



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Informe de Práctica Profesional
Microtécnica para Dosificación de
Bilirrubinas en Recién Nacidos

GUILLERMINA CRUZ MUCIÑO

MEXICO, D. F.

1973



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.

Tesis

1973

Mit. 76



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN
EL TEMA

PRESIDENTE : Q.F.B. Fernando Vélez Orozco.
VOCAL : Q.F.B. Magdalena Acosta Segura.
SECRETARIO : Q.F.B. Ramón Guevara Estrada.
1er. SUPLENTE : Q.F.B. Dea Coronado Perdomo.
2do. SUPLENTE : Q.F.B. Alfredo Garzón Serra.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

CENTRO MEDICO NAVAL.

SUSTENTANTE : Guillermina Cruz Muciño.
ASESOR DEL TEMA: Q.F.B. Magdalena Acosta Segura.

Al Q.B.P. Javier G. de la Mora, Jefe del Laboratorio del Hospital Metropolitan A. G. a quien agradezco su ayuda para la realización de este trabajo.

A la maestra Q.F.B. Magdalena Acosta S. por su valiosa asesoría.

Al maestro Q.F.B. Ramón Guevara E. por su orientación.

Al H. Jurado.

A mis padres

A mis hermanos

A mis amigos

" S U M A R I O "

- I.- INTRODUCCION.
- II.- GENERALIDADES SOBRE LAS BILIRRUBINAS.
ENFOCADO A RECIEN NACIDOS.
- III.- EVALUACION SOBRE LAS MICROTECNICAS.
- IV.- ASPECTOS ESTUDIADOS:

}	EQUIPO.
	REACTIVOS.
	PREPARACION REACTIVOS.
	TECNICAS.
	PATRONES.
- V.- COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS,
CON MACRO Y MICROTECNICAS.
- VI.- RESUMEN.
- VII.- CONCLUSIONES.
- VIII.- BIBLIOGRAFIA.

" I N T R O D U C C I O N "

" I N T R O D U C C I O N "

La extracción de sangre en los recién nacidos, es relativamente difícil, por lo que es adecuado el uso de técnicas que con la menor cantidad de sangre, conduzcan a informar resultados exactos y reproducibles.

Dentro de las pruebas de rutina que con mayor frecuencia se hacen a los recién nacidos se encuentran las determinaciones de hematocrito, hemoglobina y bilirrubinas.

Es frecuente, además que estas determinaciones se lleven a cabo dentro de las primeras horas de vida del recién nacido, y que sea preciso practicarlas varias veces con intervalos de pocas horas entre una y otra, fundamentalmente en el caso en que hay necesidad de recurrir a la ex-sanguíneo transfusión.

Es por ello, que se consideró importante ensayar una microtécnica para la dosificación de bilirrubinas en el recién nacido que pudiera efectuarse indistintamente en suero o plasma.

El presente trabajo tiene como finalidad determinar la sensibilidad y reproducibilidad de la microtécnica comparando con los resultados obtenidos siguiendo la macrotécnica convencional.

" GENERALIDADES SOBRE LAS BILIRRUBINAS "
ENFOCADAS A RECIEN NACIDOS

" GENERALIDADES SOBRE BILIRRUBINAS "

Los eritrocitos al término de su vida, se destruyen y dejan en libertad la hemoglobina, que es una cromoproteína de peso molecular de 67 000 aproximadamente, queda libre - rompiéndose en dos fracciones , la proteica formada por la globina y la fracción prostética que está constituida por el grupo hem o protohem que es una combinación de fierro - con una porfirina , la globina representa el 96.4% y el resto está compuesto por el grupo hem, la globina se descompone por hidrólisis en aminoácidos.

El grupo hem rompe su anillo tetrapirrólico entre los - núcleos pirrólicos II y III separándose el fierro , dando origen a la biliverdina de vida transitoria , que inmediatamente por reducción da origen a la bilirrubina.

Las transformaciones podrán esquematizarse así :

Hemoglobina \rightleftharpoons Hemocromógeno \rightleftharpoons Protoporfirina \rightleftharpoons Bilirrubina \rightleftharpoons Mesobilirrubina \rightleftharpoons Urobilinógeno \rightleftharpoons Urobilina.
Estercobilina \rightleftharpoons Estercobilina.

La bilirrubina circula en la sangre en diversas formas , siendo excretada por los conductos biliares hacia el intestino donde sufre la acción reductora de las bacterias , que la

transforman en mesobilirrubinógeno y luego en urobilinógeno, éste es eliminado por las heces llamándose entonces esterco-bilinógeno, el cual con los rayos ultravioletas de la luz so-lar se transforma en estercobilina.

Parte del urobilinógeno es reabsorbido en el intestino, pasando al hígado que puede aprovecharlo para transformarlo nuevamente en bilirrubina, si esto no es posible, pasa al to-rrente circulatorio y es desechado por la orina, en donde de-bido a la acción de la luz es transformada en urobilina.

