

Departamento de Química Orgânica e Biológica
Diretor: Prof. Dr. Fonseca Ribeiro

NOVA TÉCNICA PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ICTÉRICO EM BOVINOS. APLICAÇÃO CLÍNICA (*)

(A NEW TECHNIQUE FOR THE DETERMINATION OF ICTERIC
INDEX IN CATTLE. CLINICAL APPLICATIONS)

Romeu Diniz Lamounier

Determinar índice ictérico, significa medir a intensidade da côr amarela do sôro sanguíneo, devida a bilirrubina, por meios físicos, principalmente pela comparação colorimétrica entre o sôro sanguíneo e soluções padronizadas.

A côr amarela do sôro e mesmo do plasma sanguíneo é consequência dos pigmentos neles contidos, entre os quais se encontra a bilirrubina.

A bilirrubina apresenta normalmente modificações na sua taxa, como já vimos, fazendo com que a intensidade da côr amarela do sôro ou plasma seja variável, não só nas diversas espécies animais, mas, também, nos animais de uma mesma espécie, assim como no mesmo animal, em épocas diferentes. Normalmente ocorrem variações, na intensidade da côr amarela do sôro ou plasma, consequentes a modificações limitadas na taxa de bilirrubina, no meio circulante. Em casos patológicos, como nas icterícias, onde há hiperbilirrubinemia, ultrapassando portanto o limite da normalidade, as variações da icterícia são muito mais pronunciadas. E' precisamente a determinação dessas variações na intensidade da côr amarela do sôro, a finalidade do emprego do Índice Ictérico.

A bilirrubina não é o único pigmento que dá ao sôro a côr amarela, havendo outros, entre os quais, os carotenos; KOLMER⁶ e CORONA⁷, afirmam não ter sido levado na devida consideração este pigmento, quando se determina o índice Ictérico, pois, na alimentação do homem, podem-se encontrar alimentos ricos em caroteno como a cenoura, o espinafre, a abóbora, etc.; nos diabéticos, lembram aqueles autores a possibilidade de uma pseudoicterícia consequente a um maior teor de caroteno no sangue e, CORONA⁷ diz que as cifras do índice Ictérico são maiores que as normais e geralmente se encontram dentro da zona de icterícia latente. Ora, se no sôro sanguíneo do homem não se encon-

(*) Extraído da tese apresentada para concurso de professor catedrático da 16.^a Cadeira Patologia e Clínica Médicas (2.^a Cadeira) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

tram de hábito, os carotenos em quantidade significativa, não poderemos dizer o mesmo do sôro de animais domésticos, como é principalmente o caso dos bovinos. Nesses, a coloração amarela do sôro (ROUSSEU & ROUSSEL⁸), é devida muito mais aos carotenos do que à bilirrubina. Esta última, aliás não existe, ou melhor, é negativa à prova indireta de van den Bergh, segundo RUBINO & BARROS³; ao passo que EULER, citado por RIMINGTON⁹, dosando caroteno no sôro sanguíneo de bovinos, encontra 0,47 mg por 100 centímetros cúbicos de sôro.

Do exposto verifica-se que, para a determinação do Índice Ictérico no sôro de bovinos, há maior dificuldade do que a simples comparação colorimétrica direta, utilizada correntemente para o sôro humano.

Muito embora não tenhamos encontrado referências valiosas na literatura consultada sôbre o Índice Ictérico em bovinos, não será difícil julgar do seu valor semiológico não só para seguir a evolução das icterícias como também para diagnóstico das icterícias latentes.

PARTE EXPERIMENTAL

Nosso método baseia-se na solubilidade da bilirrubina e do caroteno do plasma em álcool e clorofórmio. Sendo o caroteno solúvel em éter de petróleo, poderá ser separado facilmente da bilirrubina.

