina directa, la falta de uniformidad es aún mayor, puesto que se recomienda hacerla a plazos muy diferentes y que fluctúan entre uno y treinta minutos (19). Quienes recomiendan plazos breves, lo hacen por temor a que si se deja reaccionar demasiado tiempo, cierta fracción de la bilirrubina libre logre dar reacción directa; quienes sugieren los plazos prolongados se basan en el temor de que no toda la bilirrubina conjugada alcance a reaccionar en plazos demasiado breves. En todo caso es indudable que la reacción diazo, especialmente para la fracción directa, es bien compleja, no estequiométrica y se ve afectada por muchas variables (26).

ARMAS *et al.* (2), con el fin de aclarar estos puntos hicieron un estudio, basado fundamentalmente en la información que aporta la separación cromatográfica de los pigmentos biliares, es decir, no en la clásica reacción de color obtenida por diazotación, sino en la separación lograda gracias a las diferentes propiedades físico-químicas de los pigmentos, como lo preconizaron BILLING *et al.* (6), logrando obtener resultados variables, en cuanto se refiere a la correlación entre los valores de bilirrubina directa estimada químicamente y la estimación semicuantitativa por separación cromatográfica. En todo caso, los autores estimaron que la bilirrubinemia determinada a los treinta minutos, representa fielmente la bilirrubina total. Si se toma como adecuada la proporción de bilirrubina directa e indirecta estimada cromatográficamente, se encuentra que en la determinación

química, esta proporción aparece a plazos muy variables. Cualquiera de esos plazos recomendados, puede ser insuficiente en algunos casos y excesivo en otros. En fin, la demora variable en reaccionar totalmente, no guardó relación con la cantidad ni la proporción de bilirrubina directa. Esto lleva a los autores a la conclusión de que es posible que existan factores aceleradores o inhibidores de la reacción.

En el pasado no se le daba suficiente atención a la estabilidad de la bilirrubina en el plasma o suero; actualmente se sabe, que los especímenes de suero deben analizarse tan pronto como sea posible después de tomada la muestra y que en ningún caso deben dejarse expuestos a la luz o al aire, ya que los pigmentos bilirrúbinicos son sumamente lábiles y se desnaturalizan, por lo que los valores que se obtengan en esas condiciones serán bajos. La exposición de los sueros por varias horas a la luz ordinaria de los laboratorios, puede reducir el contenido de bilirrubina en un 10% o más (3); pérdidas hasta de un 50% en una hora, pueden ocurrir en sueros expuestos a la luz solar (27). La máxima sensibilidad ocurre con luz de una longitud de onda de 460 m μ (12). Estos cambios probablemente se deban a una oxidación de la bilirrubina a biliverdina, por un incremento del potencial oxidación-reducción con un aumento de la absorción a 600 m μ (8). Si los sueros no van a ser analizados inmediatamente, entonces pueden refrigerarse o congelarse sin que la luz sea problema, ya que se considera que la pérdida de bilirrubina es muy ligera cuando los sueros se guardan a 4° C por toda una noche (8).

Por otra parte, los procedimientos con diazo para bilirrubina sérica dan grandes errores en presencia de hemoglobina, posiblemente como resultado de la conversión de la hemoglobina a metahemoglobina por el ácido nitroso presente en el tubo de prueba, pero no en los controles o patrones (8). Además se han señalado muchas sustancias, drogas en especial, que pueden modificar las pruebas por bilirrubinemia, sea elevando o disminuyendo los valores reales o provocando falsos positivos o negativos (14).

Normalmente en el suero humano se encuentra sólo bilirrubina, sea conjugada o libre. Sin embargo, la biliverdina se ha reportado o reconocido en el suero de pacientes ictericos (11). Este punto es muy importante, ya que la exposición del suero icterico a la luz y al aire puede causar oxidación de la bilirrubina a biliverdina, con lo que los valores serán más bajos que los reales, por cuanto la biliverdina no responde a la reacción diazo. Por este motivo, ZARADA (33) considera que la medida única de la bilirrubina no es un reflejo del total de pigmentos biliares o bilirrúbinicos presentes en los sueros ictericos. De ahí que este autor, entre otros, haya diseñado un procedimiento para medir cuantitativamente todos los pigmentos biliares del suero, lo cual en su opinión es de mayor valor clínico, por cuanto permitirá comprender absolutamente la severidad del cuadro icterico.

