

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**PARAMETROS EMPLEADOS PARA EFECTUAR UN  
EXANGUINEO TRANSFUSION EN NIÑOS CON  
HIPERBILIRRUBINEMIA NO CONJUGADA**

**T E S I S  
P R E S E N T A D A P O R  
M I G U E L A N G E L T A B O A D A F L O R E S  
P A R A O B T E N E R E L T I T U L O D E  
Q U I M I C O F A R M A C E U T I C O B I O L O G O**

**1 9 8 2**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION.....	1
GENERALIDADES.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	44
TECNICAS.....	47
RESULTADOS OBTENIDOS.....	73
DISCUSION .....	82
CONCLUSIONES.....	88
RESUMEN.....	90
BIBLIOGRAFIA.....	92

## INTRODUCCION

En los últimos años la exangineotransfusión ha sido la terapia de elección para la prevención del Kernieterus, en presencia de niveles elevados por rápido aumento de la bilirrubina no conjugada. Esta técnica puede servir como un estándar, para la comparación con otros métodos terapéuticos, desde el punto de vista de eficacia, rapidez y seguridad (mortalidad menor del 3%).

La investigación de las causas de hiperbilirrubinemia no conjugada, es importante en todos los casos, pero es de mayor ayuda en el manejo del desorden fundamental que en el manejo de la ictericia misma.

La ictericia en el recién nacido es probablemente el problema más común encontrado durante los primeros días de vida ~~postnatal~~. Esta coloración amarillenta de la piel, esclerótica y suero, se observa en aproximadamente el 50% de todos los recién nacidos de término y en un 80% de los recién nacidos de pretermino. No obstante esta alta incidencia, el cuerpo médico-responsable está obligado a distinguir entre una ictericia natal fisiológica de una ictericia natal patológica, y niveles de Bilirrubina no conjugada normales y niveles potencialmente dañinos durante la corta permanencia del niño en el hospital.

A causa de la alta incidencia de la hiperbilirrubinemia

mia no conjugada y sus potenciales efectos dañinos, una de decisión de exanguineotransfusión rápida es necesaria, antes de que ocurra un daño cerebral irreversible (Kernicterus).

Por lo anterior, es necesario que el personal médico y paramédico que está al cuidado de los recién nacidos tenga una alta comprensión del metabolismo de la bilirrubina, la patogénesis de la ictericia, y los métodos comunes de tratamiento.

Los objetivos de este trabajo son: 1) Reunir los estudios realizados en el laboratorio clínico y banco de sangre (servicio de transfusiones) realizados ya sea en la madre o en el recién nacido, para 2) Hacer una mejor evaluación del problema de hiperbilirrubinemia no conjugada. 3) hacer una revisión bibliográfica para conocer más del metabolismo de la bilirrubina en el neonato, o sea 3.1) su producción, 3.2) transporte, 3.3) conjugación, y 3.4) eliminación, para 3.5) así comprender mejor el aumento anormal de la bilirrubina no conjugada, y 3.6) sus consecuentes daños en el recién nacido. 4) emplear las técnicas más comunes en el servicio de transfusiones y el laboratorio clínico para colaborar más rápida y eficientemente en los casos de exanguineotransfusión.

Los análisis de laboratorio y servicio de transfusiones incluyeron:

- a).- Determinación de los niveles de bilirrubina no conjugada pre y postexanguineotransfusión.

- b).- Determinación de la hemoglobina pre y postexanguineotransfusión.
- c).- Determinación del grupo y Rh de la madre y el recién nacido.
- d).- Prueba de Coombs directo e indirecto (eluido).
- e).- Determinación del pico de absorción en líquido amniótico.
- f).- Selección de la sangre empleada para la exanguineotransfusión.

5) Clasificación de la población de recién nacidos - exanguinados segun el diagnóstico, analizar estadísticamente si se cumplieron los objetivos propios de la exanguineotransfusión como son el de disminuir los niveles de bilirrubina, eliminación de anticuerpos cuando sean los causantes de la ictericia y corregir la anemia cuando se presente.

Estos estudios fueron realizados en un período de 2 años, en los cuales se estudio un total de 379 recién nacidos - exanguinados por hiperbilirrubinemia no conjugada, en el hospital de gineco-obstetricia No. 3 del Centro Médico la Raza - (IMSS). El presente trabajo es un informe de los casos trabajados y sus resultados. Existen muchos puntos por estudiar aunque los parametros aquí reportados son los de mayor importancia para determinar que niño es exanguinado y la sangre que habrá de emplearse para lograr resultados satisfactorios.

## GENERALIDADES

La bilirrubina es el producto de degradación de la molécula hemo, del cual la principal fuente es la destrucción de los eritrocitos envejecidos por hemólisis activa de ciertas enfermedades, o por destrucción de eritrocitos de una hemorragia interna; así como la destrucción de eritrocitos por anticuerpos maternos en problemas de incompatibilidad; pequeñas cantidades de hemo derivan de la eritropoyesis inefectiva y del cambio de hemo en el sistema transportador de electrones. La producción de bilirrubina es más rápida en el feto y en el recién nacido que en el adulto, principalmente a causa de que la vida promedio de los eritrocitos es de  $88 \pm 15$  días, comparado con un promedio de 120 días en los eritrocitos de los adultos.<sup>8</sup>

La molécula de bilirrubina es un tetrapirrol no polar de peso molecular de 585, fácilmente soluble en solventes no polares, pobremente soluble en agua, con una alta afinidad por la albúmina sérica, y por algunas membranas y sustancias intracelulares. El pigmento no conjugado tiene un característico color amarillo-anaranjado y un espectro con absorción máxima a 440-460 nm. Es producida por la degradación de la molécula hemo a biliverdina por la hemo oxigenasa microsomal y la subsecuente reducción de biliverdina a bilirrubina por la re-

liverdin reductasa. La bilirrubina no conjugada aparece en la circulación unida firmemente a la albúmina sérica, la bilirrubina está también enlazada a la albumina extravascular y a la piel.<sup>2, 8, 13</sup>

El complejo albúmina-bilirrubina es transportada al hepatocito donde la bilirrubina es absorbida intracelularmente por una proteína específica enlazante (La Y-Proteína o Ligandina) y transportada al sistema microsomal donde es conjugada -- con la UDP-ácido glucorónico por acción de la enzima glucuronil transferasa<sup>2</sup> y de éste modo pasar de la fracción indirecta a la fracción directa. El diglucoronido de bilirrubina (acompañado por una pequeña cantidad de monoglucuronido) es soluble -- en agua y es excretado de las células hepáticas hacia el canalículo biliar y de ahí pasa al intestino delgado vía el sistema biliar. La forma soluble en agua de la bilirrubina no es -- reabsorbida en el intestino delgado. La acción bacteriana posteriormente convierte la bilirrubina hacia urobilinógeno y estercobilinógeno, la forma en la cual es usualmente eliminada.-- En ausencia de flora bacteriana intestinal, considerables cantidades de bilirrubina pueden ser encontradas en el intestino delgado y excremento de los recién nacidos. La fracción de la bilirrubina directa que no es reducida por la acción bacteriana a urobilinógeno puede ser excretada en las heces o puede ser

reciclada al hígado vía la circulación enterohepática de la bilirrubina. Esta recirculación de bilirrubina es el resultado - de la acción de la enzima beta-glucuronidasa sobre la bilirrubina conjugada. Esta enzima actúa desconjugando la bilirrubina conjugada y llevándola a la forma no conjugada, la cual es entonces absorbida hacia la circulación sanguínea atravesando la mucosa intestinal y retornar al hígado vía el sistema de circulación para su conjugación,<sup>13</sup> Figura No. 1.

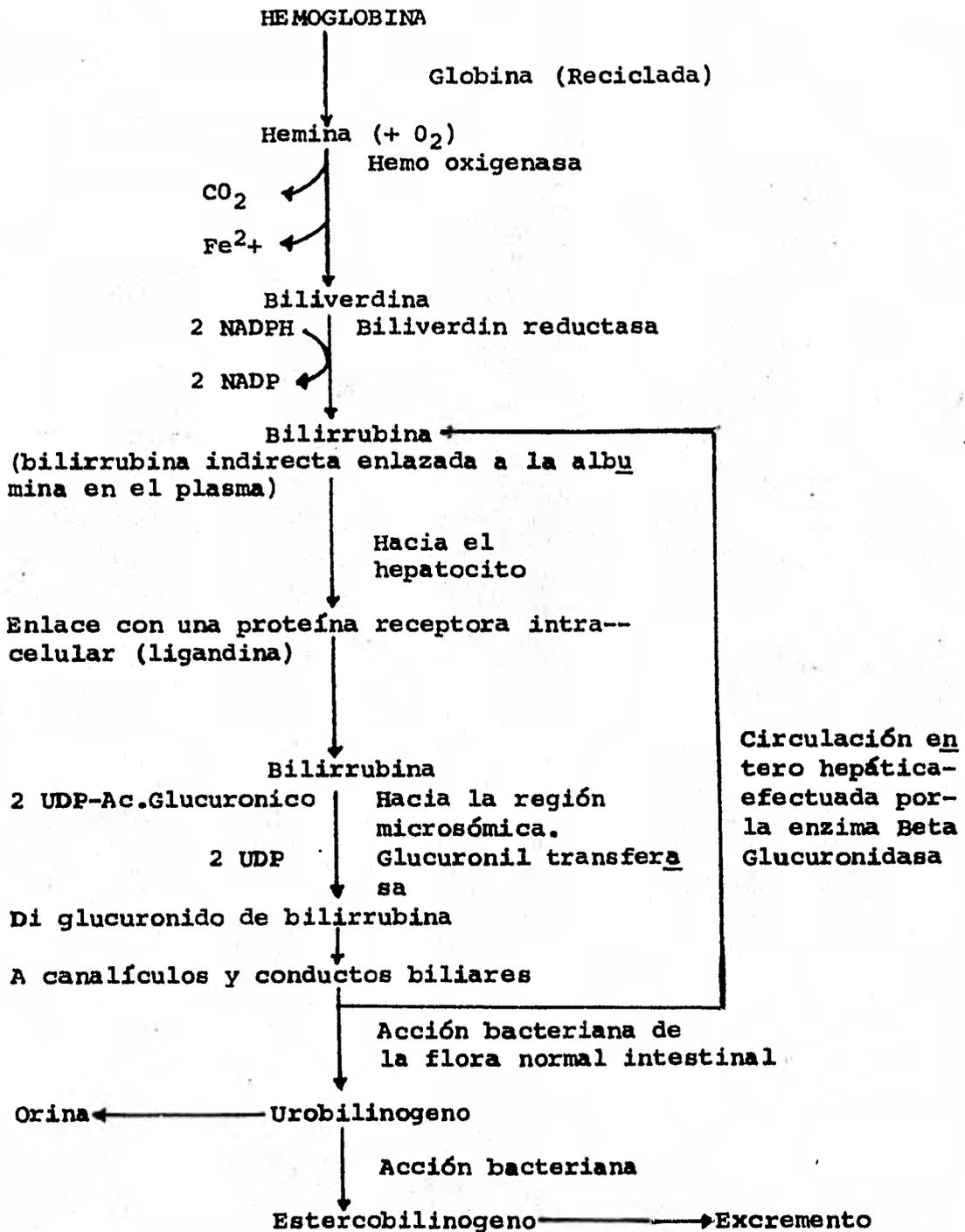


Figura No. 1

Degradación de la porción hemo de hemoglobina a bilirrubina, y el mecanismo por el cual la bilirrubina es conjugada y excretada.

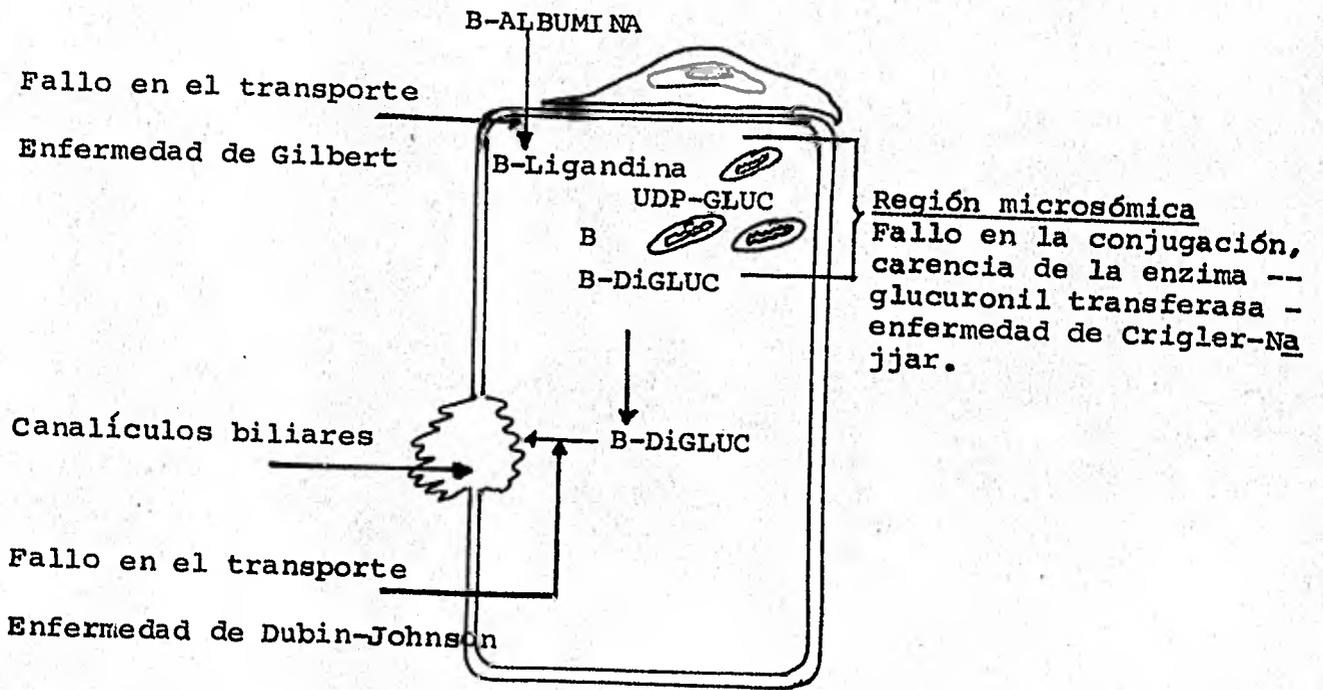


Figura No. 2

Representación esquemática del transporte de bilirrubina en el hepatocito.

Durante la vida fetal, la ruta intestinal para la -- eliminación de la bilirrubina no funciona, y el feto depende -- de la placenta y de la circulación materna para la eliminación de la bilirrubina. Con respecto a esto es importante saber que la bilirrubina no conjugada en el feto para su transporte a -- través de la placenta depende de la solubilidad lipídica y sus características polares. La conversión hacia su forma de diglu -- curonido en el feto puede ocurrir después de una transfusión -- intraperitoneal presumiblemente por la estimulación de la glu -- curonidación hepática, y como resultado de la presencia de la -- fracción conjugada de acción directa soluble en agua, la cual -- no puede transportarse a través de la placenta y aparecerá co -- mo altos niveles de bilirrubina conjugada en la sangre del cor -- dón inmediatamente después del parto. Desde la doceava semana -- de gestación en adelante la bilirrubina no conjugada puede ser -- encontrada en el líquido amniótico, su concentración disminuye -- hacia el término como resultado del incremento de líquido am -- niótico. El origen de la bilirrubina no está bien conocido aun -- que se sugiere que puede ser una difusión a través de la piel -- y el cordón, una fuente importante. La orina fetal es una fuen -- te poco común de bilirrubina en líquido amniótico. Como en el -- adulto, el riñón del neonato normalmente no excreta cantidades -- significativas de bilirrubina no conjugada. Los niveles de bi -- lirrubina en el líquido amniótico muestran alguna correlación --

con la edad de gestación de un feto normal, y su uso para la confirmación de la edad de gestación por análisis de líquido amniótico está siendo sugerido. Sin embargo, la determinación de los niveles de bilirrubina en líquido amniótico es más utilizada para predecir la severidad de una eritroblastosis por incompatibilidad a Rh. Como se verá más adelante.