Normalmente, el organismo destruye el 1% de los eritro-citos por día; la bilirrubina procedente de la hemoglobina liberada del eritrocito, recibe el nombre de bilirrubina in-directa, que por estar intimamente ligada a las proteínas, --no es capaz de reaccionar directamente con el reactivo de --Erhlich, teniendo que agregarle alguna substancia, alcohol --por ejemplo, para romper esa unión con las proteínas y así --poder obtener la reacción colorida.

La bilirrubina indirecta al llegar al hígado es conju-gada formándose un mono ó diglucurónido que es capaz de reac-cionar directamente con el reactivo; parte de este glucuró--nido, pasa en cantidades pequeñas al torrente circulatorio, por lo que en éste, encontramos los dos tipos de bilirrubina: directa e indirecta.

Siendo los valores normales: Directa hasta 0.2 mg., Indirecta no mayor de 0.8 mg., y la suma de ambas ó bilirrubina total de 1.0 mg., por 100 ml., cualquier alteración en la destrucción eritrocítica tiene como consecuencia modificaciones cuantitativas en las transformaciones arriba citadas, de tal manera, que el hígado no es suficiente muchas veces para la eliminación de la bilirrubina formada.

O bien, aún cuando ésta substancia sea producida en cantidad normal, si hay deficiencia en la producción de la enzima glucuroniltransferasa, ocasiona el que no se forme el glucurónido, que es como el hígado elimina la bilirrubina.

En los casos de obstrucción de los canales biliares, -- hay regurgitación de la bilis dañando la celdilla hepática, pasando hacia el torrente circulatorio aumentando la concentración de bilirrubina directa en la sangre.

Por lo tanto, son tres los principales tipos de ictericia: el primero es aquel en el cual la elevada producción de bilirrubina es ocasionada por destrucción eritrocítica excesiva o ictericia hemolítica, en el segundo tipo no hay capacidad del hígado para el transporte y la conjugación de la bilirrubina tratándose entonces de ictericia hepática y el tercero es por imposibilidad de eliminación al obstruirse -- los canales biliares constituyendo la ictericia obstructiva.

De las tres, la que interesa para este trabajo es la ictericia hemolítica del recién nacido.

La ictericia hemolítica del recién nacido comprende diversos procesos hemolíticos que ocurren en el feto y se manifiesta en el recién nacido, siendo el más importante el debido a isoinmunización por el factor Rh siguiendo en importancia la debida a isoinmunización A B ó a otros grupos.

También se presenta la ictericia hemolítica en el caso de esferocitosis hereditaria.

La ictericia hemolítica del recién nacido se debe generalmente, a la presencia de una isohemolisina en el suero materno.

1.- La isoinmunización de una madre Rh negativa es por eritrocitos Rh positivos del feto, y en ciertos casos por transfusión ó inyección de eritrocitos Rh positivos.

2.- Producción en el organismo materno de una hemolisina y de una aglutinina anti Rh como respuesta al paso de pequeñas cantidades de eritrocitos fetales y su penetración a la circulación materna.

3.- Paso de estas hemolisinas y aglutininas a través de

la placenta, penetrando a la circulación del feto.

Igualmente puede haber isoinmunización, cuando hay incompatibilidad entre el padre y la madre en el sistema A B-O, por la presencia de inmunocuerpos; de hecho, se presentan con más frecuencia las ictericias hemolíticas debidas a incompatibilidad de la sangre de la madre con la de un feto del grupo A ó del grupo B que a incompatibilidad por Rh; aunque la isoinmunización por A ó B en general es más ligera y pasa desapercibida.

Ahora bien, la ictericia hemolítica puede prevenirse mediante los estudios de laboratorio necesarios, como son la determinación del Rh y del grupo sanguíneo de los padres para determinar el genotipo del futuro hijo, incluyendo la prueba de Coombs indirecta que permite conocer la presencia de anticuerpos en el suero materno.

Al determinar el Rh de los padres, se usará el suero anti D, aglutinando con éste la sangre de los Rh positivos y no aglutinando los Rh (anti D) negativos.

Entre el sistema Rh existen otras variantes pero sólo el Rh₀ (D) deberá tomarse en consideración, ya que es el antígeno más potente y causante de los problemas de eritroblastosis fetal.

Se ha demostrado la presencia de una inmunoglobulina en la sangre de cordón, siendo ésta la IgG que protege al recién nacido contra las bacterias gram-negativas tóxicas y virus, disminuye su presencia cuando el recién nacido empieza a producir sus anticuerpos como respuesta al medio ambiente, aproximadamente a los seis días de nacido. Estos anticuerpos son del tipo de la inmunoglobulina IgM, disminuyendo poco -- después de un mes de vida y continuando su elevación durante toda ella.

La producción de inmunoglobulina efectuada por la madre, se inicia prácticamente con la vida placentaria. Si hay anticuerpos en la madre producidos por una sensibilización anterior del tipo de inmunoglobulina IgG se presentan problemas de eritroblastosis.

" EVALUACION DE LAS MICROTECNICAS " .