La bilirrubina se ha cuantificado también por otros métodos aparte de la diazotación con ácido sulfanílico, incluidos en esto, procedimientos semicuantitativos con tabletas reactivas (20).

La determinación de este pigmento por oxidación a biliverdina en medio ácido, ha sido aplicada desde hace muchos años tanto para bilirrubinemia como para bilirrubinuria. Sin embargo estos métodos tienen varios inconvenientes, en-

tre ellos, la extracción incompleta de la bilirrubina unida a proteínas, la turbidez provocada por lípidos en la solución coloreada final y lo más importante, la producción de una reacción de color incontrolable.

FERRO y HAM (15) han propuesto un método en que usan alcohol isopropílico acidificado, para la completa extracción de la bilirrubina de las proteínas.

Luego se disuelven los lípidos con metil cellosolve y se usa cloruro férrico como agente catalítico para la oxidación de la bilirrubina, lo cual produce un color azul estable. Los autores consideran que la hemoglobina no interfiere en esta reacción si su cantidad no es excesiva y que la vitamina C en concentraciones normales no inhibe la reacción básica de oxidación; posteriormente, los autores (16) modificaron su método. La bilirrubina libre también se ha cuantificado mediante una serie de procedimientos de extracción con solventes orgánicos (31), especialmente con el uso de cloroformo y posterior reacción con diazo (7).

En la técnica de Jendrassik-Gróf, citada en BILLING (5), la bilirrubina se hace soluble con cafeína y con benzoato de sodio. En el procedimiento de MEITES y FAULKNER, preconizado por DE LA HUERGA y SHERRICK (31), se utiliza metanol acidificado con ácido clorhídrico, procedimiento muy ventajoso porque no provoca turbidez en las reacciones finales de color, es adaptable a pequeñas cantidades de suero y poco afectado por hemólisis. Desde el punto de vista fluorométrico también se ha determinado cuantitativamente la bilirrubina del suero y orina. Por ejemplo ROTH (30) constató que la bilirrubina en presencia de concentraciones apropiadas de albúmina y de iones H, se transforma en una forma fluorescente, de fácil medición, fácil de reproducir y de gran sensibilidad.

La determinación de la bilirrubina sérica tiene muchas aplicaciones en medicina clínica, no sólo por los altos niveles usualmente encontrados en enfermedades hepatobiliares, donde su determinación forma parte del llamado "mosaico hepático", sino también en condiciones hemolíticas, en las cuales la acumulación del pigmento en sangre se debe al incremento en su formación. En una condición de este tipo, la enfermedad hemolítica del recién nacido, la determinación de la bilirrubinemia es la base fundamental para el establecimiento de las medidas médico terapéuticas, así como también lo es en todos aquellos casos que cursan con "ictericia fisiológica grave" (32).

El valor de los análisis espectrofotométricos de líquido amniótico en el ante parto de pacientes con problemas de iso-inmunización, ha sido ampliamente aceptado. La mayor cantidad de pigmento bilirrubínico en esos líquidos es de bilirrubina y por ello, ensayos químicos con diazo pueden ofrecer también datos de igual valor a los obtenidos por análisis espectrofotométricos (17). Sin embargo, los niveles de bilirrubina de importancia clínica en líquido amniótico son tan bajos, que una estimación por los métodos químicos tradicionales puede no ser aplicable en ciertos casos y por ello McNAY *et al.* (21) han llegado a la conclusión de que es más útil y sensible el método espectrofotométrico.

En los niños con problemas de iso-inmunización materno-fetal, la aparición de la ictericia impone las determinaciones cuantitativas frecuentes de los niveles de bilirrubina antes de que el niño alcance la cifra de 20 mg%. Como se sabe, la prueba de Coombs negativa, la ausencia de anemia o la evidencia de iso inmunización, no invalidan esta indicación. La importancia de las estimaciones repetidas de este pigmento, ha impuesto la necesidad de desarrollar mé-

todos satisfactorios que requieren muy pequeñas cantidades de plasma o de suero, siendo todos ellos, o en su mayoría, procedimientos adaptados del método original con diazo, de MALLOY y EVELYN (1, 4, 18, 28, 31).