Reativos:

- A) Solução aquosa a 12,5% de sulfato de sódio anidro. A principal finalidade do sulfato de sódio é facilitar a dissolução da bilirrubina.
- B) Mistura, em partes iguais, de álcool a 96° com clorofórmio puro.
Utilizamos o álcool por ser o dissolvente da bilirrubina indireta e o clorofórmio da bilirrubina direta.
- C) Álcool a 96°.
Empregado para precipitar as proteínas e completar a diluição a 1/10.
- D) Éter de petróleo puro.
Usamos o éter de petróleo puro para extrair o caroteno e por não acarretar nem descolorar a bilirrubina, quando se realiza a leitura logo após.
- E) Anticoagulante. O escolhido por nós foi o líquido de Heller e Paul (KRACKE¹⁷). Empregado na proporção de 1 cm³ de anticoagulante para 10 cm³ de sangue ou seja, 1,5 cm³ para os frascos de 15 cm³. Uma vez nos frascos, estes eram levados à estufa para evaporação da água, de

forma a obtermos o anticoagulante sêco, evitando assim uma diluição do plasma a ser utilizado. Tivemos oportunidade de trabalhar com o sôro e com plasma. Comumente o sôro é mais límpido, entretanto, fomos levados a trabalhar com plasma pelas razões:

- a) Dispondo de um centrifugador, obtinhamos rapidamente o plasma, ao passo que o sangue dos bovinos para desossar, geralmente demora mais de 24 horas e nem sempre se obtém sôro suficiente quando a coleta é feita nas quantidades habituais.
- b) Pela nossa técnica, o plasma sofre, primeiramente uma precipitação de suas proteínas pelo álcool, a seguir uma filtração; por estas razões a turvação inicial do plasma, assim como uma hemólise ligeira, não impedem e nem ao menos dificultam a leitura.

Material:

- 1 — *Padrão* — Solução estoque de bicromato de potássio a 1/100, (dissolver 1 g. de bicromato de potássio em água, ajuntar 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado e diluir até 100 cm³ num frasco volumétrico). A partir desta solução preparamos o nosso padrão do seguinte modo: tomamos 21 tubos e neles colocamos, da solução estoque de bicromato de potássio, 0,0cm³ — 0,1cm³ — 0,2cm³ — 0,3cm³ — 0,4cm³ — 0,5cm³ — 0,6cm³ — 0,7cm³ — 0,8cm³ — 0,9cm³ — 1,0cm³ — 1,1cm³ — 1,2cm³ — 1,3cm³ — 1,4cm³ — 1,5cm³ — 1,6cm³ — 1,7cm³ — 1,8cm³ — 1,9cm³ — 2,0cm³ — completando com água destilada o volume contido em todos os tubos para 10cm³. Correspondem êstes padrões respectivamente a 0 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20 unidades convencionais e arbitrárias do Índice Ictérico. Pela nossa técnica o plasma sofre uma diluição igual a 1/10, por isto mesmo, tomamos uma nova série de 21 tubos de vidro neutro aos quais juntamos as soluções correspondentes às unidades acima, agora diluídas a 1/10 e no volume de 10 cm³ em cada tubo; a seguir foram fechados à chama e rotulados com o número indicativo das unidades respectivas.

Nota: Tem sido recomendado um único tubo padrão ou seja aquele correspondente a 1 unidade. Em outras técnicas aconselham-se diversos tubos, correspondentes respectivamente a 1 - 3 - 5 - 7 - 10 - 12 - 15 - 20 - 30 - 50 - 100

unidades, como se pode observar em CORONA⁷ e KOLMER & BOERNER⁵. Não adotamos tais critérios de padrões, visto o primeiro parecer pouco prático, pois, quase sempre ao determinarmos o Índice Ictérico temos que proceder à diluição; no segundo critério, os primeiros tubos diferem entre si de 1 unidade, enquanto os outros se distanciam entre 3 - 5 - 10 - 20 e 50 unidades. De fato, é mais nítida a diferenciação da coloração dos padrões do segundo método; o erro é todavia bem maior e, por isto, resolvemos modificá-lo utilizando 21 tubos escalonados de 1 em 1 unidade. Não fomos além de 20 unidades por acharmos desnecessário, sendo mais cômodo fazer a diluição do que novos padrões de pouco uso na prática. Na rotina pode-se usar somente 10 tubos da solução padrão de bicromato da nossa escala correspondentes às unidades de números pares ou ímpares.