#### EL ENLACE DE LA BILIRRUBINA A LA ALBUMINA

La bilirrubina es relativamente insoluble en el agua a pH fisiológico y es transportada en el plasma unida firmemente a la albúmina. Como se muestra en la figura 3, toda menos una pequeña fracción de la bilirrubina plasmática es transportada en su estado enlazado; la fracción no enlazada presenta un equilibrio con la fracción enlazada que usualmente está en el orden de 1.5 a 2.0  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$  o menos.<sup>2</sup> La importancia de la unión a la proteína es la que da un efecto protector contra el Kernicterus; la bilirrubina que está firmemente unida a la albúmina es incapaz de difundirse hacia el sistema nervioso central. Análisis del complejo albúmina-bilirrubina muestran que la albúmina tiene un sitio de unión con una alta afinidad por la bilirrubina y sitios de unión adicionales (probablemente 2) de mucha menor afinidad.<sup>2</sup> Teóricamente una mol de albúmina deberá transportar una mol de bilirrubina fuertemente enlazadas;

esto debiera significar que con una concentración de albumina de 3.5 g/100 ml (aprox. 500  $\mu$ M/l) y que el suero de un infante enlace hasta 29 mg/100 ml (aprox. 500  $\mu$ M/l) de bilirrubina. Experiencias clínicas y de laboratorio han mostrado que la capacidad de unión de la bilirrubina y la albúmina sérica de infantes es usualmente del 50 al 90% de lo que teóricamente se espera y que la capacidad de enlace de la albúmina sérica es usualmente menor en infantes enfermos que en infantes sanos.<sup>2</sup> La concentración de albúmina sérica aumenta conforme avanza la edad de gestación y en cualquier etapa de la gestación -- tiende a ser más alta en infantes sanos que en enfermos. En resumen, la albúmina de infantes de términos sanos parece capaz de enlazar más bilirrubina por gramo de proteína que infantes enfermos o de pretérmino. Esta diferencia está probablemente relacionada a la presencia de alguna otra sustancia que ocupe los sitios de unión de la albúmina sérica del niño -- en competencia directa con la bilirrubina o que cambie la estructura geométrica de la albúmina disminuyendo así la facilidad de enlace a la bilirrubina. Entre las sustancias reconocidas que compiten con la bilirrubina están los barbitúricos -- (sulfisoxjanoles, gantrisin), salicilatos (aspirina), hematina, ácidos grasos no esterificados, furosemide (lasix), clorotiazida (diuril), preservativos de benzoato de ciertas drogas -- inocuas (tales como diasepam),<sup>2</sup> el potencial efecto desplaza-

dor de bilirrubina por los medicamentos deberá ser considerado antes de que sean administrados a infantes recién nacidos o a las madres antes del parto o a las madres lactantes. Desafortunadamente, muy comunmente los medicamentos y sus vehículos no han sido estudiadas adecuadamente a este respecto.

Un número de pruebas clínicas están siendo propuestas para determinar la concentración de bilirrubina libre -- plasmática o de la capacidad de enlace de la bilirrubina a -- los sitios de afinidad a la albúmina como un índice de riesgo al Kernicterus. Evidencias clínicas útiles sugieren que el -- riesgo del Kernicterus es muy grande, luego que la capacidad de los sitios de enlace con alta afinidad han sido saturados con bilirrubina. Esto parece marcar una diferencia entre sujetos, especialmente entre prematuros e infantes enfermos, en la capacidad de enlazar bilirrubina a su albúmina. Los sitios de unión secundarios en la albúmina parecen ofrecer poca o -- ninguna protección; luego que los sitios de alta afinidad están saturados con bilirrubina, el resto de bilirrubina es mucho más débilmente enlazada y más fácilmente difusible a pH fisiológico, la concentración de bilirrubina libre en equilibrio con los sitios de unión débiles de la albumina rápidamente se acerca o excede los límites de solubilidad de la bilirrubina.<sup>2</sup>

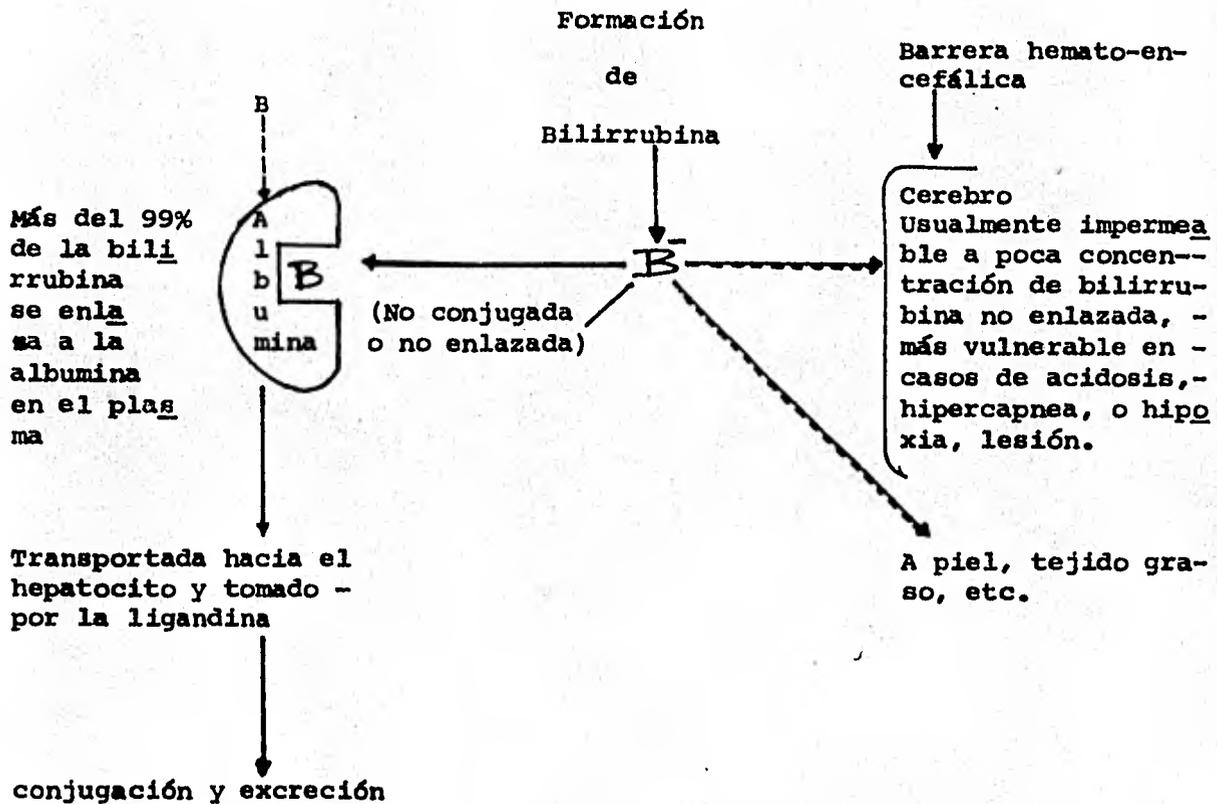


Figura No. 3

Diagrama del mecanismo de transporte para la bilirrubina no conjugada, mostrando el principal sitio de unión en el cual la bilirrubina es enlazada. Un sitio de unión secundario en la albúmina (línea punteada) es mucho más débil que el primero y protege menos contra la difusión de la bilirrubina libre.

## METABOLISMO DE LA BILIRRUBINA EN EL RECIEN NACIDO

Los niveles de bilirrubina sérica en cordón promedian aproximadamente de 1.5 a 2 mg% al nacer.<sup>2</sup> Niveles de bilirrubina del cordón mayores de 3.0 mg% usualmente están asociados con un proceso hemolítico intrauterino. Después del nacimiento, la bilirrubina es producida a una velocidad promedio de 8.5 mg/Kg/día,<sup>2</sup> y los niveles de bilirrubina sérica aumentan lentamente en infantes de término normal en un promedio de 5 a 6 mg% entre las 48 a 72 horas de edad, bajando a niveles normales al final de la primera semana. En la ictericia fisiológica el aumento promedio de bilirrubina sérica (casi toda bilirrubina de acción no conjugada) no excede de 5 mg% por día, sólo el 3% de niños de término normal desarrolla niveles de bilirrubina sérica de más de 15 mg%. La razón de la marcada diferencia individual en la ictericia neonatal parece ser la interacción entre la velocidad de formación de bilirrubina a partir de la hemoglobina, la velocidad de conjugación hepática y la excreción, donde pueden variar ampliamente en cada individuo. Se ha mostrado una marcada diferencia en la actividad de la glucuronil transferasa entre diferentes infantes o en el mismo infante en diferente día. La conjugación hepática de bilirrubina puede además ser influenciada por la ingestión materna de drogas de inducción enzimática (tales como el fenobarbi-

tal), el cual puede atravesar la placenta, o por la presencia de inductores enzimáticos o sustancias inhibidoras en la leche materna. Finalmente, la bilirrubina conjugada en el intestino puede ser desconjugada por la Beta-glucuronidasa endogena y -- ser reabsorbida y reciclada en la forma no conjugada.<sup>2</sup>

## CAUSAS DE HIPERBILIRRUBINEMIA NO CONJUGADA NEONATAL

- I.- Ictericia fisiológica
- II.- Enfermedades hemolíticas
  - a) Enfermedad hemolítica del recién nacido debido a --  
isoanticuerpos
    - 1. Por Rh, ABO e incompatibilidad a grupos menores
    - 2. Anemia hemolítica autoinmune materna
  - b) Enfermedad hemolítica del recién nacido debido a -  
defectos intracorporales hereditarios
    - 1. Esferocitosis hereditaria
    - 2. Deficiencias enzimáticas; G-6PD, piruvato cina-  
sa, etc.
  - c) Por drogas y compuestos químicos
- III.- Sepsis neonatal
  - a) Sepsis bacteriana
  - b) Infecciones virales
    - 1. Enfermedad por inclusión citomegálica
    - 2. Rubeola congénita
    - 3. Herpes simple diseminado
  - c) Toxoplasmosis congénita
  - d) Sífilis congénita
- IV.- Reabsorción de un gran hematoma

V.- Desordenes metabólicos

- a) Galactosemia
- b) Síndrome de Crigler-Najjar
- c) Ictericia por leche materna
- d) Hiperbilirrubinemia neonatal familiar transitoria
- e) Diabetes materna.

FACTORES EN LA ICTERICIA FISIOLÓGICA

- 1.- Incremento en los niveles de bilirrubina como resultado de una disminución del volumen eritrocitario fetal, acortamiento de la longevidad de los eritrocitos, y aumento en la circulación enterohepática.
- 2.- Deficiencia en el transporte debido a la baja concentración de albúmina sérica, competencia de drogas por los sitios de unión, y disminución en el pH.
- 3.- Disminución en la conjugación de la bilirrubina causada por deficiencia de la enzima glucuronil transferasa e ictericia por leche materna.
- 4.- Excreción deficiente como resultado del paso disminuido de meconio, ayuno prolongado y pobre ingesta oral.

Aunque esta hiperbilirrubinemia neonatal es usualmente fisiológica y generalmente benigna, puede ser patológica y amenazar seriamente a los infantes que la padecen. La hiperbilirrubina en el neonato es considerada fisiológica si, en ausencia de otra causa demostrable se encuentra el siguiente criterio.

- a) El inicio de la ictericia es visible después de las primeras 24 horas de vida.
- b) El nivel pico de bilirrubina es de 12 mg% o menos en infantes de término y 15 mg% o menos en infantes de pretérmino.
- c) La ictericia observada disminuye y tiende a desaparecer al final de la primera semana en el infante de término y diez días en el infante de pretérmino.
- d) La prueba de Coombs directa es negativa.

Los infantes de pretérmino tienen valores similares de bilirrubina sérica que los infantes de término y un promedio inicial de acumulación de bilirrubina también parecidos. Los prematuros, especialmente los pequeños son más propensos a tener contusiones cutáneas al nacer y alta incidencia a stress perinatal y causan más problema en su alimentación en vida extrauterina. La alimentación temprana para promover la expul-

si3n del meconio reduce la bilirrubina conjugada gastrointestinal disponible, y pasa a bilirrubina no conjugada y esta es -- reabsorbida sistem3ticamente v3a la circulaci3n enterohep3tica. Aunque la velocidad de acumulaci3n de bilirrubina es similar a los infantes de t3rmino, la madurez de los mecanismos de conjugaci3n de bilirrubina y excreci3n pueden ser retardados en su funci3n, as3 que los niveles de bilirrubina pueden aumentar -- hasta el final de la primera semana.<sup>13</sup>

Los niveles m3ximos de bilirrubina en un gran grupo de infantes prematuros sin fototerapia promediaron 11 mg% (anterior al uso de la fototerapia se report3 un 17% en blancos y un 9% en negros con niveles superiores a 15 mg% del cuarto al s3ptimo d3a). Los infantes prematuros, con piel m3s delgada y menos dep3sitos de grasa, tienden a desarrollar una ictericia cl3nica de menor nivel de bilirrubina que los infantes de t3rmino y puede permanecer una ictericia visible hasta la segunda semana postnatal.<sup>13</sup>

Infantes de madres diab3ticas e infantes policit3micos tienen mayores niveles de bilirrubina que otros de peso similar.