En la actualidad hay varios métodos que caen dentro de la categoría de micro y ultramicrotécnicas (9, 23) en los que se utilizan volúmenes de suero o plasma tan pequeños como 50 lmbdas. En la modificación al método de MALLOY y EVELYN que hemos utilizado en el presente trabajo, se ofrecen todas las alternativas que exige el trabajo rutinario en un laboratorio clínico, cuando por múltiples factores resulta imposible obtener volúmenes de sangre que nos permitan llevar a cabo la prueba con el macrométodo.

MATERIAL Y METODOS

Las muestras de suero fueron obtenidas de estudiantes universitarios de uno y otro sexo, con edades comprendidas entre los 17 y los 25 años.

Para la determinación cuantitativa de la bilirrubina sérica se siguió el método de MALLOY y EVELYN (22), con ligeras modificaciones introducidas por diversos autores, especialmente MEITES y FAULKNER, según DE LA HUERGA y SHERRICK (31).

REACTIVOS

- 1º *Metanol* (Q. P.)
- 2º *Acido sulfanílico*: 2,5 g de ácido sulfanílico se transfieren a un frasco volumétrico de 500 ml, se agregan 400 ml de agua destilada y 25 ml de ácido clorhídrico normal. Se mezcla por agitación circular hasta que todo el ácido sulfanílico entre en solución y se afora con agua destilada. Esta solución es estable a temperatura ambiente.
- 3º *Nitrito de sodio* (20% peso/volumen): Este reactivo es estable si se mantiene en botella ámbar y en el refrigerador.
- 4º *Acido clorhídrico* (1,5%)
- 5º *Reactivo diazo*: Este reactivo se prepara en un volumen determinado, de acuerdo con el número de pruebas que se vaya a efectuar. Por ejemplo, para 10 pruebas, agregar 0,02 ml de la solución concentrada de nitrito de sodio a 10 ml del reactivo de ácido sulfanílico; para 5 pruebas, mezclar 0,01 ml de nitrito de sodio y 5 ml del ácido sulfanílico; si se van a hacer menos de 5 pruebas, mezclar 0,2 ml de nitrito de sodio concentrado con 2,0 ml de agua destilada. Esta última dilución de nitrito es estable por una semana a 4°C y en botella ámbar. Para cada prueba que se vaya a realizar, se toman 0,02 ml del nitrito de sodio así diluido, se añade 1 ml del reactivo de ácido sulfanílico y se mezcla bien. Debe usarse enseguida.
- 6º *Solución patrón de bilirrubina*: En el presente trabajo se utilizó como refe-

rencia el reactivo patrón, de suero humano liofilizado con una concentración definida de bilirrubina de la casa Hyland. Asimismo, para la aplicación del mismo en nuestro fotómetro Lumetrón, utilizamos un suero diluyente libre de bilirrubina, también de la casa Hyland.

METODO

Procedimiento de rutina (0,4 ml de suero).

1. En cada uno de dos tubos o cubetas del colorímetro, que puedan contener un volumen final de 12 ml, se colocan 0,4 ml de suero bajo prueba y 4,6 ml de agua destilada.
2. A uno de los tubos (blancos del suero), se le agrega 1,0 ml de ácido clorhídrico al 1,5%.
3. Al tubo de prueba se le añade 1,0 ml del diazo reactivo fresco, se mezclan ambos tubos por rotación y se pone en marcha el cronómetro.
4. Con el blanco del suero a 100% de transmisión y utilizando una longitud de onda de 540 m μ , leer la absorción del tubo de prueba, exactamente al minuto de haber agregado el reactivo diazo. Se calcula la concentración correspondiente, en la curva patrón elaborada para estos efectos. Este será el valor correspondiente para la bilirrubina directa. Los valores obtenidos en esta ocasión, deben dividirse entre 2 a efecto de corregir la diferencia volumétrica con respecto a la bilirrubina total.
5. Para bilirrubina total, se agregan 6,0 ml de alcohol metílico a ambos tubos, se mezcla delicadamente por inversión y se dejan reposar durante treinta minutos. Al cabo de ese tiempo se lee la absorción del tubo de prueba contra el blanco del suero. La concentración de bilirrubina total se obtendrá directamente de la curva patrón. La bilirrubina indirecta será el resultado de sustraer a la total el valor correspondiente a la directa.