" EVALUACION DE LAS MICROTECNICAS "

Actualmente, se hace necesario practicar sumultáneamente varias dosificaciones como son: glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, sodio, potasio, cloruros, CO₂, pH, pCO₂, pO₂, proteínas, a un sólo paciente, cuando se trata de un enfermo quemado, deshidratado ó bien en el caso de encontrarse edematizado, por las condiciones en que se encuentra no es posible extraerle la muestra de sangre suficiente para todas estas determinaciones.

También, se precisa efectuar varias determinaciones -- cuando se trata de averiguar el funcionamiento de un órgano, como por ejemplo en el caso particular del hígado, se solicitan las dosificaciones de bilirrubina directa e indirecta, fosfatasa alcalina, timol, cefalín colesterol, proteínas totales y relación A/G y a veces también las de lipasa y amilasa cuando se piensa en complicaciones con el páncreas, etc.; cada una de las citadas determinaciones, son útiles, ya que el conjunto en sí, sirve para valorar las diferentes funciones del hígado y no es posible suplir los datos obtenidos de unas pruebas por los resultados de otras, por lo tanto, se hace ventajoso el reducir el volumen de muestra utilizado en cada una de ellas, con objeto de hacer el mayor número de -- pruebas con el menor volumen de sangre, máxime si es necesario el repetirías.

Es por ello, que se recurre a las microtécnicas e inclusive si hay necesidad a las ultramicrotécnicas, por lo que - las anteriores pasan a convertirse en pruebas de rutina y no se precisa que se efectúen en un laboratorio especial, sino que es indispensable adaptar el equipo y los reactivos de -- acuerdo con las necesidades de las mismas.

Ahora bien, cabe aclarar que las macrotécnicas, se re- fieren al uso de 0.5 a 1.0 ml. ó más de sangre, microtécni- cas cuando se usa un volumen de 0.1 a 0.2 ml. y ultramicro- técnicas alrededor de 0.01 ml. (10 lambdas) ó menos.

" ASPECTOS ESTUDIADOS "

" MATERIAL Y EQUIPO "

OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Para seguir la técnica modificada de Malloy y Evelyn, se hace indispensable obtener de los recién nacidos, la muestra de sangre por punción venosa, de preferencia de la yugular externa, procurando obtener de 2 a 3 ml. de los que se vacían suavemente, sin presionar la jeringa, en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm. quitando la aguja antes de proceder a transvasar la muestra. Se deja coagular la misma y se centrifuga durante 10 ó 15 minutos, a 4,000 r.p.m. hasta separar el suero, el cual se retira con una pipeta Pasteur y se coloca en un tubo limpio y seco.

EQUIPO

- 1.- Fotocolorímetro.
- 2.- Celdillas para fotocolorímetro.
- 3.- Balanza analítica.
- 4.- Centrifuga con cabezal para tubos de 13 x 100 mm.
- 5.- Dos matraces aforados de 1000 ml.
- 6.- Dos matraces aforados de 100 ml.
- 7.- Dos pipetas de 10 ml. terminales, graduadas en décimas, por cada determinación.
- 8.- Dos pipetas de 5 ml. terminales, graduadas en décimas, por cada determinación.
- 9.- Dos pipetas de 1 ml. terminales, graduadas en décimas, por cada determinación.

- 10.- Gradilla para tubos de 13 x 100 mm.
- 11.- Gradilla para tubos de 15 x 125 mm.
- 12.- Tubos de 13 x 100 mm.
- 13.- Tubos de 15 x 125 mm.
- 14.- Jeringa de 10 ml.
- 15.- Agujas de bisel corto del #20 x 32.

REACTIVOS

- 1.- Acido Clorhídrico concentrado Q.P.
- 2.- Alcohol metílico Q. P. anhidro.
- 3.- Cloroformo Q. P. P. E. 59.5 - 60.5°C.
- 4.- Acido sulfanílico Q. P.
- 5.- Nitrito de sodio Q. P.
- 6.- Bilirrubina. Calidad reactivo analítico.

PATRONES

- 1.- Control comercial de Bilirrubina conteniendo 20 mg/ml.

PREPARACION DE REACTIVOS

1.- Solución A.- Pesar un gramo de ácido sulfanílico y disolverlo en 200 ml. aproximadamente de agua destilada caliente. Enfriar y colocar en un matraz aforado de 1000 ml. en el cual han sido vaciados 15 ml. de ácido clorhídrico q. p. y aforar hasta la marca con agua destilada.

2.- Solución B.- Nitrito de sodio al 0.5%, que se prepara pesando 50 mg. de nitrito de sodio que se disuelven en 10 ml. de agua destilada. Este reactivo se prepara en el momento de usarse.

3.- Diazo Reactivo.- Se prepara mezclando 10 ml. de la solución A con 0.3 ml. de la solución B. Este reactivo deberá utilizarse dentro de la media hora siguiente a su preparación.

4.- Diazo Blanco.- Medir 15 ml. de ácido clorhídrico concentrado, colocar en un matraz aforado de un litro y diluir hasta la marca con agua destilada. Este reactivo es estable indefinidamente.