- 2 — *Comparador* — Para maior facilidade na leitura, utilizamos um comparador de madeira, pintado de negro, com 3 perfurações no sentido vertical, incompletas na parte inferior do comparador e 3 outras perfurações atravessando horizontalmente as primeiras. Este comparador é do tipo de Clark e Lubs, utilizado em bacteriologia para leitura colorimétrica de pH.
- 3 — *Frascos e agulhas para colheita de sangue* — Utilizamos frascos escuros com capacidade para 15cm³, com rólhas de borracha e agulhas comuns para punção venosa em bovinos. Como a ação da luz altera a bilirrubina (CORONA⁷) com o tempo, resolvemos usar frascos escuros, si bem que nunca demorássemos mais de 12 horas para determinar o Índice Ictérico em nossas amostras.
- 4 — *Centrifugador* — E respectivos tubos, como também tubos de ensaios para receberem o plasma que é retirado por meio de conta-gotas.
- 5 — *Pipetas* — De 2cm³ volumétrica — 1 para cada amostra de plasma.
De 2cm³ volumétrica — 1 para a solução de sulfato de sódio a 12,5%.
De 10cm³ graduada em cm³ — 1 para a mistura de álcool e clorofórmio.
De 10cm³ volumétrica — 1 para o álcool a 96°.
- 6 — *Erlenmeyer* — De 25cm³ — 1 para cada amostra de plasma.

- 7 — *Funis* — De 15cm³ — 1 para cada amostra de plasma.
- 8 — *Papel de filtro* — "Whatman n.º 1". A filtração em papel de filtro foi utilizada para retirar os prótidos. A centrifugação não nos oferece muita vantagem, se bem que sejam os pigmentos adsorvidos pelo papel em quantidade insignificante.
- 9 — *Tubos de vidro neutro* — Iguais aos utilizados no padrão de bicromato de potássio, para receberem o filtrado.

Técnica — Pipetar 2cm³ de plasma para um Erlenmeyer; acrescentar 2cm³ da solução de sulfato de sódio a 12,5% ; homogenizar; acrescentar 6cm³ da mistura de álcool e clorofórmio em partes iguais. Agitar. Completar o volume para 20cm³ com álcool a 96°, juntando-se 10cm³ do mesmo. Agitar fortemente. Filtrar em papel de filtro "Whatman n.º 1". As proteínas precipitadas ficam retidas no filtro. Receber o filtrado em tubos de vidro neutro iguais aos do padrão. Acrescentar ao filtrado, aproximadamente 7cm³ de éter de petróleo e agitar enérgicamente. Esperar que o éter de petróleo sobrenade dissolvendo o caroteno e ficando na parte inferior um líquido límpido. Raramente este se apresentará turvo; quando isto ocorrer, é suficiente um rápido aquecimento em banho-maria a 37°C para torná-lo límpido.

Levar o tubo a determinar o Índice Ictérico para a perfuração central do comparador e nas perfurações laterais colocar dois tubos padrões aos quais mais se aproxime à côr do plasma em exame, fazendo a leitura contra um fundo branco.

Dá-se como resultado as unidades dos dois padrões entre os quais a côr mais se aproxima.

Se, o tubo a determinar o Índice Ictérico, estiver acima de 20 unidades, que é o último tubo da nossa escala, faz-se nova diluição em álcool, evitando sempre retirar o éter de petróleo sobrenadante.

ESTUDO DE CORRELAÇÃO ENTRE O ÍNDICE ICTÉRICO E A PROVA DE VAN DEN BERGH

Idealizada e escolhida a técnica, necessitávamos compará-la a outro processo aceitável, afim de conhecer sua eficiência.