NOTA: Cuando los sueros en estudio presentan un índice icterico anormal, la aplicación del método permite obtener resultados de gran exactitud, aún con diluciones 1:100 del suero problema. Por este motivo es factible llevar a cabo la prueba rutinaria del macrométodo, si se parte de una dilución de suero previamente establecida, para obtener lecturas colorimétricas dentro del margen de mayor exactitud. Esto nos permite trabajar muestras de suero icterico bajo el procedimiento corriente, con la única condición de multiplicar los valores que se obtengan en la curva, por el respectivo factor de dilución. Bajo otras condiciones el procedimiento que hemos seguido permite trabajar con 20 microlitros de suero, es decir bajo condiciones de ultramicrométodos o de ultramicrotécnicas. Para ello se aplica un verdadero procedimiento microtécnico con el uso de volúmenes de reactivos y de suero muy pequeños, todo en concordancia con la proporcionalidad que exige el procedimiento de rutina o macrométodo (pueden consultarse los trabajos de DE LA HUERGA y SHERRICK (31) o la literatura correspondiente de la Casa Hyland).

Cuando lo consideramos pertinente, hicimos control de la curva patrón, así como de los reactivos correspondientes, utilizando suero bilirrubínico de referencia de la Casa Hyland y suero liofilizado Enzatrol de la Casa Dade Reagents.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se indican los valores promedio y márgenes con las respectivas desviaciones "standard" de la bilirrubinemia, tanto total como directa, de acuerdo con el método de MALLOY y EVELYN (22) ligeramente modificado. Estos hallazgos corresponden a 429 muestras analizadas, sin hacer diferencia en cuanto a sexo. En todos los casos se siguió el procedimiento rutinario (0,4 ml de suero), consignado en el capítulo correspondiente a Material y Métodos.

CUADRO 1

BILIRRUBINA TOTAL Y DIRECTA EN SUERO
(Método de MALLOY y EVELYN (22), modificado)

	BILIRRUBINA (mg%)	
	Total	Directa
Promedio (\bar{X})	0,49	0,131
Desviación "standard" (S)	0,15	0,061
Margen (*)	0,253 - 0,871	0,016 - 0,262
Número de muestras	429	429

* El margen incluye aproximadamente el 95% de los casos.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Se comentan en general los aspectos básicos de la reacción diazo para la determinación de la bilirrubinemia total y fraccionada, considerándose que de todos los métodos asequibles para la determinación, el de MALLOY y EVELYN (22), con las varias modificaciones que se le han introducido, sigue siendo el más satisfactorio. De esas modificaciones hemos usado, para obtener los valores de bilirrubina total y fraccionada en la población universitaria normal, la mayoría de las preconizadas por DE LA HUERGA y SHERRICK (31), con base en las indicaciones de MEITES y FAULKNER. Con este procedimiento de reacción con diazo se obtienen determinaciones fidedignas tanto de la bilirrubina indirecta como de la directa; es suficientemente sensitivo para la medida adecuada de valores normales, relativamente rápido para adaptarlo a emergencias, utiliza volúmenes pequeños de suero, no requiere precipitaciones de proteínas, todas las determinaciones se realizan en un solo tubo, no se presentan problemas por turbidez, utiliza reactivos estables, el margen de exactitud en las lecturas es bastante amplio de acuerdo con la Ley de Beer (0,1 - 20 mg%) y el color es estable hasta por dos horas, gracias al uso de reactivo diazo concentrado. Uno de los principales problemas que se han suscitado en torno a la cuantificación de bilirrubina, es el inherente a la calidad, pureza, estabilidad y facilidad de reproducción de las soluciones patrón para calibración y para patrones de referencia (24). Se ha demostrado que la absorción de la diazo-bilirrubina es diferente en presencia de proteínas (como en las muestras de suero), que sin ellas (como en los patrones clorofórmicos). De allí que los buenos métodos para preparar curvas patrón, sean los que usan diluciones de sueros control liofilizados, tal como se procesan las muestras incógnitas (19).