5.- Solución Patrón de Bilirrubina.- (1 ml = 0.4 mg.). - Colocar 40 mg. de bilirrubina en 75 ml. de cloroformo en un matraz volumétrico de 100 ml., calentar en B.M. a 55°C hasta la completa disolución de la bilirrubina, enfriar y aforar a 100 ml. con cloroformo. Conservar en un frasco ámbar perfectamente cerrado y en el refrigerador. Para trabajarse deberá diluirse con alcohol metílico, siendo ésta dilución ó diluciones inestables, por lo que hay necesidad de prepararla inmediatamente antes de usarse.

También puede prepararse una solución patrón, pesando bilirrubina para obtener una concentración de más de 5 mg. por

100 ml., disolviendo directamente en carbonato de sodio 0.10 M ó bien en hidróxido de sodio 0.05 N. La bilirrubina deberá pesarse rápidamente y al abrigo de la luz, debiendo utilizar se éste patrón enseguida.

6.- Solución Patrón Comercial.- Rehidratar el contenido del frasco con el volumen de agua destilada indicada en el folleto adjunto. Diluir 1 ml. de ésta solución patrón con 9 ml. de agua destilada para tener 1 ml. = 0.2 mg. en esta dilución. Se toman partes alícuotas necesarias para calibrar el aparato utilizando un frasco nuevo para cada calibración. O bien, de preferencia deberá trabajarse esta solución patrón simultáneamente con el suero problema para verificar los datos obtenidos con anterioridad.

La solución patrón de bilirrubina calidad reactivo, carece de las proteínas que contiene el suero, por lo que hay necesidad de agregarlas en forma de albúmina bovina ó bien de sueros carentes de cromógenos. Los patrones comerciales si contienen estas proteínas. Si se opta por la solución patrón no comercial habrán de efectuarse correcciones, por el contenido de bilirrubina del suero agregado.

T E C N I C A S

Existen diferentes modificaciones de la técnica de Malloy y Evelyn para determinación de bilirrubinas, siendo una de ellas el aumento en la concentración de ácido sulfanílico y de clorhídrico con objeto de acelerar la reacción ó bien - después de adicionar sulfato de sodio, se hacen extracciones de la bilirrubina con cloroformo, se evaporan los líquidos - de extracción, se recupera el volumen con alcohol metílico y se añade reactivo de Ehrlich. (Técnica de Sepúlveda Osterberg).

Se eligió para el presente trabajo, la técnica de Malloy y Evelyn modificada, por Van den Bergh y Muller, que es la - más exacta.

Fundamento.- Consiste en que al tratar la bilirrubina - con el reactivo de Ehrlich (ácido sulfanílico diazoado) da - un compuesto colorido conocido como azorrubina o azobilirrubina el cual puede ser cuantificado.

Técnica.- En un tubo se diluye 1 ml. de suero o plasma con 9 ml. de agua destilada.

Bilirrubina Directa.- Se marcan dos tubos de 15 x 125 - mm., el primero como "BD" (blanco directa) y el segundo como "PD" (problema directa).

- 1.- En cada uno de los tubos se miden 2.5 ml. de agua destilada.
- 2.- Se mide 0.5 ml. de diazo blanco en el tubo "BD".
- 3.- Se mide 0.5 ml. de diazo reactivo en el tubo "PD".
- 4.- A ambos tubos ("BD" y "PD"), se les agrega 2 ml. de la dilución 1:10 del suero problema perfectamente mezclado.
- 5.- Se mezcla cada tubo por inversión y se dejan reposar diez minutos.
- 6.- Se vacía el contenido del primer tubo "BD" en la celdilla del fotocolorímetro y se lleva el aparato a cien por ciento de transmitancia, con el filtro 550 nm y se cambia por la otra celdilla - que contenga el problema directo. Transformar la lectura a mg. por % en la tabla de calibración.

Bilirrubina Total.- Se usan también dos tubos de 15 x - 125 mm. marcando el primero como "BT" (blanco total) y el -- otro "PT" (problema total).

- 1.- En cada tubo se miden 2.5 ml. de alcohol metílico.
- 2.- Al primer tubo ("BT") se le agrega 0.5 ml. de diazo blanco.
- 3.- Al segundo tubo ("PT") se le agrega 0.5 ml. de diazo reactivo.
- 4.- A uno y otro tubo se les agrega 2.0 ml. de la dilu-

ción 1:10 del suero problema.

- 5.- Se mezclan cada uno por inversión y se dejan reposar de veinte a treinta minutos.
- 6.- Después de los cuales se lee con filtro 550 nm. usando como blanco o testigo, el contenido del primer tubo para llevar a cien por ciento de transmitancia.

La lectura obtenida se transforma a mg. por 100 ml.

Los cálculos son:

mg. de bilirrubina total - mg. de bilirrubina directa
= mg de bilirrubina indirecta.

TECNICAS ESTUDIADAS

Determinación de Bilirrubinas

Microtécnica

El método utilizado en este trabajo para la determinación de bilirrubinas en recién nacidos es el de Malloy y -- Evelyn modificado, usando 0.20 ml. de suero ó plasma en total sin modificar el volumen de los reactivos. En la macro-técnica, ya antes citada, el volumen utilizado es de 1 ml. de muestra.