Para verificar a correlação entre a prova de van den Bergh e o Índice Ictérico, de nossa técnica, fizemos a seguinte experiência:

Tomamos um plasma icterico *A* e um plasma *B*, não icterico, mas contendo caroteno; em diluições conhecidas fizemos a prova indireta de van den Bergh e determinamos o Índice Ictérico, obtendo o seguinte resultado:

Plasma A cm ³	Plasma B cm ³	Índice ictérico		van den Bergh	
		Valores encontrados (unidades)	Valores teóricos (unidades)	Valores encontrados (mg %)	Valores teóricos (mg %)
0	10	0	0	0	0
1	9	2,5	2,1	0,18	0,19
2	8	4,5	4,2	0,35	0,38
3	7	6	6,3	0,55	0,57
4	6	8	8,4	0,74	0,76
5	5	11	10,5	0,93	0,95
6	4	12,5	12,6	1,12	1,15
7	3	14,5	14,7	1,31	1,34
8	2	16,5	16,8	1,49	1,53
9	1	18	18,9	1,69	1,72
10	0	21	21	1,91	1,91

Nota: — Os valores teóricos foram calculados, tanto para o índice ictérico como para o van den Bergh, a partir do exame da última mistura.

Pela análise dos resultados verifica-se (*):

“1.º) Há uma correlação positiva, praticamente perfeita, entre os resultados teóricos e os obtidos por qualquer dos dois métodos; o coeficiente de correlação entre os valores teóricos e os de van den Bergh assume a cifra de $r = + 0,99993$ e entre os valores teóricos e os do Índice Ictérico, a cifra de $r = + 0,99981$; como se vê não existe senão uma insignificante vantagem a favor do método de van den Bergh.

2.º) Os valores encontrados por qualquer dos dois métodos podem ser ôtimamente expressos como função linear dos valores teóricos. Para o primeiro deles, a referida função assume a forma:

$$Y = 0,014 (21782) + 1,012 (2057) X$$

em que X = valor teórico; Y = valor pelo método de van den Bergh; as cifras entre parêntesis, denotando as ultteriores aproximações no termo independente de X e no termo em X. A reta definida pela equação acima possui um coeficiente de adaptabilidade aos valores efetivos dados por um valor extraordinariamente elevado, pois sendo + 1 o valor máximo admissível para R, esta característica assume a cifra de + 0,99993. Para o índice Ictérico, obtivemos o seguinte resultado:

$$Y = 0,413 (4073) + 1,050 (4884) X$$

(*) Agradecemos aos Profs. Drs. Pedro Egydio de Carvalho e Walter Leser pela inestimável colaboração que nos ofereceram na interpretação estatística desses resultados.

em que X e as quantidades entre parêntesis têm o mesmo significado anterior, e Y representa os valores do Índice Ictérico. No caso em questão R assumiu a cifra de 0,99815, a qual com diferença insignificante da anterior, mostra o ótimo grau de adaptabilidade da reta obtida com os resultados do Índice Ictérico”.

Ficou assim perfeitamente demonstrado que a nova técnica de determinação do Índice Ictérico em bovinos, por nós idealizada, apresenta resultados comparáveis aos da prova de van den Bergh e que portanto pode ser usada como meio de diagnóstico fácil e eficiente. Importa referir também que a nossa técnica terá aplicações para outras espécies animais, toda vez que se deseje eliminar da leitura a cor interferente do caroteno.

DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ICTÉRICO EM BOVINOS, SEGUNDO NOSSA TÉCNICA

Com a finalidade de demonstrar a praticabilidade e eficiência do nosso método de determinação do Índice Ictérico, tivemos oportunidade de executar 213 testes entre bovinos sacrificados no frigorífico Armour, representando animais de sexo e idades diferentes. Esta oportunidade devemos à gentileza do Sr. Oswaldo F. de Souza, inspetor federal. Desejamos assinalar que, nos bovinos de matadouro, colhíamos o sangue sempre por punção venosa, logo depois de “marretados”.