Prolongada hiperbilirrubinemia no conjugada puede -- ocurrir en algunos infantes amamantados cuyas madres secretan altos niveles de un aberrante esteroide inhibidor de la actividad de la glucuronil transferasa en la leche. La estructura es

pecífica de este esteroide es incierta, y la sugestión original de que puede ser 3 alfa, 20 beta pregnanediol no ha sido confirmada en otros estudios. El inhibidor no puede ser considerado antes de iniciada la ictericia, porque no es transportado en el calostro y se demuestra una vez establecida la lactancia.<sup>1</sup>

#### DESTRUCCION DE LOS ERITROCITOS POR ANTICUERPOS ABO

Las reacciones hemolíticas debidas e incompatibilidad ABO son ocasionadas por isoanticuerpos con gran especificidad por sustancias de grupo sanguíneo ABO. Esos anticuerpos se desarrollan en los inicios de la vida en respuesta a repetidas exposiciones a sustancias similares a las ABO encontradas en los alimentos, bacterias y otros materiales exógenos, tales anticuerpos son encontrados en el suero cuando el correspondiente antígeno está ausente en los eritrocitos. Así que no es necesario que ocurra una transfusión para que ocurra la sensibilización. Aunque los anticuerpos ABO pueden pertenecer a cualquiera de las diferentes clases de inmunoglobulinas, los sujetos del grupo A y grupo B se sabe que predominantemente contienen anticuerpos IgM anti-B y anti-A respectivamente, mientras que los sujetos del grupo O comunmente también desarrollan anticuerpos IgG.<sup>19</sup> Cuando los anticuerpos están presentes en ba-

jas concentraciones parecen tener sólo propiedades aglutinantes in vitro, siendo la actividad hemolítica no detectable. -- Cuando están presentes en altas concentraciones, tanto los anticuerpos IgM e IgG pueden demostrar actividad lítica in vitro dependiendo del complemento; en ausencia del complemento sólo las propiedades aglutinantes son demostrables. Debido a que -- esos anticuerpos son capaces de aglutinar eritrocitos suspendidos en solución salina, se les denomina anticuerpos completos.<sup>19</sup>

Jandl y col. efectuaron brillantes estudios con infusiones de eritrocitos marcados con  $^{51}\text{Cr}$  hacia recipientes ABO-incompatibles cuando pequeños volúmenes de tales células son transfundidos hacia individuos con niveles normales de isoaglutininas pero con una actividad de isohemolisinas no demostrable, los eritrocitos son rápidamente eliminados de la circulación, la mitad de los eritrocitos marcados fueron depurados en menos de dos minutos una moderada hemoglobinemia se desarrolla rápidamente y la cuenta de superficie, muestra marcada y rápida acumulación de radiactividad sobre el hígado.

En sujetos con aglutininas demostrables y bajos niveles de actividad hemolítica el patrón es similar excepto que, -- altos niveles de  $^{51}\text{Cr}$  y hemoglobina aparecen en el plasma inmediatamente después de la inyección de células y declina duran-

te las siguientes horas, en sujetos con altos niveles de hemolisinas, la hemoglobinemia aparece bruscamente y es pronunciada, reflejando la virtualmente instantánea destrucción de células incompatibles por mecanismos dependientes del complemento. Al menos el 80% de la hemoglobina contenida en las células inyectadas puede encontrarse en el plasma, niveles pico son alcanzados en menos de 60 segundos. Bajo estas circunstancias, la acumulación de radiactividad sobre el hígado es considerablemente menor y menos marcada que en presencia de isoaglutininas solamente.

Las observaciones descritas anteriormente fueron hechas cuando un volumen relativamente pequeño de eritrocitos -- fue destruido bajo condiciones de exceso de anticuerpos. Bajo circunstancias apropiadas la destrucción de un gran número de células se efectúa más lentamente debido a que el número de -- eritrocitos puede disminuir significativamente la concentración de anticuerpos, esto se aplica especialmente a incompatibilidad ABO por transfusión, como el número de sitios antigénicos por eritrocitos es considerable por lo menos cien veces mayor que, por ejemplo el número de sitios del antígeno-D<sup>19</sup>

#### DESTRUCCION DE ERITROCITOS POR ANTICUERPOS Rh

Los anticuerpos al antígeno Rh difieren significati-

vamente de los anticuerpos anti-A o anti-B en:

- 1.- Los anticuerpos anti-Rh no ocurren naturalmente sino que son sintetizados en respuesta a un estímulo por eritrocitos externos que contienen los-determinantes antigénicos apropiados.
- 2.- Los anticuerpos anti-Rh son predominantemente inmunoglobulinas IgG aunque en la respuesta inmune primaria, los anticuerpos IgM pueden predominar-también. Sólo ocasionalmente anticuerpos anti-Rh IgA son encontrados.
- 3.- Los anticuerpos al antígeno Rh usualmente no fijan complemento y son raramente líticos in vitro. Aún cuando los anticuerpos a Rh se ha mostrado - que pertenecen a las subclases IgG1 e IgG3, y -- por lo tanto, están equipadas estructuralmente - para fijar complemento. Es posible que la ausencia de fijación de complemento por los eritrocitos unidos a anticuerpos anti-Rh esté relacionado con la relativa escasez de sitios antigénicos Rh específicos en la superficie del eritrocito,- ya que se requiere que dos moléculas IgG estén - adyacentes para que ocurra la activación del complemento.

4.- Con excepción de los anticuerpos primarios de la clase IgM, los anticuerpos anti-Rh no producen aglutinación de los eritrocitos en solución salina y son por lo tanto, considerados anticuerpos-incompletos. Este fenómeno ocurre probablemente, a consecuencia de la longitud molecular del anticuerpo IgG (que es relativamente pequeño), a la relativa escasez de sitios antigénicos por eritrocitos y a las fuerzas repulsivas que no permiten que los eritrocitos se aproximen lo suficiente para formar el puente de unión. Estas fuerzas repulsivas incluyen la carga negativa neta en la superficie de todos los eritrocitos, y la formación de una nube de cationes atraídos por la carga negativa de la superficie; el potencial neto entre esas dos capas es negativo y está dirigido hacia la parte externa de la nube y determina la fuerza neta repulsiva entre las células.

#### SITIO DE DESTRUCCION DE LOS ERITROCITOS SENSIBILIZADOS

Cuando un volumen pequeño de eritrocitos Rh(D) son inyectados a individuos con un título relativamente alto de anticuerpos incompletos anti-Rh, los eritrocitos marcados son rá

pidamente eliminados de la circulación, hay un concomitante incremento de radiactividad sobre el bazo y en mucho menor grado sobre el hígado. La vida media de esas células en la circula--ción es de sólo unos minutos y muy poca hemoglobina o  $^{51}\text{Cr}$  no-eritrocitario aparecen en el plasma, que atestiguan la predomi--nante destrucción extravascular de los eritrocitos sensibiliza--dos por anticuerpos incompletos.

La destrucción extravascular esplénica de eritroci--tos sensibilizados ocurre sobre un amplio rango de concentra--ción de anticuerpos. La velocidad de eliminación de la circula--ción parece depender de la cantidad de anticuerpos que revis--ten a los eritrocitos. El hígado depura menos eficientemente a los eritrocitos sensibilizados con anticuerpos incompletos, --sin embargo juega un papel significativo clínicamente en la --destrucción de los eritrocitos, especialmente de aquellos sen--sibilizados con alta concentración de anticuerpos. La vía por--la cual el sistema retículo-endotelial (SRE) destruye a los --eritrocitos sensibilizados no está totalmente comprendida. Lo--buglio y colaboradores, demostraron in vitro, la unión de eri--trocitos sensibilizados a monocitos y macrófagos, acompañada --por una rápida fagocitosis y la fragmentación del eritrocito.-- Los sitios receptores en los macrófagos tienen especificidad --por la fracción Fc de la molécula IgG y parece haber una clara diferencia con los sitios de unión del complejo eritrocito sen

sibilizado IgM-complemento.

Un mecanismo adicional de destrucción de eritrocitos por el bazo ha sido sugerido por la observación de la aglutinación considerable que se produce por eritrocitos sensibilizados por anticuerpos incompletos en la sangre del bazo y escapando a la sangre periférica. Es probable que la alta concentración protéica en el plasma intraesplénico mantenga condiciones adecuadas que induzcan a la aglutinación de eritrocitos -- sensibilizados y su subsecuente secuestro debido al metabolismo desfavorable desarrollado en el bazo y la fagocitosis parcial por los macrofagos, el resultado puede ser esferocitosis, donde los esferocitos por tener estructura rígida, son destruidos rápidamente.<sup>19</sup>

#### ANTICUERPOS CAUSANTES DE ERITROBLASTOSIS FETAL

Son las inmunoglobulinas IgG las únicas capaces de -- atravesar la barrera placentaria. Esto significa que las inmunoglobulinas IgM, aunque son producidas en respuesta al estímulo del feto in utero no desempeña ningún papel en el origen de la enfermedad hemolítica del recién nacido. En teoría cualquier anticuerpo que ocurre como IgG y es activo a 37°C constituye un anticuerpo potencialmente causante de enfermedad hemolítica.<sup>5</sup>

ERITROBLASTOSIS FETAL. El descubrimiento del factor Rh dio la clave a dos misterios médicos, la causa de reacción-hemolítica por transfusión en pacientes que recibían sangre de su mismo grupo A-B-O y la patogénesis de la eritroblastosis fetal.

La demostración por Wiener de la existencia de dos formas de anticuerpos las aglutininas o anticuerpos bivalentes, los cuales reaccionan en un medio salino y los anticuerpos incompletos (bloqueadores) o univalentes, los cuales reaccionan en un medio altamente protéico, es decir, la reacción que se efectúa en medio salino y es detectable por la prueba de anti-globulinas (Cooms), condujo a nuevas pruebas para la detección de una isoimmunización. Desde los trabajos originales de Landsteiner y Wiener en 1937, gran variedad de factores Rh han sido descubiertos, además de ciertos factores contrastantes conocidos como factores Hr y factores de otros sistemas de grupos sanguíneos. Ahora es posible por pruebas en la sangre de la madre preñada, efectuando periódicamente pruebas de anticuerpos en el suero de la madre durante el embarazo predecir no solamente el tipo sanguíneo del bebé sino también si el bebé está en posibilidad de padecer la enfermedad hemolítica.

La eritroblastosis fetal está caracterizada por destrucción anormal y la regeneración de eritrocitos, esto es su-

ficiente para suponer que la hemólisis intravascular o la aglutinación, o ambas, inician los demás cambios patológicos en esas condiciones. Mucha de la patología depende de la destrucción excesiva de los eritrocitos y en un esfuerzo por parte del bebé para compensar esa pérdida. Anemia, incremento de bilirrubina en la sangre y su fijación en algunos tejidos del cuerpo, eritropoyesis anormal en muchos órganos, incluyendo el bazo y el hígado y un aumento en las formas inmaduras de los eritrocitos en la circulación sanguínea están entre los signos más comunes. Edema extremo presente en alguno de los casos no ha sido aún explicado satisfactoriamente. Algunos lo explican en base a un fallo renal, daño en el cauce capilar general, y una disminución en las proteínas plasmáticas que ocurre junto con la hemólisis celular.

Las manifestaciones clínicas y de laboratorio incluyen ictericia, anemia, eritroblastemia, edema, hepatoesplenomegalia, y púrpura ampliamente variable en grados. Los infantes pueden tener ninguno, pocos, o todos esos signos. Los infantes más severamente afectados nacen muertos o fallecen poco después de nacidos. En bebés no tratados quienes sobreviven al inmediato periodo postnatal casi invariablemente presentan un aumento en la concentración de bilirrubina sanguínea, la cual ocurre a causa de la incapacidad hepática para conjugar la bilirrubina no conjugada.

De acuerdo a Wiener y Wexler, el curso clínico de -- los bebés puede ser predicho sólo en forma general. Aquellos -- con severa anemia, petequias, alto índice ictérico de sangre -- del cordón, edema y hepatoesplenomegalia generalmente mueren -- dentro de las primeras horas o días con hemorragia pulmonar -- después de una extremada ictericia. Exámenes postmortem de -- esos casos muestran casi siempre bilirrubina que tinte los nú-- cleos basales del cerebro, Kernicterus. Otros infantes quienes parecen estar menos severamente afectados al nacer, con una mo-- derada anemia de 10-14 g% de Hb., pero que tienen elevado índi-- ce ictérico de sangre del cordón, de más de 16 mg%, desarrolla-- rán intensa ictericia e igualmente morirán en 3 a 5 días con -- ictericia nuclear. En este grupo algunos bebés pueden sobrevi-- vir, pero debido al daño cerebral manifestarán posteriormente -- desarrollo retardado.<sup>19</sup>

De los infantes quienes parecen estar más moderada-- mente afectados (sangre del cordón normal, Hb normal, índice -- ictérico menor de 16 mg%), o sea que su vida no está en peli-- gro, puede ocurrir teñimiento nuclear y algún grado de daño ce-- rebral puede manifestarse durante el periodo neonatal o más -- tarde. Por lo tanto, todos esos infantes afectados, deberán -- ser tratados con exanguíneo transfusión la cual es a la fecha -- el tratamiento de elección para salvarles la vida y prevenir -- secuelas neurológicas.<sup>6, 9, 19</sup>

En los infantes cuyas condiciones generales están -- bien y la ictericia nunca llega a ser lo suficientemente intensa para considerarla como una causa de importancia, deberán -- ser tratados con cautela. Se debe acentuar, sin embargo que en caso de duda es mejor llevar a cabo la exanguíneo transfusión-- que dejar sin tratamiento a cualquier bebé que pueda desarrollar daño cerebral.

Si el bebé al nacer no está moribundo o irreversiblemente dañado, es generalmente posible salvarlo con exanguíneo-- transfusión. En los bebés que sobreviven es posible casi invariablemente prevenir la manifestación de cualquier secuela neurológica. El éxito del tratamiento depende de la prontitud y -- la minuciosidad con la cual se efectúa. Si las pruebas prenatales indican un bebé eritroblastótico, un experimentado inmunohematólogo deberá ser consultado cuando nace el bebé. El tratamiento profiláctico de la enfermedad hemolítica del recién nacido puede ser:

- a) Exanguíneo transfusión
- b) Fototerapia
- c) Administración de drogas inductoras de las enzimas hepáticas (Fenobarbital).
- d) Transfusión intraperitoneal
- e) Nacimiento prematuro

- f) Administración de corticoesteroides
- g) Exanguíneo transfusión de plasma para reducir el título de anticuerpos anti-Rh maternos.

Aunque la gran mayoría de los casos de eritroblastosis fetal resultan de sensibilización a Rh, no es improbable - que madres Rh-positivas como las Rh-negativas puedan tener hijos con eritroblastosis fetal debido a sensibilización ABO. En resumen, se ha encontrado que la sensibilización es debida a - cualquiera de los numerosos factores Rh-Hr. La sensibilización de otros factores sanguíneos tales como Kell han sido reportados, y más raramente a factores como P, U, Hr<sup>S</sup>, M, N y otros.