Tiene también como fundamento la reacción de Vander -- Bergh, que se lleva a cabo entre la bilirrubina y el reactivo de Ehrlich formando un compuesto colorido el cual se - puede cuantificar.

EQUIPO PARA LA DETERMINACION.

- 1.- Fotocolorímetro o espectrofotómetro (Leitz y Coleman).
- 2.- Celdillas para fotocolorímetro Leitz cuadradas y Coleman 10/75 cilíndricas.
- 3.- Balanza analítica.
- 4.- Microcentrífuga (11,000 r.p.m.)
- 5.- Matraces aforados de 1000 ml.
- 6.- Matraces aforados de 100 ml.

- 7.- Pipetas de 10 ml. terminales graduadas en décimas.
- 8.- Pipetas de 5 ml. terminales graduadas en décimas.
- 9.- Micropipetas de 0.05 ml. T. C.
- 10.- Gradilla para tubos de 15 x 125 mm.
- 11.- quemador de gas Bunsen ó lámpara de alcohol.

R E A C T I V O S

- 1.- Acido clorhídrico concentrado, Q.P.
- 2.- Alcohol metílico Q. P. anhidro.
- 3.- Cloroformo Q. P. (P.E. 59.50C - 60.50C)
- 4.- Acido sulfanílico Q.P.
- 5.- Nitrito de sodio Q.P.
- 6.- Bilirrubina Q.P.

P A T R O N E S

- 1.- Patrón pediátrico comercial 20 mg / 100 ml.
- 2.- Patrón preparado en el laboratorio.

EQUIPO PARA TOMA DE MUESTRAS

- 1.- Capilares heparinizados de 1.1 a 1.2 mm. diám.
exterior x 75 mm.
- 2.- Lancetas desechables.

OBTENCION DE LA MUESTRA

Punción Capilar.- Para obtener la sangre por punción capilar, se limpia el talón ó el dedo gordo del pie, con una to runda con alcohol, se hace la punción con unalanceta desecha- ble.

La sangre que fluye se recoge en un tubo capilar hepari- nizado, el llenado del tubo se hace por el extremo marcado -- con un anillo coloreado, colocándolo en posición horizontal - para que el tubo se llene libremente por capilaridad, evitan- do la formación de burbujas de aire dentro del tubo, así como también la coagulación de la muestra, lo que se logra con un movimiento rotatorio tan leve como sea posible.

Los capilares para ser centrifugados, se cierran por ca- lentamiento del extremo opuesto al utilizado para se llenados, utilizando para ello una lámpara de alcohol ó bien un quema-- dor de gas Bunsen.

En la cuantificación de bilirrubinas por la microtécnica se necesitan de 8 a 12 capilares, dependiendo éste número de la concentración de los elementos figurados, los capilares -- pueden ser utilizados para obtener las lecturas del hematocri to, que se solicita simultáneamente con la determinación de - hemoglobina y de bilirrubina.

Leída la cifra del hematocrito, se cortan los capilares con una sierra para ampolletas, haciendo el corte a un milímetro más arriba del paquete celular, teniendo cuidado de tapar el extremo abierto y con el plasma se procede a llenar las micropipetas que deben estar limpias y secas. El paquete celular además puede enviarse al Banco de Sangre para determinar pruebas de grupo, Rh y Coombs directo.

Los capilares ya cortados, deben utilizarse cuanto antes para el desarrollo de la técnica, ya que por evaporación el plasma se concentra dentro de los capilares y después se hace difícil el extraer el plasma para llenar las pipetas, obteniendo con ello valores altos de bilirrubina.

Las pipetas se llenan colocando el capilar de tal manera que se forme un ángulo obtuso con la punta de la pipeta, el plasma entrará a ésta por capilaridad, lo que si no se logra de primer intento, se puede lograr haciendo vacío con la boca mediante un tubo de látex de diámetro apropiado; una vez llenas hasta la marca se procurará que no se formen burbujas, limpiándose con una gasa para evitar error por volumen.

M I C R O T E C N I C A S

Para efectuar la determinación de bilirrubinas por microtécnica se pueden hacer las siguientes variaciones en el volumen:

R E A C T I V O S	B. D I R E C T A		B. T O T A L	
	BLANCO	PROBLEMA	BLANCO	PROBLEMA
Agua destilada	2.5 ml	2.5 ml	1.0 ml	1.0 ml
Metanol	-----	-----	1.5 ml	1.5 ml
Diazo blanco	0.3 ml	-----	0.3 ml	-----
Diazo reactivo	-----	0.3 ml	-----	0.3 ml
	A G I T A R		A G I T A R	
Suero ó plasma	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml

Aunque se puede determinar la bilirrubina como se indica en el cuadro anterior, se prefirió adoptar la microtécnica que se cita a continuación, con objeto de evitar confusiones si hay necesidad de procesar pruebas simultáneas, en el trabajo de rutina:

REACTIVOS	B. D I R E C T A		B. T O T A L	
	BLANCO	PROBLEMA	BLANCO	PROBLEMA
Agua destilada	4.45 ml	4.45 ml	1.95 ml	1.95 ml
Metanol	-----	-----	2.5 ml	2.5 ml
Diazo blanco	0.5 ml	-----	0.5 ml	-----
Diazo reactivo	-----	0.5 ml	-----	0.5 ml
	M E Z C L A R		M E Z C L A R	
Plasma	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml

En ambas técnicas , la bilirrubina directa se lee a los diez minutos y la total a los treinta en longitud de onda - de 550 nm.