Dado que el método de MALLOY y EVELYN es sensitivo a la concentración de proteínas, resulta preferible no usar meramente diluciones en salina o en agua de aquellos sueros ictericos, sino más bien mezclas de éstos con otros de baja concentración en bilirrubina, a efecto de mantener el contenido de proteínas aproximadamente constante (3). A pesar de que el método permite establecer muy sensiblemente las diferencias entre la bilirrubina directa y la indirecta, no existen en la actualidad preparaciones estables de bilirrubina conjugada que nos faciliten la medida exacta de la forma conjugada (19, 26, 31).

El alcohol metílico se utiliza en este procedimiento en una concentración de 50%, sin que hayamos observado turbidez alguna. Aquellos procedimientos que incluyen precipitación de proteínas, sea con alcohol u otros reactivos, tienen el inconveniente de que algo del pigmento se pierde por absorción (19). En el procedimiento original de MALLOY y EVELYN (22) la dilución final del suero es de 1:40, que no es muy sensible para bajas concentraciones de bilirrubina. En el presente trabajo la dilución final del suero es de 1:30, lo que nos permite obtener fácilmente valores bajos dentro de los límites normales de acuerdo con la curva de calibración. En el pasado no se le daba mucha importancia a la estabilidad de la bilirrubina en los especímenes sanguíneos y en las soluciones patrón (3). Ahora sabemos que las muestras deben analizarse tan rápido como sea posible después de su obtención y en ningún caso mantenerse expuestas a la luz, ya que estos pigmentos, especialmente la bilirrubina conjugada y la azobilirrubina son sumamente lábiles y se transforman por oxidación en otros derivados (3, 8, 12, 27). Asimismo, la presencia de hemoglobina más allá de trazas, provoca grandes errores en la medida de la bilirrubina sérica por la producción probable de metahemoglobina (8), que condiciona la obtención de valores bajos. En la enfermedad hemolítica del recién nacido pueden estar presentes en el plasma, hematina y metahemalbúmina junto con la bilirrubina, lo cual puede causar serias interferencias. A pesar de ello, la mayoría de los autores encuentran que el método de reacción con diazo de MALLOY y EVELYN es satisfactorio para el control, pronóstico y tratamiento de aquel proceso hemolítico (19).

La mayoría de los micrométodos para cuantificar bilirrubina se basan en la reacción con diazo de 0,2 a 0,5 ml de suero (1, 4, 18, 28, 31). En los niños recién nacidos, con hematocrito alto, deben recolectarse al menos 1,8 ml de sangre, para obtener el volumen de suero necesario para la mayoría de las técnicas. La consecución de suero no hemolizado, a menudo consume mucho tiempo y por la necesidad de repetir las pruebas, se traumatizan demasiado los talones de los niños, si la fuente de sangre es esa región. De allí que algunos autores utilicen plasma en vez de suero en los procedimientos microtécnicos, diluyendo una pequeña cantidad de sangre en solución salina (1, 4) con posterior utilización del sobrenadante de plasma diluido. El método que nosotros hemos utilizado nos permite también trabajar con pequeños volúmenes de suero. En realidad el procedimiento de rutina es un micrométodo, de acuerdo con la definición de volúmenes (9, 23). Por otra parte, la técnica se adapta a volúmenes menores de suero icterico que por lo tanto pueden diluirse y para los cuales puede aplicarse con gran exactitud el mismo método y la misma calibración patrón. Asimismo es perfectamente factible realizar ultramicrotécnicas con volúmenes de suero de 0,050 ml o menos, si se toman las medidas técnicas del caso y se cuenta con fotómetros

y cubetas adecuadas para volúmenes pequeños.