Esto no es siempre practicable por el laboratorio, - probar específicamente la sensibilización a cada uno de esos - factores y por esa razón la prueba de sensibilización debe - - efectuarse con el suero de las madres usando un panel de células que contengan todos los factores. Muchos de esos casos, como se mencionó anteriormente resultan de la sensibilización a -- Rho y los otros casos pueden ser diagnosticados después de que nace el bebé por observación a todos aquellos que manifiesten un cuadro precoz de ictericia y/o anemia. Cuando la ictericia o anemia aparece durante el primero o segundo día de vida, determinaciones inmunohematológicas son necesarias para salvar - la vida de esos bebés. Hoy día es una práctica común en muchos

hospitales efectuar la prueba directa de Coombs (antiglobulinas) de la sangre del cordón tan pronto como el bebé nace, y si la prueba es positiva y si la bilirrubina del cordón es significativamente elevada, es necesario efectuar un exanguíneo transfusión. A menudo el médico espera de 8 a 12 horas para observar los signos y síntomas desarrollados, de acuerdo a Wiener.<sup>19</sup> Si el bebé no muestra signos clínicos por ejemplo, no hay ictericia y no hay anemia, la exanguíneo transfusión no se realiza. El principal factor en la determinación de la posible severidad de la enfermedad es el título de anticuerpos de la madre, que en un momento determina el grado de sensibilización de las células rojas fetales. Una sensibilización pobre de los eritrocitos no necesariamente interfiere con sus funciones; no solamente deben estar sensibilizados sino la aglutinación debe estar presente. Aunque los componentes del complemento no están totalmente desarrollados antes del nacimiento, si el título de anticuerpos es muy alto por suficiente tiempo, el niño nacerá muerto, o si nace vivo manifestará síntomas de severa eritroblastosis fetal. Con frecuencia los bebés parecen normales al nacer, pero rápidamente en el periodo neonatal aparecen los síntomas.<sup>19</sup>

No hay una relación directa entre el grado de ictericia y el grado de anemia. La ictericia es hepatógena como también de origen hemolítico. En resumen, aunque el daño cere-

bral ocurre más a menudo en bebés severamente ictericos algunos llegan a reponerse completamente y otros menos afectados mueren, con daño cerebral. Wiener piensa que el daño tisular es debido primeramente a daño vascular como resultado de la aglutinación vascular de los eritrocitos sensibilizados del bebé. De un daño al hígado resulta una ictericia. La obstrucción en la circulación del cerebro produce lesión nuclear y permite a la bilirrubina atravesar la barrera hemato-encefálica y teñir las células ganglionares muertas o moribundas, por lo tanto, si las células sensibilizadas son removidas antes de que ocurra la aglutinación intravascular y son reemplazadas por células que no pueden ser sensibilizadas por los anticuerpos libres, el daño tisular puede ser prevenido.<sup>9, 19</sup>

## ANALISIS DE LIQUIDO AMNIOTICO

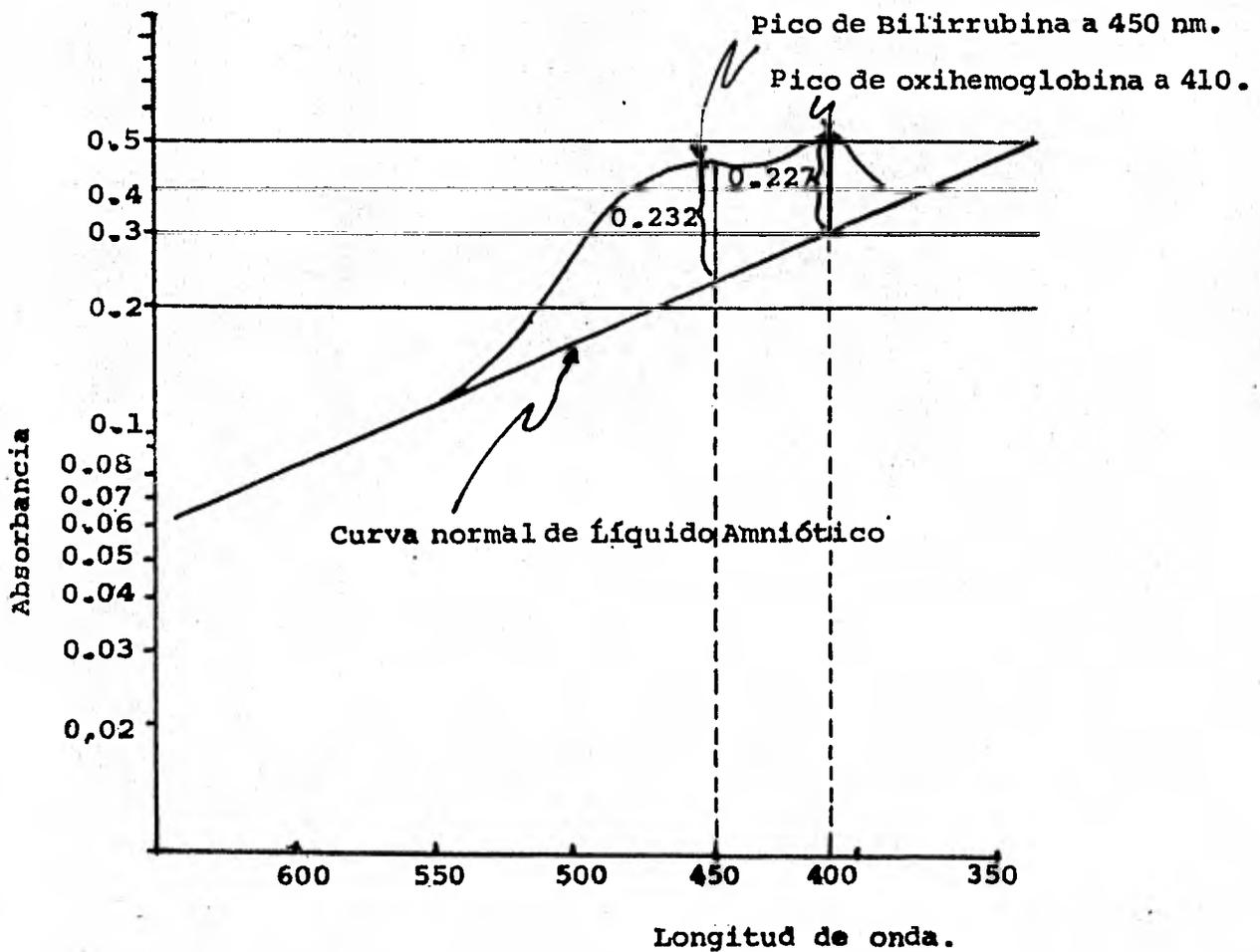
Ocurren muertes neonatales o intrauterinas en aproximadamente el 20% de madres Rh-negativo sensibilizadas. En el pasado se hubiera podido evitar quizás muchas muertes si se hubiera efectuado el parto inducido pronto, o transfusión intrauterina, si se hubiera dispuesto de medios exactos para asegurarse del estado del feto in utero. Hasta recientemente, la determinación del título de anticuerpos Rh, la historia obstétrica y el análisis radiográfico eran las principales herramientas para evaluar la condición del feto in utero y para determinar cuales pacientes se beneficiarían más por el parto antes de término. Con frecuencia se halló que éstos medios indirectos tenían deficiencias. Muchos lactantes gravemente eritroblastóticos que pudieran haberse beneficiado por el parto antes de término no fueron tratados así, debido a bajos títulos de anticuerpos y una historia obstétrica normal, se halló en ocasiones que con toda probabilidad hubiera progresado mejor si se hubiera dejado continuar el embarazo. Así, era necesario un medio más decisivo para evaluar la condición del feto in utero, pues el parto inducido antes de tiempo sólo mejora el pronóstico de los fetos gravemente eritroblastóticos.<sup>5,15,17,18.</sup>

CURVAS DE ABSORBANCIA DE LIQUIDO AMNIOTICO. En 1953 Bevis observó que el líquido amniótico de algunos embarazos --

con incompatibilidad de Rh tenían coloración verde-amarillenta.

Así mismo, se informó que esta coloración era debida a bilirrubina u otros productos intermediarios del metabolismo de hemo. Se compararon las curvas de absorbancia de líquidos amnióticos de fetos normales y de fetos eritroblastóticos, se observó una distorsión en la curva de absorción del líquido amniótico obtenido de los fetos eritroblastóticos. El grado de distorsión a 450 nm. fue usado por Bevis y Walker para predecir la gravedad de la condición hemolítica. La curva de absorbancia en líquido amniótico en niños normales a término, muestran un aumento aproximado lineal en absorbancia, con disminución en la longitud de onda entre 550 y 365 nm. (gráfica No.1) Este aumento uniforme en la absorbancia se debe probablemente a la dispersión de la luz por proteínas. Todo aumento por encima de la línea uniforme puede ser determinado observando el grado hasta el cual la absorbancia queda por encima de una línea recta trazada entre las absorbancias a 550 nm. y 365 nm. (gráfica No. 1). Liley usó la diferencia entre la absorbancia a 450 nm. y la indicada por esta línea recta a 450 nm. para asegurarse del grado de enfermedad hemolítica, esta diferencia se llama "El pico de absorbancia a 450 nm".<sup>17, 18</sup>

## CURVA DE ABSORBANCIA EN LIQUIDO AMNIOTICO.



Gráfica No. 1

2/17

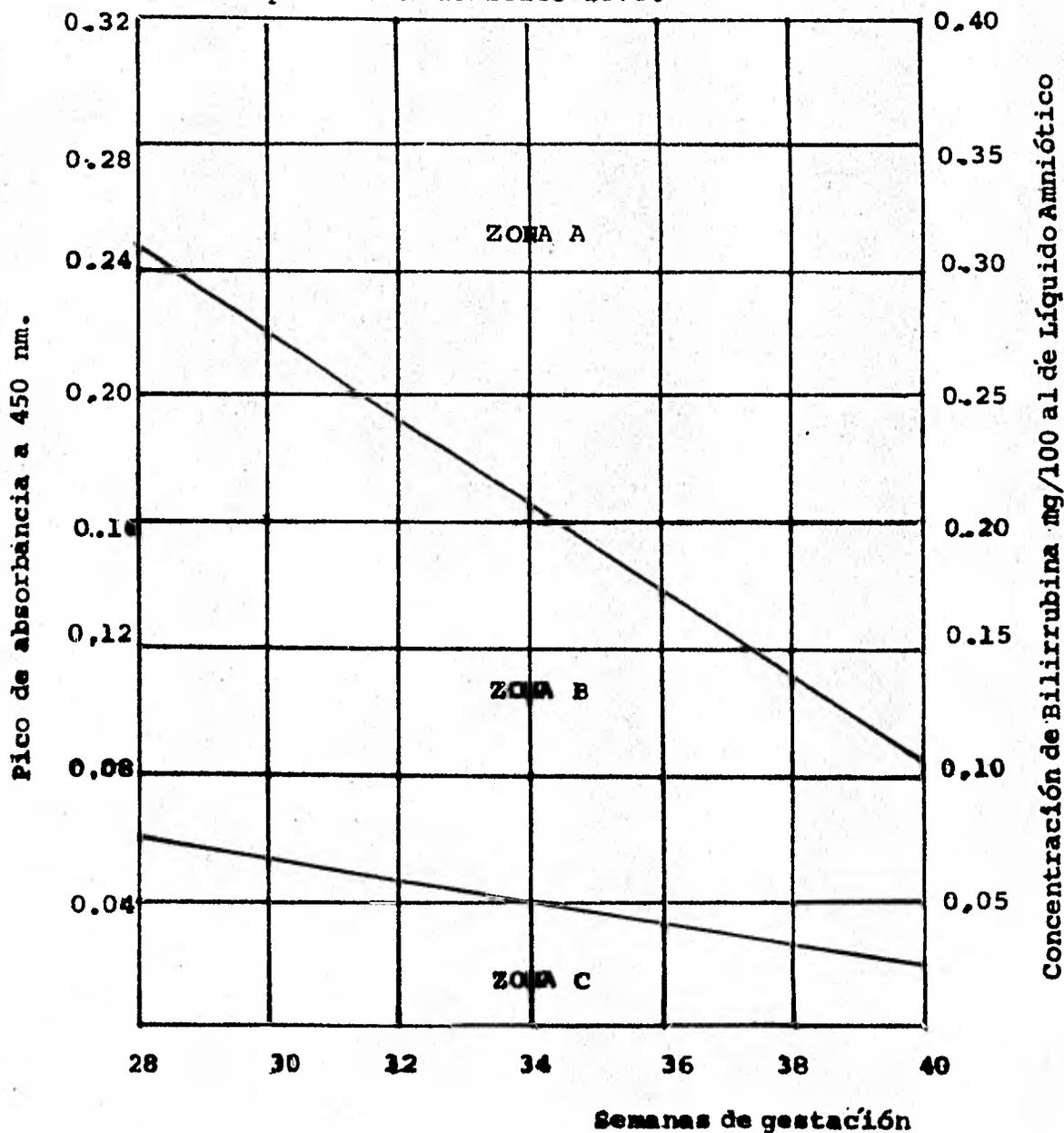
El líquido amniótico de fetos normales, o de los que padecen leve enfermedad hemolítica, muestran un pico de absorban-  
cancia moderado a 450 nm. en el embarazo temprano, el cual dis-  
minuye al acercarse la madurez. Esta disminución se debe quizá  
al aumento continuo de la capacidad de la placenta para elimi-  
nar bilirrubina. A las 28 semanas de gestación el pico de ab-  
sorbancia a 450 nm. en líquido amniótico de fetos normales o -  
de fetos con leve enfermedad hemolítica puede llegar a ser has-  
ta de 0.06 y a las 40 semanas puede variar de 0 hasta 0.02. En  
la enfermedad hemolítica grave, el pico de absorban-  
cancia a 450 nm. aumenta grandemente y no siempre disminuyen con el -  
acercamiento a la madurez; de hecho con frecuencia hay un -  
aumento en la absorban-  
cancia. En general, la amniocentesis ini-  
cial se efectúa entre las 28 y 32 semanas de gestación y está  
indicado que la amniocentesis se repita cada dos semanas para -  
la evaluación correcta, la absorban-  
cancia a 450 nm. ha de relacio-  
narse con las semanas de gestación. Liley trazó la gráfica de  
la absorban-  
cancia a 450 nm. obtenidas de muestras de líquido am-  
niótico en función de las semanas de gestación. Observó un -  
agrupamiento de los resultados en zonas que indican la grave-  
dad de la enfermedad hemolítica (gráfica No. 2).<sup>17, 18</sup>

GRAFICA PARA EVALUAR LA GRAVEDAD DE UN PROCESO HEMOLITICO

ZONA A: Sugiere grave proceso hemolítico fetal..

ZONA B: Sugiere un proceso hemolítico de leve a serio.

ZONA C: Sugiere ausencia de enfermedad hemolítica o presencia de proceso hemolítico leve.



Gráfica No. 2

(Tomado de Liley: Am. J. Obstet. & Gynec. 82:1359, 1961)

RELACION DE LA CONCENTRACION DE BILIRRUBINA CON EL  
PICO DE ABSORBANCIA A 450 nm

La adición de bilirrubina en concentraciones conocidas a líquidos amnióticos que no muestran pico de absorbancia a 450 nm. seguida de determinaciones de la curva de absorbancia, han permitido relacionar la absorbancia a 450 nm. con la concentración de bilirrubina. Se obtuvo una relación directa, en la cual cada 0.10 mg. de bilirrubina/100 ml. correspondía a un pico de absorbancia de 0.08 a 450 nm. o sea:

Pico de absorbancia XI.25 = mg Bil./100 ml. de Liq. amniótico.

El análisis de líquido amniótico por su curva de absorbancia evita las dificultades de la medición química de bajas concentraciones de bilirrubina y muestra, no sólo las concentraciones de bilirrubina en líquido amniótico, sino también la posible presencia de otras sustancias que interfieren.

Contaminación de líquido amniótico por sangre o suero.- El líquido amniótico puede estar contaminado con bilirrubina procedente de la sangre materna o fetal, como resultado de trauma durante la aspiración. Si la contaminación se debe a sangre fetal, de un feto eritoblástico, se puede introducir un error sustancial en la medición de bilirrubina en líquido amniótico. Por ejemplo, la inclusión de 0.05 ml. de suero fetal-

(aprox. 0.1 ml. de sangre), con una concentración de bilirrubina de 10 mg% en 5 ml. de líquido amniótico harían subir los resultados en líquido amniótico en 0.1 mg. de bilirrubina/100 ml. de líquido amniótico o una absorbancia de 0.08 a 450 nm. esta contaminación constituiría un error muy serio.

La contaminación con sangre completa se reconoce fácilmente a causa del color rojo producido por la hemoglobina. 17, 18

## EXANGUINEO TRANSFUSION

La primera exangineotransfusión en recién nacidos - con enfermedad hemolítica se llevó a cabo en Canadá en 1925, - pero no fue aprovechada esa terapia sino hasta 20 años más tarde, cuando un procedimiento similar fue popularizado por Wallerstein, Wiener, Diamond Mollison y otros. Los resultados de la exangineotransfusión desde entonces han sido ampliamente gratificados y la mortalidad de infantes afectados por hiperbilirrubinemia no conjugada ha sido ampliamente reducida como un resultado directo de esta terapia.