QUADRO SINÓTICO DO ÍNDICE ICTÉRICO ENCONTRADO EM BOVINOS

Unidades do índice icterico	Vacas		Bois		Vitelos		Touros		
	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	Total	%
0-2	28	70,0	70	60,0	27	50,0	1	126	59,15
2-4	11	27,5	41	35,0	22	40,0	1	75	35,21
4-6	1	2,5	6	5,0	5	10,0	0	12	5,63
Total	40		117		54		2	2173	99,99

Por êsse quadro verifica-se que as variações máximas do Índice Ictérico vão de 0 a 6 unidades. Êstes valores não são significativamente influenciados pelo sexo, idade e pela gestação.

Entre os animais de matadouro, há alguns em que a inspeção “post-mortem” revelou alterações patológicas não influenciando o Índice Ictérico, assim:

Animal n.º 64, cisticerco calcificado nos músculos da cabeça, índice 2-4.

Animal n.º 77, tuberculose generalizada dos órgãos da cavidade torácica, índice 0-2.

Animal n.º 97, caso de adipoxantose, índice 4-6.

Animal n.º 108, tuberculose pulmonar, índice 0-2.

Animal n.º 171, cisticercose do coração, índice 0-2.

Animal n.º 179, bronco-pneumonia, índice 0-2.

Animal n.º 201, cisticercose do coração, índice 0-2.

Animal n.º 206, cisticercose nos músculos da cabeça, índice 0-2.

Além disso, procuramos observar se a gestação influenciaria o índice Ictérico.

Em 27 vacas, sendo 15 gestantes e 12 não gestantes, observamos índice Ictérico entre 0-2 em 14 gestantes e 11 não gestantes, índice Ictérico entre 2-4 em uma gestante e em uma outra não gestante.

COFFIN²⁰ assinala um índice Ictérico entre 6 a 15 unidades como o normal para vacas e pelas nossas observações acreditamos que não procurou eliminar o caroteno.

APLICAÇÃO CLÍNICA

Além desses animais com exames "post-mortem" tivemos oportunidade de determinar o índice Ictérico em animais cujo exame clínico não revelou icterícia e encontramos: índice 0-2 em 11 bovinos adultos, de sexo, raça e alimentação diferentes, em que determinamos o índice Ictérico; em 8 bezerros de raça variável: deram índice entre 0-2 em quatro deles e 2-4 em outros quatro.

Além desses animais, clinicamente normais procuramos outros em premunicação contra a babesiose e anaplasiose (*):

Um lote de 8 novilhas na fase final de premunicação apresentou um índice 0-2.

Um outro lote de 15 bovinos (12 tourinhos e 3 novilhas), antes da premunicação teve índice de 0-2; no 9.º dia e 21.º dia, após a inoculação, embora já apresentassem babesiose e anaplasiose o índice permaneceu entre 0-2. Aliás, nesta premunicação, nunca se permite ultrapassar de 5 a 10% de hemátias parasitadas, aplicando-se a tripaflavina toda vez que isto se faz necessário.

Desejamos assinalar que alguns animais, embora pouco numerosos, não deixam de apresentar grande interesse:

Vaca n.º 49, neste animal o índice Ictérico determinado em 1-10-1945, foi igual a 0-2; em 31-10-1945, foi igual a 0-2; em 11-2-1946

(*) Agradecemos ao Dr. Amâncio Cândido Esquibel a gentileza de nos ter facilitado estes exames.

deu índice Ictérico igual a 4-6 e com sua morte, a necrópsia nos revelou tuberculose generalizada, apresentando também lesões nodulares no fígado.

Bezerro n.º 16 ()*, com icterícia clínica, deu índice próximo de 48 unidades e o teste de van den Bergh direto foi positivo.

Bezerro n.º 64 ()*, com subicterícia clínica deu índice 12-14 e pela prova de van den Bergh indireta deu coloração rósea distinta.