Los valores normales para adultos jóvenes, dados por diversos autores, difieren ligeramente según el método empleado. En los trabajos que no se apartan del fundamento básico del procedimiento de MALLOY y EVELYN (22), es decir, reacción con diazo con ácido sulfanílico y disolución en alcohol metílico, encontramos valores de $0,54 \pm 0,24$ mg% de bilirrubina total (19); $0,2 - 1,1$ mg% para bilirrubina total ($\bar{X} = 0,62$ mg%) y $0,1 - 0,6$ mg% ($\bar{X} = 0,31$ mg%) para bilirrubina directa (31); $0,1 - 0,4$ mg% de bilirrubina directa y $0,3 - 1,3$ mg% para la total (3); $0,1 - 1,0$ mg% para total y $0 - 0,2$ mg% para la bilirrubina directa (25); $0,05 - 0,24$ mg% de directa ($\bar{X} = 0,10$ mg%) y $0,26 - 1,4$ mg% ($\bar{X} = 0,60$ mg%) para bilirrubina total (26).

En nuestro estudio sobre valores de bilirrubina total y fraccionada en población universitaria adulta, no encontramos entre los sexos variaciones en el contenido de estos pigmentos. El valor medio de las muestras analizadas fue de $0,49$ mg%, con valores margen de $0,25 - 0,87$ mg% para bilirrubina total y de $0,13$ mg% con $0,02 - 0,26$ mg% de margen, para la directa. Los resultados obtenidos, a pesar de que concuerdan en general con los de los autores consultados, tienden a ser ligeramente más bajos para la población estudiada, guardando un estrecho paralelismo con los de NOSSLIN (26) y MIALE (25), especialmente.

RESUMEN

Se comentan aspectos generales sobre los procedimientos técnicos para bilirrubinometría y se señalan conceptos sobre bilirrubina directa e indirecta y la interpretación clínica de estas fracciones.

Se hacen determinaciones séricas de bilirrubina total y directa en población universitaria adulta de uno y otro sexo, con edades entre los 17 y los 25 años, de acuerdo con el procedimiento de MALLOY y EVELYN (22), modificado. No se señalan diferencias en cuanto a sexo. Los valores encontrados en 429 muestras analizadas, fueron los siguientes:

Bilirrubina total: $\bar{X} = 0,49 \pm 0,15$ (2 S.D.)

Bilirrubina directa: $\bar{X} = 0,131 \pm 0,061$ (2 S.D.)

BIBLIOGRAFIA

1. ALTMANN, V., M. NELSON y D. PERNOVA.
Determination of plasma bilirubin by a simple micromethod. *Am. J. Clin. Path.* 26 (8): 956, 1956.
2. ARMAS, R., JACQUELINE LALIVE y G. LOBÓ.
Análisis crítico de la determinación de la bilirrubinemia y del valor diagnóstico de la bilirrubina directa por el método de Malloy y Evelyn. *Rev. Méd. Chile* 96 (12): 794, 1969.
3. BAUER, J. D., P. G. ACKERMANN y G. TORO.
Bray's Clinical Laboratory Methods. 7th ed., VIII + 764 pp. C. V. Mosby Co., Saint Louis, U. S. A., 1968.