Los objetivos de exangineotransfusión incluyen:

- 1). La eliminación de anticuerpos maternos que sensibilizan a los eritrocitos circulantes en el niño.
- 2). Corregir la anemia e invertir el fallo congestivo en infantes con hidropesía o prehidropesía.
- 3). Eliminar la bilirrubina no conjugada.

Aproximadamente el 85% de los eritrocitos sensibilizados pueden ser eliminados por una inicial exangineotransfusión, el número de eritrocitos en peligro puede ser reducido considerablemente y la subsecuente producción de bilirrubina disminuye en forma notable. Además, una exangineotransfusión efectuada dentro de pocas horas después del nacimiento no solamente previene el desarrollo de una severa anemia sino reduce-

grandemente la posibilidad de Kernicterus.<sup>9, 15, 19</sup>

Una exanguineotransfusión completa (200 ml. por Kg. de peso), elimina aproximadamente el 90% de la bilirrubina -- plasmática, sin embargo, el depósito extravascular del pigmento es mucho mayor que el depósito intravascular, efectuándose un reequilibrio dentro de los 30 minutos posteriores a la -- exanguineo transfusión. Esto debe considerarse para reconocer un rebote de hiperbilirrubinemia después de la exanguineo- -- transfusión, con una concentración final del 40 al 60% del nivel inicial. A causa del rápido reequilibrio entre la bilirru**bi**na intravascular y la extravascular, la cantidad final de -- bilirrubina depende, al menos en parte, en el tiempo empleado para efectuar el recambio, el cual deberá hacerse al menos en 90 minutos. Las indicaciones para el exanguineotransfusión varían ampliamente entre los diferentes autores.

La vena umbilical es la vía de preferencia para el recambio. De 160 a 200 ml. por Kg. de peso son recambiados al menos en 90 minutos. Sangre heparinizada es la de preferencia debido a las complicaciones potenciales de los anticoagulan--tes de citrato, aunque ultimamente son los más utilizados. La sangre deberá ser fresca para asegurar altos niveles de la -- 2,3 DPG (2,3-difosfoglicerato) en los eritrocitos y para minimizar el peligro de hipercalemia y acidosis inherente en el -- uso de sangre vieja.

La sangre por trasfundir debe cruzarse con el suero de la madre y sangre del niño y efectuar la prueba de Coombs-indirecta, preferentemente antes del nacimiento.

Las complicaciones incluyen:

- 1). Cambios bioquímicos de: hipercalemia debido al uso de sangre vieja, hipocalcemia, aumento en los niveles de citrato y acidosis debido al uso de ácido cítrico dextrosa.
- 2). Complicaciones cardiovasculares, trombosis séptica, sobrecarga del volumen sanguíneo y fallo cardíaco.
- 3). Problemas de coagulación, especialmente debido a sobreheparinización, o trombocitopenia.
- 4). Bacteremia y hepatitis sérica.

La mortalidad promedio atribuible a exangineotransfusión es de menos del 2%.<sup>9, 15, 19.</sup>

## MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo representa el estudio de 379 casos de recién nacidos exanguinados durante el periodo comprendido entre junio de 1979 a septiembre de 1981, en el Hospital de Ginecobstetricia No. 3 del Centro Médico La Raza (IMSS), de la Ciudad de México, con el común denominador de hiperbilirrubinemia no conjugada. Además el estudio de 102 niños recién nacidos con nacimiento normal y donde madres e hijos fueron del mismo grupo y Rh; para la determinación de bilirrubina sérica y la hemoglobina del cordón para determinar los valores de referencia de nuestra población en estudio, y la prueba de Coombs directa que fué negativa en los 102 casos. Se incluye también el estudio de 63 determinaciones del pico de absorbancia a 450 nm. de líquido amniótico donde 23 fueron madres Rh negativas sensibilizadas y 30 casos de madres normales.

**ANALISIS A LA EMBARAZADA.** Es una conducta recomendable hacer un examen de la embarazada al final del primer trimestre de gestación, determinando el Rh y el título del Coombs indirecto para obtener datos que sirvan de base para investigaciones posteriores. Se toman 15 ml. de sangre cada vez, la mitad se emplea en el estudio y la otra mitad se guarda para estudiarla junto con la nueva muestra de sangre

para comparar los resultados. Los sueros pueden conservarse -- congelados si la embarazada no tiene anticuerpos inmunes, la segunda determinación debe hacerse al séptimo mes del embarazo y repetirla cada mes, en otras dos ocasiones.

Si la embarazada tiene anticuerpos (Coombs indirecto positivo), deben repetirse los estudios cada 15 días comparando la muestra actual con la anterior (título de anticuerpos).-- Mientras más elevado es el título de anticuerpos, y mayor sea el tiempo que actúen durante el embarazo, mayor será el peligro para el niño.

Bevis y Kalker proponen el estudio de líquido amniótico donde se determine el pico de absorbancia a 450 nm. y por medio de esta la concentración de bilirrubina in utero para determinar si hay daño fetal. Este estudio, junto con el título de Coombs indirecto en la madre y la historia clínica nos darán un panorama más completo de, si hay peligro de muerte intrauterina o recién nacidos con grave enfermedad hemolítica, - con alto riesgo de morir en las primeras horas después del parto.

**ANALISIS PARA EL RECIEN NACIDO CON ENFERMEDAD HEMOLITICA.** Problema del factor Rh. Es el caso más frecuente, generalmente se trata de madres Rh-negativo con inmunización al -- factor D. Asociado al factor C los estudios convenientes son:--

grupo sanguíneo, factor Rh (o el causante), investigación de anticuerpos sobre los eritrocitos del niño (Coombs directo), y en el suero sanguíneo del niño (Coombs indirecto), determinación de hemoglobina y bilirrubina no conjugada séricas.

Problemas de los factores A o B. En este caso los análisis recomendados son: Grupo sanguíneo, factor Rh, prueba de Coombs directa, Coombs indirecta tanto en la madre como en el niño, prueba de la elusión, determinación de hemoglobina y bilirrubina no conjugada séricas.<sup>14</sup>

## TECNICAS

## DETERMINACION DEL FACTOR Rh (D)

## 1.- Fundamento:

Para identificar el factor Rh se usa un antisuero específico, y su presencia se manifiesta por aglutinación de los eritrocitos.

## 2.- Material y reactivos:

Reactivos.

Suero anti-Rh (D)

Albúmina al 22 o 30%

Material y aparatos

Tubos de 10 por 75 mm.

Centrífuga

Microscopio

## 3.- Método:

Material biológico

Un ml. de sangre sin anticoagulante

Técnica:

Depositar una gota de una suspensión de eritrocitos al 5% en cada uno de dos tubos de 10 X 75 mm; al primero se le añade dos gotas de suero anti-Rh (D) y al segundo dos gotas de albumina (testigo negativo).

Centrifugar los tubos a 1000 R.P.M. durante 90 segundos-  
y resuspender suavemente observando si hay aglutinación.

4.- Valores de referencia

FACTOR	POBLACION %
Rh-positivo	97.08
Rh-negativo	2.92

VARIANTE DEBIL DEL Rh (D) . Du

1.- Fundamento:

Los eritrocitos sensibilizados con suero anti-Rh (D) des  
pués de lavarse se ponen en presencia del suero de Coombs.

2.- Material y reactivos:

Reactivos

Suero anti-Rh (D)

Suero de Coombs

Sol. de Na Cl al 0.85%

Material y equipo

Los mismos que para Rh (D)

3.- Técnica:

Cuando la reacción es positiva débil o negativa, con un -  
suero anti-Rh (D) se repite la determinación del antígeno  
Rh, se incuba 60 minutos a 37°C. Después de quitar el sue  
ro Rh (D) lavando tres veces con solución salina al 0.85%.

Se añade a los eritrocitos el suero de Coombs si aglutinan con este suero el resultado es positivo y el sujeto es negativo variante. Du. Un sujeto debe considerarse como donador Rh (D) positivo y como receptor Rh (D) negativo.

#### DETERMINACION DEL SISTEMA ABO

##### 1.- Fundamento:

Para la identificación de los antígenos A y B se usan -- los antisueros anti-A, anti-AB y anti-B y el grupo se determina reaccionando esos antisueros con eritrocitos del sujeto.

##### 2.- Material y aparatos:

Los mismos que para el Rh (D)

Reactivos

Suero anti-AB

Suero anti-B

Suero anti-A

Sol. Na Cl al 0.85%

##### 3.- Método:

Material biológico

Iml. de sangre con o sin anticoagulante

##### 4.- Técnica:

Se hace una sol. al 5% de los eritrocitos problema con --

sol. salina al 0.85%. Se etiquetan tres tubos de 10 X 75-mm. y a cada uno se le ponen dos gotas de los antisueros-anti-A, anti-B y anti-AB respectivamente, y a todos se les añade dos gotas de eritrocitos al 5% del sujeto.

Centrifugar los tubos a 1000 R.P.M.

Resuspender suavemente y observar donde hay aglutinación.

Aglutinación	Tubo			grupo
	1	2	3	
	anti-A	anti-AB	anti-B	
-	-	-	-	O
+	+	-	-	A
-	+	+	+	B
+	+	+	+	AB

#### SUERO DE COOMBS (ANTIGLOBULINA HUMANA)

##### 1.- Fundamento:

Sirve para investigar anticuerpos inmunes, el suero se prepara inyectando animales (conejos y cabras) con suero humano o con su fracción globulínica. La prueba de Coombs puede hacerse en dos formas, llamadas directa e indirecta. La primera sirve para identificar anticuerpos fijados in vivo sobre los eritrocitos, y la segunda para encontrar anticuerpos inmunes en el suero o líquido (circulantes) estudiados.

La prueba directa está indicada en:

- a) En el diagnóstico de eritroblastosis fetal. Su valor-práctico es tal que se puede dudar en el diagnóstico-cuando se obtenga el Coombs directo negativo. En es--to, la excepción la constituyen algunos casos de eri-troblastosis producidos por factores A o B.
- b) Para controlar la eficacia de un exangineotransfu--sión, buscando la remoción de los eritrocitos originales del niño que son Coombs positivos.
- c) Para el diagnóstico de la anemia hemolítica, con autoanticuerpos.
- d) Como prueba de compatibilidad sanguínea entre las sangres del donador y del receptor.

2.- Material y aparatos:

Reactivos

Suero de Coombs (Anti-globulina humana)

Sol. Na Cl al 0.85%

Aparatos

Los mismos que para Rh (D)

3.- Técnica:

Deposite una gota de eritrocitos problema en un tubo de -  
10 X 75 mm. Con pipeta Pasteur, añada solución salina y -  
centrifugue un minuto a 3500 R.P.M. repita tres veces el -  
lavado, en el último lavado deje escurrir el tubo o séquee

lo con papel filtro, desprendida los eritrocitos aglutina--  
dos en el fondo del tubo y añada una gota de suero de - -  
Coombs, reposar cinco minutos a temperatura ambiente; cen--  
trífuge veinte minutos a 3500 R.P.M. y lea microscópica--  
mente observando si hay aglutinación.

Se debe emplear un control positivo, empleando eritroci--  
tos sensibilizados (comerciales) y, un negativo (eritroci--  
tos Rh-negativos).

La prueba de Coombs indirecta:

1.- Fundamento. Se realiza en dos etapas:

En la primera se sensibilizan los eritrocitos testigos in  
vitro, y en la segunda, por medio de suero de Coombs, se  
hace visible el fenómeno de la aglutinación. Cuando una -  
persona, en especial una mujer embarazada, se sensibiliza  
con eritrocitos, anticuerpos anti-Rh aparecen en su san--  
gre (anticuerpos incompletos), que lesionan los eritroci--  
tos Rh (D) positivos, los cuales se aglutinan con el sue--  
ro de Coombs (antigamma globulina humana).

2.- Reactivos:

Sol. salina al 0.9%

Suero de Coombs (antigamma globulina humana)

Bromelina o fiscina

### 3.- Método:

#### Material biológico

3 ml. de sangre venosa sin anticoagulante

Eritrocitos (de dos donadores conocidos), grupo O Rh (D)-positivos.

#### Técnica:

Marcar 10 tubos de ensaye de 10 X 75 mm. con los números-1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512, que representan las diluciones del suero problema.

Colocar 0.1 ml. de sol. salina a cada tubo, excepto en el tubo número 1, así quedarán las diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512.

Colocar 0.1 ml. de suero en el tubo núm. 1 y 0.1 ml. en el tubo núm. 2. Mezclar perfectamente el contenido del tubo núm. 2, y de ahí partir a las siguientes diluciones tomando 0.1 ml. de la mezcla y pasarla al tubo núm. 3 y así sucesivamente hasta el último tubo de dilución. Desechar 0.1 ml. al último tubo.

Añadir a cada tubo 0.1 ml. de una suspensión de eritrocitos O Rh (D) positivos diluidos al 5% aproximadamente con sol. salina al 0.9% previamente lavados.

Agitar los tubos e incubar a 37°C durante una hora. Centrifugar los tubos a 1000 R.P.M. durante un minuto remo-

ver suavemente los eritrocitos sedimentados y observar macroscópicamente si hay aglutinación, a partir del último tubo. El título del suero es la recíproca de la mayor dilución que muestra aglutinación macroscópica definida. -- Por ejemplo, si se obtiene una lectura positiva en el noveno tubo (dilución del suero 1/256) el título es de --- 1:256. Si todos los tubos son negativos, efectuar la prueba de Coombs directa, en la siguiente forma: lavar tres veces los eritrocitos de todos los tubos con solución salina. Después del último lavado se secan los tubos con papel filtro o se dejan escurrir, se resuspende el paquete-globular y hasta entonces se le agrega el suero de Coombs (dos gotas) a cada tubo. Mezclar y centrifugar a 1000 -- R.P.M., durante un minuto o a 3400 R.P.M. durante veinte segundos.

Remover suavemente los eritrocitos y observar si hay aglutinación.

Resultados:

El resultado se reporta en:

- a) Anticuerpos salinos: negativos o positivos a X dilu--  
ción
- b) Anticuerpos con Coombs: " " " " "

Prueba de la elusión.

**Fundamento:**

Esta prueba se basa en la investigación de un anticuerpo fijado a la superficie del glóbulo, el cual se destruye previamente por calor. Se toma una muestra de 2 ml. de sangre del niño, la cual se lava tres veces con solución salina al 0.9%, a los glóbulos empacados se les agrega un volumen igual de solución salina y se incuban a 60°C, hasta producir la hemólisis. El sobrenadante, de color vinoso, nos sirve para investigar anticuerpos con glóbulos de adulto del mismo tipo A o B del niño, por medio de la técnica indirecta del Coombs. Esta prueba parece ser la más segura en el diagnóstico de la inmunización por grupo ABO.

Pruebas cruzadas:

1.- **Fundamento.**

Se ponen en contacto los glóbulos rojos del donador y el suero del receptor (prueba mayor), y los glóbulos rojos del receptor con el suero del donador (prueba menor). -- Las pruebas deben ser en albumina, salina, bromelina y Coombs.