Ahora bien, la lectura obtenida en % de transmitancia, se convierte a mg %, en una tabla de valores que previamente se han obtenido, mediante diluciones de patrones de concentración conocida.

Los valores en miligramos, se multiplican por cuatro, para la técnica propuesta, ya que el volumen usado de plasma es de 0.05 ml y el volumen utilizado por la macrotécnica, es de 0.2 ml, siendo los cálculos de las bilirrubinas los mismos que para la macrotécnica.

En la ictericia del recién nacido, a diferencia de los - casos de eritroblastosis fetal, el niño, en el momento de su nacimiento nunca tiene ictericia, ésta suele presentarse después, y es normal obtener de 4 a 6 mg de bilirrubina total - en el primer día de nacido.

Considéranse valores patológicos, los que indican una elevación de 1 mg o más por cada 100 ml por hora; en los casos de ictericia hemolítica va acompañado dicho aumento, de disminución brusca en la hemoglobina y en el hematocrito.

" COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON
MACRO Y MICROTECNICAS "

CASO

SANGRE VENOSA
MacrotécnicaSANGRE CAPILAR
Microtécnica.

	<u>B.T.</u>	<u>B.D.</u>	<u>B.I.</u>	<u>B.T.</u>	<u>B.D.</u>	<u>B.I.</u>
1	14.0	1.2	12.8	15.2	0.8	14.4
2	18.9	0.8	18.1	19.4	1.2	18.2
3	22.7	0.8	21.9	22.2	1.2	21.0
4	19.5	0.7	18.8	20.2	1.2	19.0
5	14.1	0.5	13.6	15.0	1.2	13.8
6	9.4	0.8	8.6	10.0	0.8	9.2
7	3.7	0.5	3.2	4.2	0.8	3.4
8	11.9	0.7	11.2	12.4	0.8	11.6
9	12.8	0.9	11.9	13.2	1.2	12.0
10	14.5	1.0	13.5	15.0	1.2	13.8
11	8.6	0.7	7.9	9.2	0.8	8.4
12	12.2	0.7	11.5	12.8	0.8	12.0
13	2.8	0.8	2.0	3.4	0.8	2.6
14	13.2	0.5	12.7	13.8	0.8	13.0
15	23.2	1.0	22.2	22.6	0.8	21.8
16	27.2	1.2	26.0	28.0	1.4	26.6
17	32.0	1.8	30.2	32.8	2.2	30.6
18	8.3	0.5	7.8	9.8	0.8	9.0
19	18.0	2.0	16.0	18.9	2.2	16.7
20	13.6	0.7	12.9	14.8	0.8	14.0
21	12.6	0.9	11.7	13.2	0.8	12.4

CASO	SANGRE VENOSA Macrotécnica			SANGRE CAPILAR Microtécnica.		
	<u>B.T.</u>	<u>B.D.</u>	<u>B.I.</u>	<u>B.T.</u>	<u>B.D.</u>	<u>B.I.</u>
22	19.5	1.0	18.5	20.0	0.8	19.2
23	16.9	0.9	16.0	18.8	0.8	18.0
24	14.5	1.0	13.5	15.0	1.2	13.8
25	18.0	1.2	16.8	18.6	1.4	17.2
26	15.0	1.2	13.8	14.6	1.4	13.2
27	12.6	0.9	11.7	13.0	1.2	11.8
28	15.6	1.0	14.6	16.2	1.4	14.8
29	18.4	1.0	17.4	18.9	1.4	17.5
30	7.2	0.7	6.5	7.8	0.8	7.0
31	6.1	0.7	5.4	6.4	0.8	5.6
32	13.4	0.7	12.7	13.8	0.8	13.0
33	11.2	0.7	10.5	11.4	0.8	10.6
34	16.6	0.8	15.8	16.8	1.2	15.6
35	18.0	1.0	17.0	18.2	0.8	17.4
36	15.0	0.8	14.2	15.6	0.8	14.8
37	16.6	0.7	15.9	17.4	0.8	16.6
38	2.2	0.5	1.7	2.5	0.8	1.7
39	12.0	0.5	11.5	12.8	0.8	12.0
40	23.8	1.0	22.8	24.6	1.2	23.4
41	20.6	0.7	19.9	21.4	0.8	20.6