Bezerro n.º 67 ()*, clinicamente apresentava dúvidas se havia ou não icterícia e o Índice Ictérico foi encontrado entre 2-4 unidades enquanto a prova de van den Bergh indireta apresentava cor rósea insignificante.

Bezerro n.º 48, caso de subicterícia clínica e cujo índice foi próximo de 21 unidades.

CONCLUSÕES

1.º) — Não é possível determinar Índice Ictérico em bovinos pelo método de Meulengracht.

2.º) — Não é possível diferenciar a carotenemia da bilirrubinemia pelos processos usuais.

3.º) — Com a nova técnica, por nós idealizada para a determinação do Índice Ictérico, diferencia-se a bilirrubina do caroteno no soro ou plasma de bovinos.

4.º) — O Índice Ictérico normal em bovino é variável entre 0 e 6 unidades.

5.º) — Há correlação positiva entre o Índice Ictérico determinado por nossa técnica e a prova de van den Bergh indireta. Existe uma insignificante vantagem da prova de van den Bergh sobre o Índice Ictérico porém, este pela sua simplicidade, poderá ser utilizado com maior frequência na clínica veterinária.

6.º) — Aplicamos com êxito a nova técnica em casos clínicos de icterícia.

7.º) — A nossa técnica para determinação do Índice Ictérico em bovinos poderá provavelmente ser utilizada também para outras espécies animais.

CONCLUSIONS

1.º) — *It is not possible to determine icteric-index in cattle by the method of Meulengracht.*

2.º) — *It is not possible to differentiate the carotenaemia of the bilirubinaemia by the usual proceeding.*

(*) Estes animais são casos clínicos de babesiose, cujo plasma nos foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Laerte Machado Guimarães, ao qual aqui deixamos nossos agradecimentos.

3.^o) — *With the new technique, by us idealised for the determination of the icteric-index, it is possible to differentiate the bilirubin of the carotene in the serum or plasm of cattles.*

4.^o) — *The normal icteric-index in cattle varied between 0 and 6 units.*

5.^o) — *There is correlation between icteric-index determining our technique and the indirect proof of van den Bergh. It exists an insignificant advantage in the proof of van de Bergh upon our icteric-index, but this for its simplicity, may be utilized with greater frequency on veterinary clinic.*

6.^o) — *We had applied with success our technique in jaundice clinic cases.*

7.^o) — *Our technique for determination of icteric-index in cattle may probably be, utilized also by the other species of animals.*

BIBLIOGRAFIA

- 3 — RUBINO, M. C. — BARROS, L. A. — 1944 — Sôbre valores normales en la composición química de la sangre de los bovinos (*Bos Taurus*) y sus variaciones en los animales atacados de tristeza bovina (*Piroplasmosis* y *Anaplasmosis*). *Arch. Soc. Biol.* Montevideo, 11 (3-4): 109-20.
- 5 — KOLMER, J. A. — BOERNER, F. — 1939 — Técnica de laboratorio. Trad. 2.^a ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara.
- 6 — KOLMER, J. A. — 1946 — O diagnóstico clínico pelos exames de laboratorio. Tomos I e II. Trad. ed. americana. Rio de Janeiro, Editora Guanabara.
- 7 — CORONA, T. L. — 1942 — Tratado de Química normal y patológica de la sangre. 3.^a ed. Santiago de Chile, Ediciones Ercilla S. A.
- 8 — ROUSSEU, D. B. — ROUSSEL, G. — 1934 — Le sérum normal. Paris, Masson et Cie.
- 9 — RIMINGTON, C. — 1937 — The occurrence of carotinoids in animal sera. The danger of mistaking carotinaemia for bilirubinaemia. *Jour. South African Vet. Med. Ass.*, 8 (2): 7-9.
- 17 — KRACKE, R. — 1943 — Doenças do sangue e atlas de hematologia. Trad. 2.^a ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara.
- 20 — COFFIN, D. L. — 1945 — Manual of Veterinary Clinical Pathology. Ithaca, Comstock Publishing Company, Inc.