Medio salino: Se hace con Na Cl al 0.85% o 0.9%, los anticuerpos que se manifiestan por aglutinación en este medio son los isoanticuerpos del tipo IgM. Ellos pueden --

ser aglutininas frías con una reactividad óptima de 4°C a 24°C. Algunos anticuerpos salinos tipo anti-A, anti-B, anti-Lewis y anti-P reaccionan bien a temperatura de laboratorio (18-24°C).

La reacción se hace en tubo y se centrifuga bajo condiciones apropiadas, pues la centrifugación disminuye el potencial Z, obteniéndose una aglutinación más fuerte.

Los anticuerpos IgG no aglutinan los eritrocitos suspendidos en salina a 4°C ni a 37°C.

#### Medio coloidal o protéico:

Un gran número de anticuerpos, específicamente los correspondientes al sistema Rh potencian su reacción cuando se emplea un medio hiperprotéico. La más empleada es la albúmina bovina al 22% o al 30%, este medio reduce la distancia intercelular, permitiendo la aglutinación de anticuerpos del tipo IgG. Este medio ha permitido descubrir la -- gran mayoría de anticuerpos por el sistema Rh cuando se -- incubaba a 37°C.

La prueba de Coombs indirecta puede ser más sensible, es decir, que la reacción es mayor cuando los eritrocitos -- son suspendidos en albumina durante su fase de incubación que cuando se emplea, solución salina.

Enzimas: El tratamiento de eritrocitos con enzimas (bromelina, ficina, papaina o tripsina) es un medio muy efec

tivo para potenciar o aumentar la aglutinación de algunos antígenos de grupos sanguíneos.

Las enzimas alteran la superficie del eritrocito mediante su efecto proteolítico, removiendo peptidos que contienen ácido siálico, y consecuentemente reduciendo las cargas eléctricas negativas, disminuyendo el potencial Z. Por tal motivo el sobretratamiento de los glóbulos rojos con enzimas puede conducir a resultados falsos positivos. De acuerdo a esto la concentración de la enzima, el pH de la solución y el tiempo de la exposición de los glóbulos rojos al efecto enzimático son factores críticos que se deben controlar permanentemente. Las enzimas son excelentes para detectar anticuerpos del sistema Rh-Hr, anticuerpos fríos (anti-I, anti-Lewis, anti-A y anti-B). En cambio muestran un patrón variable con anticuerpos anti-Kell y anti-Kid, y los anti-M y anti-N no se detectan. Debido a sus resultados variables con algunos anticuerpos, a su preparación, conservación y pérdida de actividad, las enzimas tienen ciertas limitaciones y hasta el momento han complementado pero no reemplazado a las técnicas comunes usadas en el banco de sangre (salina, albúmina y Coombs).

## 2.- Material y reactivos.

### Reactivos

Suero de Coombs

Sol. de albumina bovina al 22% o al 30%

Sol. salina al 0.9%

Aparatos los mismos que para determinar Rh (D)

## 3.- Método.

### Material biológico

Sangre del donador. Todas las bolsas de sangre para transfundir llevan sujeto tubo o frasco "piloto" que contiene la muestra de sangre coagulada, aproximadamente 10 ml. El piloto en las bolsas de plástico son los segmentos del tubo de plástico anexo a cada una de ellas.

Vaciar la sangre del piloto en un tubo de 12 X 75 mm.

Sangre del receptor. Un tubo con 5 ml. de sangre coagulada es suficiente para varias pruebas (en el caso de ser sangre para exanguineotransfusión, por incompatibilidad a Rh (D) o a grupo ABO, se requiere suero de la madre aunque el niño sea el que se va a transfundir o en su caso el suero obtenido por elusión de los eritrocitos del niño se usarán como si fuera el suero del receptor, o sea el niño).

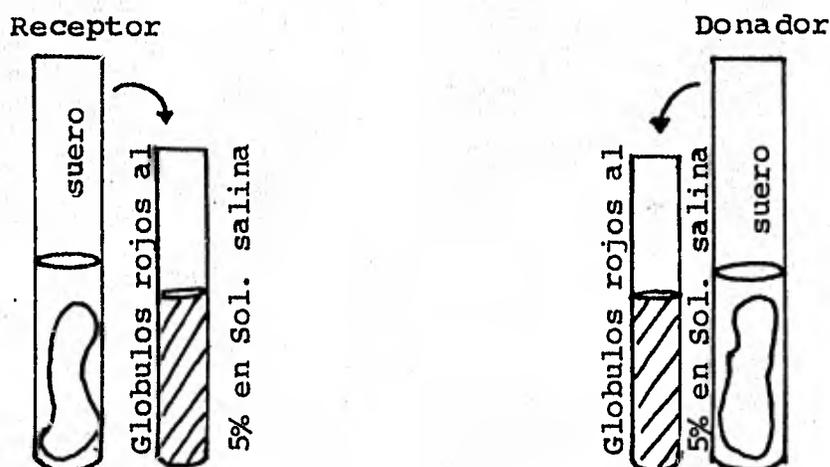
### Técnica:

Los tubos del donador y receptor se centrifugan a 1500 --

R.P.M. durante cinco minutos para separar el suero del --  
coágulo.

El tubo del receptor se coloca en el extremo izquierdo de  
la gradilla.

El tubo del donador se coloca en el extremo derecho de la  
misma gradilla entre ellos se coloca dos tubos de 10 X 75  
mm. próximos a cada uno de ellos. Como se ilustra en la -  
figura.



Se enumeran ocho tubos de la siguiente manera:

Prueba mayor			Prueba menor			Autotestigo	
S/R	S/R	S/R	S/D	S/D	S/D	S/R	S/R
E/D	E/D	E/D	E/R	E/R	E/R	E/R	E/R
1	2	3	4	5	6	7	8
○	○	○	○	○	○	○	○
Sal.	Albu.	Brom.	Sal.	Albu.	Brom.	Sal.	Albu.

PRUEBA MAYOR: Los tubos 1, 2 y 3 se les ponen dos gotas del suero del receptor (S/R) más dos gotas de eritrocitos al 5% del donador (E/D). Al tubo dos, se le adicionan dos gotas de albumina al 20 o al 30%. Al tubo 3 se le adiciona -- una gota del reactivo de bromelina.

PRUEBA MENOR: Los tubos 4, 5 y 6 se les ponen dos gotas del suero del donador (S/D) más dos gotas de eritrocitos al 5% del receptor (E/R). Al tubo cinco se le adicionan -- dos gotas de albumina bovina al 20 o al 30%. Al tubo 6 se le adiciona una gota del reactivo de bromelina.

AUTOTESTIGO: Tubos 7 y 8 se les adiciona a ambos tubos, dos gotas de suero del receptor (S/R), más dos gotas de eritrocitos al 5% del mismo receptor (E/R). Al tubo ocho se le -- adicionan dos gotas de albumina bovina del 20 o 30%.

Se agitan los ocho tubos y se dejan reposar quince minutos a temperatura ambiente, se centrifugan, y se agitan suavemente observando si hay o no aglutinación.

Se incuban los tubos a 37°C durante treinta minutos, y se centrifugan observando si hay aglutinación agitando suavemente.

Comprobada la ausencia de aglutinación se procede a lavar tres veces los glóbulos con suero fisiológico. A fin de quitar los restos de proteína sérica, después de la última lavada, y una vez eliminada toda la solución salina sobrenadante se agre

ga una gota del suero de Coombs (Antiglobulina humana). Se incuban los tubos cinco minutos y se procede a centrifugar a -- 2000 R.P.M. durante dos minutos. El resultado se lee macroscópicamente.

Nota: Al terminar este proceso si no hay aglutina--  
ción en ninguno de los tubos, puede enviarse--  
la sangre para su aplicación.

**EIECCION DE LA SANGRE PARA EXANGUINEOTRANSFUSION  
PROBABLE INCOMPATIBILIDAD Rh (D)**

		SANGRE PARA EXANGUINEO		
HIJO	MADRE	1a. EIECCION	2a. EIECCION	3a. EIECCION
O+	O-	O-	PAQ O- +PLASMA O <sup>±</sup> AB <sup>±</sup>	
O+	A-	O-	PAQ O- +PLASMA O <sup>±</sup> AB <sup>±</sup>	
O+	B-	O-	PAQ O- +PLASMA O <sup>±</sup> AB <sup>±</sup>	
O+	AB-	O-	PAQ O- +PLASMA O <sup>±</sup> AB <sup>±</sup>	
A+	O-	A-	St. O- S/H	PAQ O- +PLASMA A <sup>±</sup> 6 AB <sup>±</sup>
A+	A-	A-	St. O- S/H	PAQ O- +PLASMA A <sup>±</sup> 6 AB <sup>±</sup>
A+	B-	A-	St. O- S/H	PAQ O- +PLASMA A <sup>±</sup> 6 AB <sup>±</sup>
A+	AB-	A-	St. O- S/H	PAQ O- +PLASMA A <sup>±</sup> 6 AB <sup>±</sup>
B+	O-	B-	St. O- S/H	PAQ O- +PLASMA B <sup>±</sup> 6 AB <sup>±</sup>
B+	A-	B-	St. O- S/H	
B+	B-	B-	St. O- S/H	
B+	AB-	B-	St. O- S/H	
AB+	O-	AB-	St. O- S/H	PAQ O- +PLASMA AB <sup>±</sup>
AB+	A-	AB-	St. O- S/H	PAQ O- +PLASMA AB <sup>±</sup>
AB+	B-	AB-	St. O- S/H	PAQ O- +PLASMA AB <sup>±</sup>
AB-	AB-	AB-	St. O- S/H	PAQ O- +PLASMA AB <sup>±</sup>

ELECCION DE LA SANGRE PARA EXANGUINEOTRANSFUSION  
PROBABLE INCOMPATIBILIDAD ABO

SANGRE PARA EXANGUINEO

HIJO	MADRE	1a. ELECCION	2a. ELECCION	3a. ELECCION
A <sup>±</sup>	O <sup>±</sup>	O <sup>±</sup> S/H	PAQ O <sup>±</sup> +PLASMA A <sup>±</sup> AB <sup>±</sup>	
A <sup>±</sup>	A <sup>±</sup>	O <sup>±</sup> S/H	PAQ O <sup>±</sup> +PLASMA A <sup>±</sup> AB <sup>±</sup>	
A <sup>±</sup>	B <sup>±</sup>	O <sup>±</sup> S/H	PAQ O <sup>±</sup> +PLASMA A <sup>±</sup> AB <sup>±</sup>	
A <sup>±</sup>	AB <sup>±</sup>	O <sup>±</sup> S/H	PAQ O <sup>±</sup> +PLASMA A <sup>±</sup> AB <sup>±</sup>	
B <sup>±</sup>	O <sup>±</sup>	O <sup>±</sup> S/H	PAQ O <sup>±</sup> +PLASMA B <sup>±</sup> AB <sup>±</sup>	
B <sup>±</sup>	A <sup>±</sup>	O <sup>±</sup> S/H	PAQ O <sup>±</sup> +PLASMA B <sup>±</sup> AB <sup>±</sup>	
B <sup>±</sup>	AB <sup>±</sup>	O <sup>±</sup> S/H	PAQ O <sup>±</sup> +PLASMA B <sup>±</sup> AB <sup>±</sup>	
AB <sup>±</sup>	O <sup>±</sup>	O <sup>±</sup> S/H	PAQ O <sup>±</sup> +PLASMA AB <sup>±</sup>	
AB <sup>±</sup>	A <sup>±</sup>	O <sup>±</sup> S/H	PAQ O <sup>±</sup> +PLASMA AB <sup>±</sup>	
AB <sup>±</sup>	B <sup>±</sup>	O <sup>±</sup> S/H	PAQ O <sup>±</sup> +PLASMA AB <sup>±</sup>	
AB <sup>±</sup>	AB <sup>±</sup>	O <sup>±</sup> S/N	PAQ O <sup>±</sup> +PLASMA AB <sup>±</sup>	

## DETERMINACION DE HEMOGLOBINA

## 1.- Fundamento.

En la técnica de cianometahemoglobina, se diluye la sangre con un reactivo que contiene ferricianuro y cianuro, el cual convierte hemoglobina reducida (Hb) y oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>) a la forma de cianometahemoglobina, la absorbancia de esta última a 540 nm. se usa así para la determinación cuantitativa.

## 2.- Material y aparatos.

## Reactivos

EDTA (como anticuagulante) al 10%

Diluyente de Drabkin.

Ferricianuro de potasio 200 mg.

Cianuro de potasio 50 mg.

Bicarbonato de sodio 1 mg.

Disolver y aforar a un litro con agua destilada.

## Material y equipo.

Tubos de 13 X 100 mm

Pipetas de Sahli (0.020 ml.)

## 3.- Método.

## Material biológico.

De 3 a 4 ml. de sangre con anticuagulante seco

Técnica.

A un tubo de 13 X 100 mm. se le ponen 5 ml. de la solución de drabkin más 0.020 ml. de sangre perfectamente mezclada con una pipeta Sahli. Mezclar por inversión y reposar diez minutos. Leer a 540 nm. La transmitancia leída se convierte a gramos de hemoglobina en 100 ml. de sangre con la curva de calibración.

CURVA DE CALIBRACION DE LA HEMOGLOBINA

Tubo No.	Solución de Hb. en diluyente de -- Drabkin ml. 60 mg%	Solución de cianometa - (o diluyente de Drabkin) ml.	Hemoglobina g/100 ml.
1	5	0.0	15.0
2	4	1.0	12.0
3	3	2.0	9.0
4	2	3.0	6.0
5	1	4.0	3.0
Blanco	0.0	5.0	0.0

## DETERMINACION DE BILIRRUBINA EN SUERO

## 1.- Fundamento.

La bilirrubina en el suero reacciona con ácido sulfanílico diazoado para formar azobilirrubina. La intensidad del color púrpura que se forma es proporcional a la concentración de bilirrubina en suero. Los glucurónidos de bilirrubina, la bilirrubina conjugada o directa reaccionan con el reactivo de diazoación en solución subsecuente de alcohol acelera la reacción de todas las formas de bilirrubina en el suero y se obtiene un valor para bilirrubina total después de dejar la muestra en reposo durante quince a treinta minutos. El valor de bilirrubina total representa la suma de los glucoronidos de bilirrubina (directa) y la bilirrubina no conjugada (indirecta).

## 2.- Material y aparatos.

Tubos de 13 X 100

Pipetas de 0.2 ml.

Espectrofotómetro. Coleman junior 11, modelo 6 T-35

**Reactivos**

Alcohol metílico absoluto R.A.

Reactivo A. Se disuelven 5 g. de ácido sulfanílico en 60 ml. de ácido clorhídrico concentrado en un matraz volumétrico de un litro y se afora hasta la marca con agua --

destilada.

Reactivo B. Solución de nitrito de sodio (p/v); 2 g. de - nitrito de sodio en 100 ml. de agua destilada.

Diazo blanco. Se diluyen 60 ml. de ácido clorhídrico hasta un volumen de 1 litro con agua destilada.

**Método:**

**Material biológico**

Se emplea suero obtenido de una muestra de sangre en el estado de posabsorción. Ha de evitarse hemólisis pues causa resultados falsamente bajos. Antes del análisis el suero se guardará en la obscuridad y la determinación se - - efectuará lo más pronto posible.

**Técnica:**

Micrométodo para la determinación de la bilirrubina. (método de Evelin-Malloy). En un tubo de 13 X 100 mm. colocar 2.6 ml. de agua destilada. Agregar 0.2 ml. de suero - problema.