CASO	SANGRE VENOSA Macrotécnica			SANGRE CAPILAR Microtécnica.		
	B.T.	B.D.	B.I.	B.T.	B.D.	B.I.
42	21.4	0.9	20.5	23.0	1.2	21.8
43	17.4	1.2	16.2	19.8	1.6	21.8
44	15.8	0.7	15.1	17.4	1.2	16.2
45	17.4	0.8	16.6	18.8	1.2	17.6
46	6.8	0.7	6.1	7.2	0.8	6.4

Con las cifras obtenidas, se procede a determinar la prueba t (Student) para las bilirrubinas total, directa e indirecta, usando la fórmula:

$$t = \sqrt{\frac{\sum (d^2) - \frac{(\sum d)^2}{46}}{45}} \quad \text{donde}$$

d = (mg bilirrubina (macro.) - mg bilirrubina (micro.))

encontrando los valores siguientes:

Bilirrubina Total:	$\left\{ \begin{array}{l} t \text{ práctica} = .2180 \\ t \text{ teórica} = .126 \end{array} \right.$	Significativa.
Bilirrubina Directa:	$\left\{ \begin{array}{l} t \text{ práctica} = .200 \\ t \text{ teórica} = .126 \end{array} \right.$	Significativa.
Bilirrubina Indirecta	$\left\{ \begin{array}{l} t \text{ práctica} = .5947 \\ t \text{ teórica} = .126 \end{array} \right.$	Significativa.

También se calculó la desviación standard como se cita a continuación:

Determinaciones	Suma de n	\bar{X}	σ	Valores obtenidos dentro del límite de aceptación			
				65% $\bar{X} \pm \sigma$	95% $\bar{X} \pm 2\sigma$	99.5% $\bar{X} \pm 3\sigma$	
Bilirrubina Total (Mac.)	685.20	14.8	± 6.08	74%	95.7%	100%	0%
Bilirrubina Directa (Mac.)	40.0	0.86	± 0.3	80.5%	95.7%	100%	0%
Bilirrubina Indirecta (Mac.)	645.2	14.0	± 6.1	71.8%	95.7%	100%	0%
Bilirrubina Total (Mic.)	716.1	15.5	± 5.95	71.8%	95.7%	100%	0%
Bilirrubina Directa (Mic.)	48.6	1.05	± 0.35	82.7%	95.7%	100%	0%
Bilirrubina Indirecta (Mic.)	667.5	14.5	± 5.91	67.5%	91.4%	100%	0%

Obteniendo por último, la distribución de F donde:

$$F = \frac{\text{varianza mayor}}{\text{varianza menor}}$$

La tolerancia en valores tabulados es de 1.54 para el 5% y de 1.86 para el 1%, siendo las cifras de distribución F:

Bilirrubina Total:	F práctica = 1.04
	F teórica = 1.54
Bilirrubina Directa	F práctica = 1.36
	F teórica = 1.54
Bilirrubina Indirecta	F práctica = 1.04
	F teórica = 1.54

Para las tres series analizadas se tienen resultados significativos, por lo que se infiere que nuestro método es correcto.

Finalmente, con objeto de hacer ostensible la diferencia en exactitud entre los resultados de la macro y microtécnica, se eligieron las cifras máxima, mínima y promedio como se indica a continuación:

<u>CIFRAS</u> mg %	<u>MACROTECNICA</u>			<u>MICROTECNICA</u>		
	<u>B.T.</u>	<u>B.D.</u>	<u>B.I.</u>	<u>B.T.</u>	<u>B.D.</u>	<u>B.I.</u>
Máxima	32.0	2.0	30.2	32.8	2.2	30.6
Mínima	2.2	0.5	1.7	2.5	0.8	1.7
Promedio	14.8	0.86	14.0	15.5	1.05	14.5

Las diferencias encontradas son las siguientes:

Máxima: total - 0.8, directa - 0.2, indirecta - 0.4

Mínima: total - 0.3, directa - 0.3, indirecta - no hubo

Promedio: total - 0.7, directa - 0.19, indirecta - 0.5

" RESUMEN " .

" R E S U M E N "

- 1.- Se obtuvieron muestras de sangre por punción venosa y por punción capilar de cuarenta y seis recién nacidos, con hiperbilirrubinemia.
- 2.- Se determinó el contenido de bilirrubina total, directa e indirecta, tanto en el suero procedente de la sangre venosa como en el plasma obtenido en la muestra de la punción capilar de cada uno de los recién nacidos.
- 3.- Simultáneamente se efectuaron las determinaciones con - ambos métodos (Macro y Microtécnica).
- 4.- Se registraron los resultados en una tabla (Capítulo V)
- 5.- De los resultados obtenidos se sacaron diferencias entre las bilirrubinas total, directa, e indirecta de ambos - métodos, calculando el promedio, la desviación standard, los límites de aceptación, los valores que se incluyeron en los diferentes momentos ($\bar{X} \pm 0$; $\bar{X} \pm 2\sigma$ y $\bar{X} \pm 3\sigma$); la prueba t (Student) y de F, para correlacionar las premisas.
- 6.- Al final, se determinó por selección de los resultados : máximo, mínimo y promedio , la sensibilidad de los métodos utilizados.