4. BAULANGER, J. P. y LILLIAM FERRO.
A rapid and simple determination of bilirubin in infants. *Am. J. Clin. Path.* 42 (5): 557, 1964.
5. BILLING, B. H.
A chromatographic method for the determination of three bile pigments in serum. *Am. J. Clin. Path.* 8: 126, 1955.
6. BILLING, B. H., P. G. COLE y G. H. LATHE.
Excretion of bilirubin as a diglucuronide giving the direct Van Den Bergh reaction. *Biochem. J.* 65: 774, 1957.
7. BRODERSEN, R., L. SPARRE y I. VIND.
Normal bilirubin concentration and the occurrence of other bile pigments in human blood sera, *Scand. J. Clin. y Lab. Invest.* 15 (15): 523, 1963.
8. CARAWAY, W. T.
Chemical and diagnostic specificity of laboratory tests. Effect of hemolysis, lipemia, anticoagulants, medications, contaminants and other variables. *Am. J. Clin. Path.* 37 (5): 445, 1962
9. CARAWAY, W. T. y H. FANGER.
Ultramicro procedures in clinical chemistry. *Am. J. Clin. Path.* 25 (3): 317, 1955.
10. CARTWRIGHT, G. E.
Diagnostic Laboratory Hematology. 4th. Ed., XIII + 441 pp. Grune y Stratton, N. Y., 1968
11. COLE, P. G. y G. H. LATHE.
The separation of serum pigments giving the direct and indirect Van Den Bergh reaction. *Am. J. Clin. Path.* 6: 99, 1953.
12. CREMER, R. J., P. W. PERRYMAN y D. H. RICHARD.
Influence of light on the hyperbilirubinemia of infants. *Lancet*, 274: 1.094, 1958.
13. DUCCI, H. y C. J. WATSON.
The quantitative determination of the serum bilirubin with especial reference to the prompt reacting and the chloroform-soluble types. *J. Lab. Clin. Med.* 30: 293, 1945.
14. ELKING, MARY P. y H. F. KABAT.
Drug induced modifications of laboratory test values. *Am. J. Hosp. Pharm.* 25: 485, 1968.
15. FERRO, P. V. y ANNA BELL HAM.
A new colorimetric method for the determination of total serum bilirubin. *Am. J. Clin. Path.* 40 (2): 209, 1963.
16. FERRO, P. V. y ANNA BELL HAM.
A new method for total, free and conjugated serum bilirubin. *Am. J. Clin. Path.* 47 (4), 472, 1968.
17. GAMBINO, S. R. y V. J. FREDA.
The measurement of amniotic fluid bilirubin by the method of Jendrassik-Gróf. *Am. J. Clin. Path.* 46, 2, 1966.

18. GRAHAM, J. H.
A simple micromethod for determination of bilirubin in plasma. *Am. J. Med. Sc.* 230: 633, 1955.
19. GRAY, C. H.
Bile pigments in health and disease, X + 101 pp. Charles C. Thomas. Springfield, U. S. A., 1961.
20. HART, CLAUDIA y D. PLAUT.
Evaluation of a bilirubin screening test. *Am. J. Clin. Path.* 45 (4): 510, 1966.
21. McNAY, A., A. OXLEY y W. WALKER.
Comparison of chemical and spectrophotometric methods of estimating bilirubin in amniotic fluid. *Am. J. Clin. Path.* 50 (1): 122, 1968.
22. MALLOY, H. T. y K. A. EVELYN.
The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.* 119: 481, 1937.
23. MEITES, S.
Microchemistry or macrochemistry — What's the difference? *J. Am. Med. Tech.* 28: 6, 1966.
24. MEITES, S. y J. W. TRAUBERT.
Use of bilirubin standards. *Clin. Chem.* 11,7, 1965.
25. MIALE, J. B.
Laboratory Medicine Hematology. Third Ed., X + 1.257 pp. C. V. Mosby Co. Saint Louis, 1967.
26. NOSSLIN, B.
The direct diazo reactions of bile pigments in serum: experimental and clinical studies *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 12 (49):1, 1960.
27. O'HAGAN, J. E., T. HAMILTON, E. G. LE BRETON y A. E. SHAW.
Human serum bilirubin: An immediate method of determination and its application to the establishment of normal values. *Clin. Chem.* 3: 609, 1957.
28. OSER, B. L.
HAWK's Physiological Chemistry 14 Ed., XVI + 1.472 pp. McGraw-Hill Book Co., N. Y., U. S. A., 1965.
29. POLITTE, L. L. y F. V. LUCAS.
Paper chromatographic studies of the three serum bile pigments. *Am. J. Clin. Path.* 42 (1): 22, 1964.
30. ROTH, M.
Dosage fluorimétrique de la bilirubine. *Clin. Chim. Acta.* 17: 487, 1967.
31. SUNDERMAN y SUNDERMANN.
Hemoglobins, its precursors and metabolites. XII + 360 pp. J. B. Lippincot Co., Pha., S. A., 1964.
32. TOVAR-ESCOBAR, G., M. RAGA y J. ARENDS.
Hiperbilirubinemia del recién nacido de causa desconocida. *Ach. Venez. Puericult. Pediat.* XXII (73-74): 395, 1959.
33. ZARADA, R. A.
A simplified procedure for the determination of total bile pigments in jaundice serum. *Am. J. Clin. Path.* 45 (1): 70, 1966.