En otros dos tubos poner:

	Bilirrubina directa		Bilirrubina total	
	Testigo	Problema	Testigo	Problema
Dilución anterior	0.7 ml.	0.7 ml.	0.7 ml.	0.7 ml.
Diazo blanco	0.2 ml.	-	0.2 ml.	-
Diazo reactivo	-	0.2 ml.	-	0.2 ml.
H <sub>2</sub> O destilada	0.9 ml.	0.9 ml.	-	-
Alcohol metílico	-	-	0.9 ml.	0.9 ml.

Diazo reactivo. Se agrega 0.3 partes del reactivo B a 10 partes del reactivo A y se mezcla. Ese reactivo ha de prepararse en un intervalo de 30 minutos antes de usarlo.

Reposar los tubos en un intervalo entre 15 y 30 minutos usando el testigo como blanco y leer a 550 nm.

Se utilizó como suero de calibración y referencia VERSATOL-Pediátrico.

#### Cálculos:

Los valores obtenidos son extrapolados a partir de la curva de calibración de bilirrubina total.

Los valores para la bilirrubina directa (reposados sólo un minuto), pueden obtenerse interpolando la lectura obtenida (% de transmitancia o D.O.) en la curva de calibración en función de la bilirrubina total.

Los valores para la bilirrubina no conjugada (indirecta) se obtienen restando la bilirrubina de un minuto (directa) de la bilirrubina total.

## CURVA DE CALIBRACION

Estándar de 20 mg/100 ml. (Versatol-Pediatric) (ml.)	Pool de sueros para diluir* (ml.)	Bilirrubina total (mg/100 ml.)
5	0	20
4	1	16
3	2	12
2	3	8
1	4	4
0	5	0

Los valores de absorbancia pueden usarse entonces para trazar la curva de absorbancia en función de la concentración como curva de calibración de bilirrubina total.

(\*) El Pool de sueros se prepara por reunión de 150 ml. de suero no hemolizado, no lipémico, ni ictérico.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE BILIRRUBINA  
EN LIQUIDO AMNIOTICO

Se utilizó la técnica de espectrofotometría de Li- -  
ley, 1963.

Se requiere de 10 ml. aproximadamente de líquido am-  
niótico obtenido por amniocentesis transabdominal. Como la bili-  
rrubina es inestable a la luz, la muestra se introduce inmedia-  
tamente a un tubo estéril y se protege de la luz.

La muestra se centrifuga a 3000 R.P.M. durante diez-  
minutos para eliminar de ella partículas, tales como eritrociti-  
tos y células epiteliales.

En general se usan muestras no diluidas, sin embar--  
go, podría ser necesario diluir una muestra fuertemente pigmen-  
tada antes del análisis. Si es necesaria la dilución se usa co  
mo diluyente Na Cl al 0.9%.

La muestra habrá de analizarse inmediatamente o guar-  
darse en el refrigerador y protegerse de la luz hasta que sea-  
analizada.

**Método:**

Se utilizó un espectrofotómetro Beckman modelo DB. -  
Del líquido sobrenadante claro se hace una curva de absorban--  
cia, tomando lecturas a intervalos de 5 nm. entre 580 y 350 nm.  
usando Na Cl al 0.9% en la cubeta de referencia.

Se traza la curva usando la gráfica de absorbancia-en función de longitud de onda específica.

Se traza una línea uniendo la porción lineal de la curva a 450 y 365 nm. aprox.

Se calcula el pico de absorbancia a 450 nm. como la diferencia de absorbancia entre la parte alta del pico y la línea de base (ver gráfica No. 1 página 35 ).

Un pico a 410 nm. aprox. indica la presencia de oxihemoglobina, la cual produce un 5% de error en el pico a 410-nm. del pico de absorbancia de bilirrubina a 450 nm.:

$$A_{450} \text{ corregido por oxihemoglobina} = A_{450} - (0.05 \times A_{410}).$$

La absorbancia corregida a 450 nm. puede convertirse a mg. de bilirrubina/100 ml. de líquido amniótico multiplicando por 1.25.

A corregida  $\times$  1.25 = mg. de Bilirrubina/100 ml. de líquido amniótico.

Si se diluyó la muestra, el resultado se multiplica por el factor de dilución.

**Factores de error:**

El líquido amniótico contaminado con sangre fetal o materna. En ocasiones la muestra que se entrega al laboratorio como líquido amniótico, es líquido de otro tipo; tales co

mo orina materna, líquido de quistes amnióticos, líquido escítico fetal o meconio.

Datos obtenidos de niños con nacimiento normal cuya madre e hijo fueron del mismo grupo y Rh. Concentración de hemoglobina y bilirrubina del cordón para determinar valores de referencia de nuestra población.

# De bebé	DAGT	Eluido	Bilirrubina no conjugada $\pm$ I s.d. (mg/dl)	Hemoglobina $\pm$ I s.d (gm/dl)
102 (81)	-	-	1.62 $\pm$ 0.653	16.58 $\pm$ 1.824

DAGT = Prueba indirecta de antiglobulinas

Los # en el paréntesis representan el # de niños a quienes se les determinó la hemoglobina.

s.d. Desviación estándar

Tabla No. 1.

Niños que requirieron exangineotransfusión por probable incompatibilidad a Rh.

(Todos ellos Rh-positivo de madre Rh-negativo sensibilizada)

Grupo sang.	Total 95		Bilirrubina no conjugada mg% <sup>±</sup> I s.d.		Hemoglobina g/dl <sup>±</sup> I s.d.		
	# de bebés	DAGT	IAGT	Preexangineot.	Postexangineot.	Preexangineot.	Postexangineot.
O +	65 (57)	+	+	12.477 <sup>±</sup> 7.101	6.261 <sup>±</sup> 4.06	10.952 <sup>±</sup> 3.598	12.114 <sup>±</sup> 1.236
A +	22 (19)	+	+	11.018 <sup>±</sup> 6.409	5.336 <sup>±</sup> 3.820	10.863 <sup>±</sup> 3.844	12.888 <sup>±</sup> 1.312
B +	6 (5)	+	+	8.54 <sup>±</sup> 4.782	4.02 <sup>±</sup> 1.920	12.38 <sup>±</sup> 3.64	12.788 <sup>±</sup> 1.26
AB +	2 (2)	+	+	6.5 <sup>±</sup> 0.707	2.6 <sup>±</sup> 0.5656	11.75 <sup>±</sup> 3.181	12.366 <sup>±</sup> 1.406

\* Los números en paréntesis representan el # de bebés a quienes se les determinó su hemoglobina preexangineotransfusión. A los bebés postexangineotransfusión a todos se les determinó su hemoglobina.

DAGT = Prueba directa de antiglobulinas (Cooms directo).

IAGT = Prueba indirecta de antiglobulinas (Coombs indirecto).

TABLA N° 2

Hijos de madres O Rh-positivos, con probable incompatibilidad al sistema ABO, exanguinados.

		Total 138			Bilirrubina no conjugada mg% $\pm$ I s.d.		Hemoglobina g/dl $\pm$ I s.d.	
Grupo sang.	# de bebés	DAGT	Eluido	Preexangui-neotrans.	Postexangui-neot.	Preexangui-neot.	Postexangui-neot.	
A	104	+	+	14.41 $\pm$ 4.230	6.156 $\pm$ 2.458	14.561 $\pm$ 2.717	12.368 $\pm$ 1.814	
		-	+	20.021 $\pm$ 1.478	10.1024 $\pm$ 1.856	14.526 $\pm$ 2.788	11.897 $\pm$ 1.714	
		-	-	21.117 $\pm$ 2.974	11.104 $\pm$ 2.590	14.985 $\pm$ 3.462	11.981 $\pm$ 1.906	
B	29	+	+	14.3857 $\pm$ 4.215	6.714 $\pm$ 4.218	14.60 $\pm$ 3.622	12.385 $\pm$ 1.212	
		-	+	19.345 $\pm$ 1.2477	9.754 $\pm$ 1.078	15.62 $\pm$ 2.813	12.417 $\pm$ 1.817	
		-	-	21.372 $\pm$ 4.26	11.545 $\pm$ 1.836	15.59 $\pm$ 2.703	11.882 $\pm$ 1.428	
AB	5	+	+	6.5 $\pm$ 0.707	2.6 $\pm$ 0.5656	11.75 $\pm$ 3.181	12.366 $\pm$ 1.400	
		-	+	18.6	8.7	16.5	12.6	
		-	-	22.5 $\pm$ 0.707	12.00 $\pm$ 0.848	9.402 $\pm$ 2.676	11.318 $\pm$ 0.928	

Los números en paréntesis representan el # de bebés a quienes se les practicó su hemoglobina preexangui-neotransfusión. A todos se les practicó en postexangui-neotransfusión.

DAGT = Prueba directa de antiglobulinas (Coombs directa).

\* Madres Rh-negativo.

Tabla No. 3

\* Niños exanguinados con diagnóstico de ictericia fisiológica, donde tanto madre como bebé tuvieron el mismo grupo y Rh.

# de bebés	Peso del bebé	DAGT	Eluido	Bilirrubina no conjugada mg%-I s.d.		Hemoglobina g/dl $\pm$ I s.d.	
				PreexanguineoT.	PostexanguineoT.	PreexanguineoT.	PostexanguineoT.
125 (93)	2497 $\pm$ 671.8	-	-	21.7 $\pm$ 2.159	10.29 $\pm$ 1.9567	17.05 $\pm$ 3.5934	15.08 $\pm$ 2.674

82 fueron recién nacidos prematuros (66%). 48 fueron recién nacidos de término normal (34%)!

35 casos excedieron de 18.4 g/dl de hemoglobina (policitémicos) antes de ser exanguinados.

Tabla No. 4

Niños exanguinados sin aparente incompatibilidad a grupo ni a Rh, y donde grupo de la madre e hijo es el mismo y como único antecedente fue madre diabética.

# de bebés	DAGT	Eluido	Bilirrubina no conjugada mg% $\pm$ I s.d.		Hemoglobina g/dl $\pm$ I s.d.	
			PreexanguineoT.	PostexanguineoT.	PreexanguineoT.	PostexanguineoT.
11 (9)	-	-	21.60 $\pm$ 2.465	10.08 $\pm$ 1.658	17.24 $\pm$ 3.2385	14.788 $\pm$ 1.550

Los números en paréntesis representaron el # de bebés a quienes se les determinó hemoglobina.

DAGT = Prueba indirecta de antiglobulinas.

Tabla No. 5.

Niños exanguinados cuyo diagnóstico fue septicemia, y donde la madre e hijo tuvieron el mismo grupo y Rh.

# de bebés	DAGT	Eluido	Bilirrubina no conjugada mg% $\pm$ I s.d.		Hemoglobina g% $\pm$ I s.d.	
			PreexanguineoT.	PostexanguineoT.	PreexanguineoT.	PostexanguineoT.
10 (7)	-	-	20.94 $\pm$ 3.476	10.56 $\pm$ 2.3195	14.2857 $\pm$ 3.329	12.162 $\pm$ 1.728

Tabla No. 6.

**RESULTADOS OBTENIDOS DE LIQUIDO AMNIOTICO**  
**(DETERMINACION DEL PICO DE ABSORBANCIA)**

<b>PROMEDIO DE DATOS OBTENIDOS EN PACIENTES NORMALES</b>			
<b># de Casos</b>	<b>Semanas de Gestación</b>	<b>Pico de absorbancia de *L.A.a 450 nm.</b>	<b>Bilirrubina mg/100 ml. L.A.</b>
1	28	0.060	0.075
2	30	0.040	0.050
3	33	0.030	0.0375
6	34	0.054	0.0675
4	35	0.035	0.4375
4	36	0.021	0.02625
2	37	0.020	0.025
6	38	0.010	0.0125
1	39	0.030	0.0375
1	40	0.008	0.010

\* L.A. Líquido amniótico.

Tabla No. 7

RESULTADOS OBTENIDOS DE LIQUIDO AMNIOTICO

(DETERMINACION DEL PICO DE ABSORBANCIA)

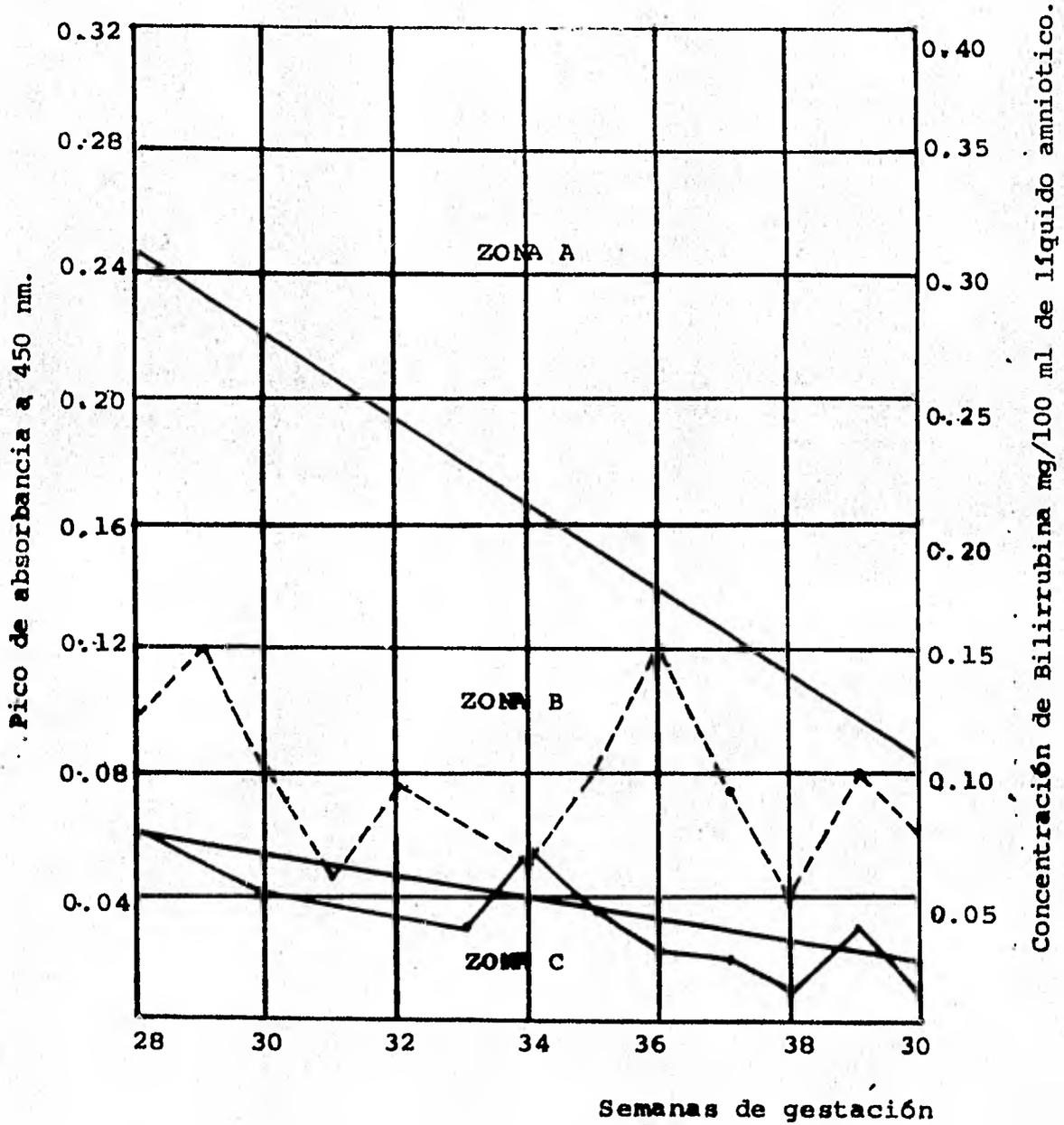
PROMEDIO DE DATOS OBTENIDOS DE PACIENTES Rh (-) SENSIBILIZADAS			
# de Casos	Semanas de Gestación	Pico de absorbanca de *L.A.a 450 nm.	Bilirrubina mg/100 ml. L.A.
2	28	0.098	0.1225
1	29	0.120	0.150
3	30	0.080	0.100
1	31	0.045	0.05625
1	32	0.075	0.09375
2	34	0.050	0.0625
1	35	0.08	0.100
2	36	0.12	0.150
5	37	0.075	0.09375
3	38	0.04	0.05
1	39	0.08	0.100
1	40	0.06	0.075

\* L.A. Líquido amniótico.