" C O N C L U S I O N E S " .

" CONCLUSIONES "

- 1.- Los valores obtenidos para la prueba t son significativos porque la t práctica es mayor que la t teórica, indicando con ello, que el error obtenido es real y no es debido solamente al azar.
- 2.- Al referir los resultados del macro y micrométodo a los límites de aceptación, se encontraron dentro de una distribución normal.
- 3.- Las cifras calculadas para la distribución F, están dentro del 5% del error tabulado.
- 4.- Las diferencias encontradas, corresponden a valores ligeramente más elevados, obtenidos con la microtécnica.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se concluye - que con el macrométodo de Malloy y Evelyn, se obtienen valores más exactos, pero esta exactitud se limita cuando se utiliza la microtécnica que se practica con un volumen total de 0.2 ml de muestra, constituyendo una ventaja cuando se trata de recién nacidos.

" BIBLIOGRAFIA " .

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bell, G. H. and N. Y. Davidson. 1960.
Fisiología y Química Biológica.
El Ateneo. III Ed. Argentina. 464.
- 2.- Gehartz H. 1972.
Klinik D. Frein Univ. Berlín: Die Immunreaktion.
Med. Klin. M. C. 124.34.
- 3.- Maxwell, M. y M. D. Wintrobe. 1969.
Hematología Clínica. Editorial Interamericana.
III Ed. México, D. F. 622.
- 4.- Marín, M. y L. G. Campo 1971.
Progresos en Patología Clínica.
Volumen XVIII. Tomo II.
S. L. Editores Madrid. I Ed. 385.
- 5.- Knights Jr. M. and D. E. Mac Donald. 1962.
Ultramicro Methods For Clinical Laboratories.
Grune y Stratton Inc.
2nd. Ed. New York N. Y. 60.
- 6.- Levinson, A. S. and R. P. Mac Fate. 1972.
Diagnóstico Clínico de Laboratorio.
El Ateneo. II Ed. Argentina. 189.

- 7.- Tietz, W. N. 1972.
Química Clínica Moderna.
Editorial Interamericana. I Ed. México, D. F. 199.
- 8.- Barret, T. J. 1970.
Inmunología.
Editorial Interamericana. I Ed. México, D. F. 121.
- 9.- Smith, M. D., T. Conant, F. Norman. 1971.
Microbiología de Zinsser.
Uteha. IV Ed. México, D. F. 321.
- 10.- Spinetti B. M. 1957.
Manual de Bioquímica.
Científica Médica. III Ed. España. 398.
- 11.- Vélez Orozco F. 1967.
Apuntes de Análisis Clínicos.
- 12.- Allen, K. N. 1963.
Manual de Hyland de Inmunoematología.
Los Angeles, Cal. E. U. A. 98.
- 13.- Gebhardt L. P. 1972.
Microbiología.
Editorial Interamericana. IV Ed. México, D. F. 133.

- 14.- Harrow, B. y A. Mazur. 1957.
Tratado de Bioquímica.
Editorial Interamericana. IV Ed. 134.
- 15.- Laguna J. 1968.
Bioquímica.
Editorial Gournier. II Ed. México, D. F. 594.
- 16.- Henry, M. D. and J. Richard. 1964.
Clinical Chemistry Principles and Technics.
Hoeber Medical Division.
Harper & Row Publishers. New York. N. Y. 110.
- 17.- Lynch, M. J. and Stanly. 1969.
Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology.
W. B. Saunders. II Ed. U. S. A. 179.
- 18.- Natelson, S. 1963.
Microtechniques of Clinical Chemistry.
Charles C. Thomas. 2nd. Ed. Illinois U. S. A. 130.
- 19.- Meites, S. 1965.
Standard Methods of Clinical Chemistry. Vol. V.
Academic Press. New York and London. 68.

- 20.- Page, B., N. A. Lot, M. D. Cubrer and J. Perry. 1961.
A Syllabus of Laboratory Examinations in Clinical.
Diagnosis.
Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.410.
- 21.- Wiener, A. 1943.
Blood Groups and Transfusion.
Charles C. Thomas. III Ed. Baltimore Maryland. 369.
- 22.- Winchester, A. M. 1966.
Heredity an Introduction to Genetics.
Barnes and Noble. II Ed. New York. 133.
- 23.- Kolmer J. A. and L. Tuft. 1942.
Clinical Immunology, Biotherapy and Chemoterapy.
W. B. Saunders Company. I Ed. U. S. A. 90.
- 24.- Levine, P. Vogel and R. E. Rosenfield. 1953.
Haemolytic disease of the newborn. Advances in
Pediatrics. Vol. VI.
- 25.- Arias I. M. and J. M. London 1957.
References in the bilirrubin. Distrubution in Serum.
Science. 963.

26.- Sidney, S. 1972.

Estadística no paramétrica.

Editorial Trillas. II Ed. 39.

27.- Cortada de Kohan N. y J. M. Carro. 1970.

Estadística Aplicada.

Editorial Universitaria. IV Ed. 145.