Tabla No. 8

GRAFICA PARA EVALUAR LA GRAVEDAD DE UN PROCESO  
HEMOLITICO.

Datos de: pacientes normales (—)   
 pacientes Rh (-) sensibilizadas (---)



Gráfica No. 3

## DISCUSION

En el estudio realizado, al análisis de los resultados obtenidos se observa que los niveles de bilirrubina y hemoglobina determinadas en 112 niños aparentemente sanos fueron de 1.62 mg/100 ml. con límites de (0.067-2.273) para bilirrubina y 16.58 g/100 ml. con límites de (14.76-18.40) para hemoglobina, los cuales fueron tomados como valores de referencia de nuestra población en estudio la cual comprendió la zona norte de la Ciudad de México. Ver Tabla No. 1.

De los 379 casos de exangineotransfusión por hiperbilirrubinemia no conjugada como se muestra en la Tabla No. 2. Un total de 95 casos fueron por incompatibilidad a Rh materno-fetal (25.065%), todos los casos fueron positivos para la prueba directa de Coombs, así como también la prueba de Coombs indirecta.

La concentración de bilirrubina antes de la exangineotransfusión como se observa en la Tabla 2, fue más baja en este grupo que en los exanguinados por incompatibilidad a grupo ABO e hiperbilirrubinemia fisiológica. Esto se debe a que el problema se detectó oportunamente en las primeras horas de vida, y en algunos casos antes del nacimiento, sirviéndonos para esto la prueba indirecta de Coombs, así como la determinación del pico de absorbancia en el líquido amniótico.

Se puede observar también que los niveles de hemoglobina, están por debajo del límite inferior de los valores de referencia, lo cual sugiere que la mayoría de ellos presentó anemia.

La eficacia de la exangineotransfusión para disminuir la concentración de bilirrubina fue satisfactoria, ya que la disminución fue de entre el 40 y el 50% y los niveles de hemoglobina tuvieron un aumento general entre 1.5 g/100 ml. y 2.0 g/100 ml. después de la exangineotransfusión. El Coombs directo fue negativo casi en todos los casos.

Por incompatibilidad al sistema ABO, Tabla No. 3.

Hubo un total de 138 casos (el 36.41%), 104 fueron por incompatibilidad al antígeno A, donde hubo 39 casos con la prueba directa de Coombs positivo así como también su eluido (el cual equivale a la prueba indirecta de Coombs), 41 casos fueron sólo positivos para el eluido y 24 casos fueron negativos para ambos, Coombs directo y eluido. En los casos con Coombs directo y eluido positivos la concentración media de bilirrubina fue de 14.41, exanguinándose los niños más rápidamente a causa de estos resultados. En los otros dos casos la concentración media de bilirrubina excede de los 20 mg/100 ml. por lo cual este parámetro determinó la exangineotransfusión. Al igual que en la tabla anterior la bilirrubina postexangineotransfusión tuvo niveles de entre el 40 y el 50% y la hemo-

globina fue un poco menor que la preexangineotransfusión.

Para el antígeno B hubo 29 casos de los cuales 7 fueron positivos para las dos pruebas inmunohematológicas, 11 sólo positivas para el eluido, y 11 negativas para ambas pruebas. Aquí se observa el mismo fenómeno que para el antígeno A cuando se detectaron los isoanticuerpos tanto en la prueba de --- Coombs directo como en el eluido, la bilirrubina indirecta fue de  $14.38 \pm 4.215$ . Sin embargo, con estas cifras fueron exanguinados, ya que detectados los anticuerpos era de esperarse cifras más elevadas de bilirrubina al cabo de cierto tiempo.<sup>2</sup>

Por incompatibilidad a AB hubo sólo 5 casos de los cuales 2 casos fueron positivos al Coombs directo y al eluido. Además, estos dos casos fueron también de madres Rh-negativas. Por lo tanto, esto explica la hiperbilirrubinemia. El por ciento de la disminución de la bilirrubina postexangineotransfusión fue de entre el 40 y el 60% la hemoglobina en cambio disminuyó de 2 a 3 g/100 ml. aprox.

La Tabla No. 4 muestra niños exanguinados con diagnóstico de ictericia fisiológica, hubo un total de 125 casos o sea el 32.98%. Todos los casos fueron negativos para las pruebas inmunohematológicas de Coombs directo y eluido. Además las madres en todos los casos fueron del mismo grupo y Rh (D) que el niño exanguinado. Esto refuerza aún más que no hubo problema de incompatibilidad. Sino más bien que hubo a una inmadurez hepáti-

ca y/o a otro problema, lo cual la convirtió en una ictericia-multifactorial la cual llevó al recién nacido a niveles peligrosos de bilirrubina no conjugada. Por lo cual se efectuó el-exangineotransfusión como terapia posterior al tratamiento -- por fototerapia.

El porcentaje en la disminución de bilirrubina post--exangineotransfusión fue del 47.41% y la hemoglobina disminuyó 2 g/100 ml. aprox. El 66% fueron prematuros y el 34% niños de término normal. 35 casos excedieron de 18.4 g/100 ml. (que es el límite superior normal obtenido en nuestra población de referencia), lo que sugiere que fueron niños con problemas de policitemia, la cual pudo ser causante directa o como factor adicional para producir la hiperbilirrubinemia.

En la Tabla 5 se agrupan niños exanguinados sin aparente incompatibilidad ni a grupo ABO ni a Rh (D) y cuyo antecedente común fue el de ser hijos de madres diabéticas. Se observaron negativas las pruebas inmunohematológicas. La bilirrubina excedió de los 20 mg/100 ml. lo cual, constituyó el factor para ser exanguinados de inmediato. La disminución de la bilirrubina postexangineo transfusión fue del 46.6% y la hemoglobina disminuyó 2.45 g/100 ml.

Se presentaron 10 casos de exangineotransfusión con posible septicemia (Tabla No. 6), donde el Coombs directo e indirecto fueron negativos la concentración media de bilirrubina fue de 20.94 mg/100 ml. lo cual constituyó también el factor -

para efectuar el exanguineotransfusión. El porcentaje de la bilirrubina postexanguineotransfusión fue de 50.42% y la hemoglobina disminuyó 2.12 g/100 ml.

En la Tabla No. 7 se ordenan los resultados obtenidos de la determinación del pico de absorbancia de líquido amniótico realizado en madres normales.

En la Tabla No. 8 se ordenan los resultados obtenidos de la determinación del pico de absorbancia de líquido amniótico, efectuada en madres Rh-negativas sensibilizadas.

En la gráfica No. 3 se ordenan los resultados de ambas tablas. Graficando el pico de absorbancia a 450 nm. contra las semanas de gestación. La línea continua, representa los valores graficados de las madres normales (no sensibilizadas), y la línea punteada muestra los valores obtenidos de las madres Rh-negativas sensibilizadas.

Se puede observar, que en general los picos de absorbancia son mayores en las madres Rh-negativo sensibilizadas -- (excepto en la semana 34). Esto muestra que el líquido amniótico de las madres Rh-negativas sensibilizadas contiene una mayor concentración de bilirrubina aunque no lo suficientemente alta como para estar en la zona A, que es la que sugiere grave proceso hemolítico fetal (ver página 37). Sino más bien en la zona B que sugiere un proceso hemolítico de leve a serio.

La línea continua muestra todos los puntos o picos -  
de absorbancia dentro de la zona C, que sugiere ausencia de en-  
fermedad o presencia de un proceso hemolítico leve.

## CONCLUSIONES

En base a los objetivos de este trabajo, podemos concluir, que en general se lograron las metas propuestas.

En primer termino, se lograron reunir los estudios -- realizados en el laboratorio clínico y servicio de transfusiones. Además, se hizo una revisión bibliográfica amplia, la cual nos ayudo a comprender mejor el metabolismo de la bilirrubina, la patogenesis de la ictericia, y los métodos comunes de tratamiento, así, como conocer, utilizar y dominar las técnicas de laboratorio y el servicio de transfusiones, para colaborar más-rápido y eficientemente en los casos de exanguineotransfusión.

Se logró clasificar a nuestra población en estudio según el diagnóstico, y se hizo un análisis estadístico según los resultados de laboratorio, los cuales sirvieron para hacer una-evaluación de la exanguineotransfusión, y cuya eficacia fue la-siguiente:

Se disminuyó la bilirrubina no conjugada aproximadamente entre un 40 a un 60%, se corrigio la anemia cuando la hubo y se disminuyo el titulo de anticuerpos cuando estos fueron-la causa de la ictericia.

Es importante la investigación de las causas de la hiperbilirrubinemia, en todos los casos, pero es de más ayuda en-el manejo mismo de la ictericia.

Cuando la clínica y las determinaciones de laboratorio, indican que ya los niveles de bilirrubina son peligrosos, el tratamiento a seguir es la exangineotransfusión.<sup>1,2,3,4</sup>

En la exangineotransfusión, también se renueva la albumina saturada de bilirrubina con albúmina fresca no saturada, llevando a un nuevo reequilibrio con la bilirrubina de los tejidos y la plasmática, pocas horas después de la exangineotransfusión.

El uso de la fototerapia es más apropiado cuando se inicia rápidamente, para el tratamiento de infantes clínicamente inestables, en quienes el riesgo consecuente a la exangineotransfusión es alto.

El uso de la fototerapia temprana en la enfermedad hemolítica del recién nacido tiende a enmascarar la verdadera velocidad de acumulación y puede permitir el progreso de una anemia hemolítica que puede ser tratada más eficazmente con una pronta exangineotransfusión. Es por ello la importancia del descubrimiento de anticuerpos que se detectan por la prueba de Coombs.

Es cierto que hay complicaciones reconocidas en la exangineotransfusión, aunque son muchas las causas estas son raras en niños sin patología adicional a la hiperbilirrubinemia.

## RESUMEN

En un grupo de 102 recién nacidos, aparentemente normales se les determinó niveles de bilirrubina no conjugada y -- niveles de hemoglobina para obtener los valores del grupo control de nuestra población en estudio. Estudiaron a 379 recién nacidos hiperbilirrubinemicos con elevación de bilirrubina no conjugada, los cuales fueron exanguinados. 95 casos fueron por incompatibilidad al antígeno Rh, se les determinó la prueba directa e indirecta de Coombs, niveles de bilirrubina no conjugada pre y postexanguineotransfusión. 138 casos fueron por incompatibilidad al sistema ABO, 125 tuvieron diagnóstico de ictericia fisiológica, 11 antecedentes maternos de diabetes, 10 probable septicemia. A todos ellos se les determinaron las siguientes pruebas: Prueba directa de Coombs, búsqueda de anticuerpos en el eluido (en los casos de incompatibilidad al sistema ABO), determinación de bilirrubina pre y postexanguineotransfusión, hemoglobina pre y postexanguineotransfusión. A los 379 recién nacidos ictericos se les seleccionó la sangre más adecuada.

Se determinó el pico de absorbancia en el líquido amniótico de 30 madres normales y de 23 madres Rh negativo sensibilizadas.

En general se lograron los objetivos de la exaguineo transfusión; se disminuyó la bilirrubina no conjugada aprox. - entre el 40 y el 60%, se corrigió la anemia cuando la hubo y - se disminuyó el titulo de anticuerpos cuando estos fueron la - causa de la ictericia.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Calbreath D.F.  
The Laboratory: Bilirubin—a small molecule  
J. Nurs Care 1980 Jan; 13 (1): 4, 31
- 2.- Cashore W. J.; Stern L.  
Hyperbilirubinemia and the pathogenesis of Kernicterus  
in the new born.  
Obstet. Gynecol Annu 1979; 8: 313-331.
- 3.- Chan-shu S. Y.; Blair O.  
ABO Hemolytic Disease of the Newborn  
Am. J. Clin. Pathol 1979 Jun; 71 (6): 677-9
- 4.- Desjardins L; Blajchman  
The spectrum of ABO hemolytic disease of the Newborn infant.  
J. Pediatric 1979 Sep; 95 (3); 447-449.
- 5.- Dodd B.E.; Lincon P. J.  
Inmunologia de los grupos sanguíneos.  
Ed. M. Moderno 1976 pág. 145-170.
- 6.- Ebbesen F.  
Evaluation of indication of early exchange transfusion in  
rhesus hemolytic disease during phototherapy.  
Eur. J. Pediatr. 1980; 133 (1); 37-40.
- 7.- Ellis M. I.; Hey E. N.  
Neonatal death in babies with rhesus immunization  
Q.J. Med. 1979 Apr; 48 (190): 211-225.
- 8.- Fevery J. Heirwegh K. F.  
Bilirubin metabolism.  
Int. Rev. physiol 1980; 21: 171-220
- 9.- Gradwohl's  
Clinical laboratory methods and diagnosis  
Seventh Ed. 1970 Vol. II Cap. 77 pág. 1534-5540  
The C.V. Mosby Company Saint Louis.
- 10.- Grundbacher F. J.  
The etiology of ABO hemolytic disease of the newborn  
Transfusion 1980 Sep-Oct; 20 (5); 563-568

- 11.- IMSS  
Procedimientos de laboratorio clínico  
Ed. 1978 pág. 451-453, 488-505
- 12.- Levine R. L.  
Bilirrubin: worked out years ago  
Pediatrics 1979 Sep; 64 (3); 380-385
- 13.- Matilich N.  
Jaundice in the neonate; theory practice  
Curr. pract. pediatric nurs. 1980; 3: 85-97
- 14.- Medina Aguilar  
El banco de sangre  
Prensa médica mexicana pág. 73-76, 85-88, 94-100, 131-138
- 15.- Mollison P. L.  
Blood transfusion in clinical medicine  
Sixth ed. Blackwell scientific publications. Cap. 16.  
pág. 666-723.
- 16.- Peevy K. J.; Landaw S. A.  
Hyperbilirrubinemia in infants of diabetic mothers  
Pediatric 1980 Sep; 66 (3); 417-419.
- 17.- Tietz, W. Norbert.  
Química clínica moderna  
Ed. interamericana pág. 770-788, 932-941
- 18.- Todd-Sanford  
Diagnóstico clínico por el laboratorio  
Ed. Salvat pág. 825-833; 1335-1343
- 19.- Wintrobe, M.M.; G. Richard Lee.  
Clinical hematology  
Seventh ed. cap. 27 pág. 891-910.  
Ed. Lea and Febiger Phil.