
FACULTAD DE QUIMICA

U.N.A.M.

**Microdeterminación de Bilirrubinas en Suero
por Medio de la Azobilirrubina Alcalina**

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :
RICELA AGATON HERNANDEZ

5

México, D. F.

1974





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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
1974
Mit



QUÍMICA

A MIS PADRES y

A MIS HERMANOS

CON TODO MI CARINO.

CON MI AGRADECIMIENTO SINCERO
AL DR. FRANCISCO J. RESANO P.
POR SU VALIOSA AYUDA EN LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA.

PRESIDENTE. PROF. FERNANDO VELEZ OROZCO.
VOCAL. " GUADALUPE VELEZ PRATT.
SECRETARIO. " DEA CORONADO PERDOMO.
1er. SUPLENTE." Mg. ELENA BUSTAMANTE.
2o. SUPLENTE " ALFREDO GARZON SERRA.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA. Laboratorio de Pediatría -
del Centro Médico Nacional.

SUSTENTANTE. RICELA AGATON HERNANDEZ. *Ricela Agaton Hernandez*

ASESOR DEL TEMA. Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO. *Dea Coronado Perdomo*

SUPERVISOR TECNICO. DR. FRANCISCO J. RESANO PEREZ. *Francisco J. Resano Perez*

INTRODUCCION.

Uno de los problemas de más difícil solución - que se plantean en un laboratorio clínico, es el de la determinación cuantitativa de las bilirrubinas llamadas: - "directa" e "indirecta", este hecho es de particular importancia en los hospitales donde se atienden pacientes - en el período neonatal. Por un lado la falta de métodos seguros y accesibles y por otro la cantidad de suero necesaria en la determinación, complican el problema.

Mi interés al realizar este trabajo fué el de - aplicar el principio analítico de un procedimiento químico muy ventajoso, que consiste en acelerar el acoplamiento de la bilirrubina indirecta con el diazo-reactivo, por medio de la cafeína-benzoato de sodio-acetato de sodio, y analizarla fotométricamente en medio alcalino.

Este principio fué descrito hace varios años, sin embargo a pesar de lo ventajoso de sus características fotoquímicas, (de las cuales hago consideraciones - posteriormente,) no había sido aplicado a la determinación en muestras capilares, que es la forma en que comunmente se toma el producto en la actualidad en los niños recién nacidos.

Me pareció conveniente describir las características del método empleado aquí, en lo relativo - al comportamiento espectrofotométrico, a la velocidad de desarrollo de color, a la influencia de la concentración de los reactivos, a la estabilidad del compuesto colorido, la variación experimental en los parámetros desviación estándar, error estándar y coeficiente de variación, en un rango de valores de 2.1 a 21.0 mg por 100 ml y finalmente establecer la dispersión de valores en población aparentemente sana de uno y otro sexo.

GENERALIDADES.

METABOLISMO DE LA BILIRRUBINA.

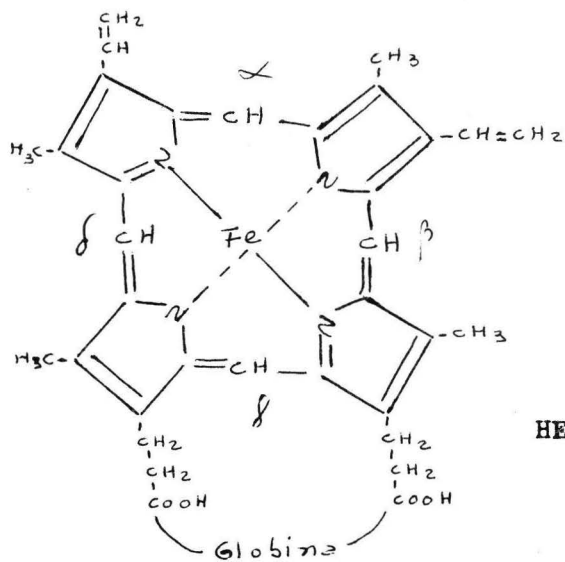
La formación de la bilirrubina y su eliminación del cuerpo como un producto de desecho del catabolismo del "heme" requiere una serie de procesos metabólicos y de transporte.

Aproximadamente el 85 % de la bilirrubina formada en el organismo humano se deriva de la destrucción dentro del sistema retículo-endotelial de eritrocitos seniles.

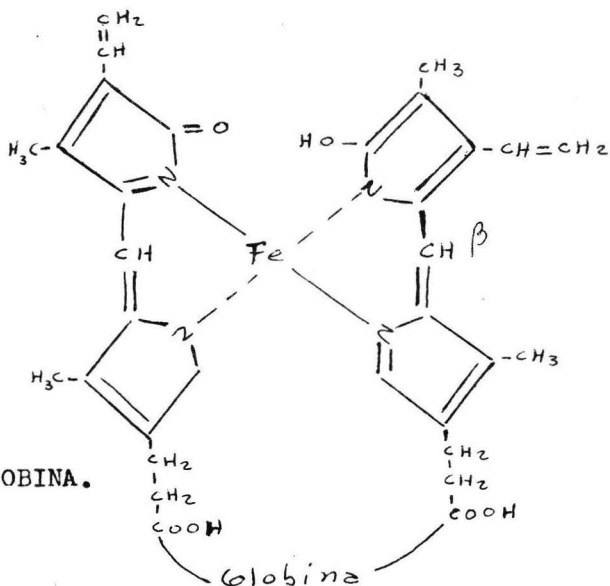
El resto de la bilirrubina (15 %) proviene de heme-proteínas, síntesis directa de bilirrubina a partir de anillos de porfirina y degradación intracorpúscular de hemoglobina, durante la maduración de los eritrocitos. (17).

Los pasos involucrados en la formación de la bilirrubina se encuentran esquematizados en las figuras que aparecen en seguida.

El primer paso en la formación de la bilirrubina a partir de la hemoglobina es la escisión de su molécula por remoción del puente \sphericalangle meteno del anillo de protoporfirina unido a la globina, dando lugar a un compuesto llamado: VERDO-HEMOGLOBINA ó FERRO-BILI-VERDIN -GLOBINA.



HEMOGLOBINA.



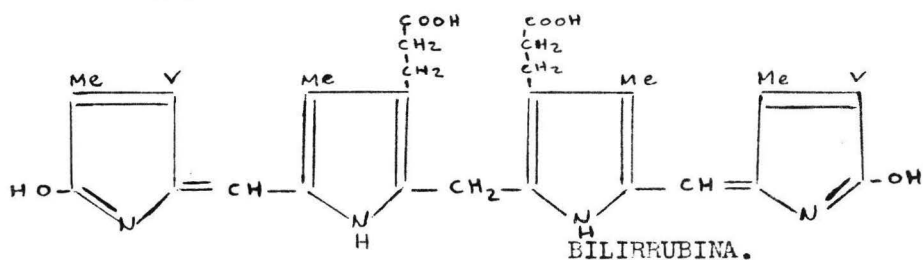
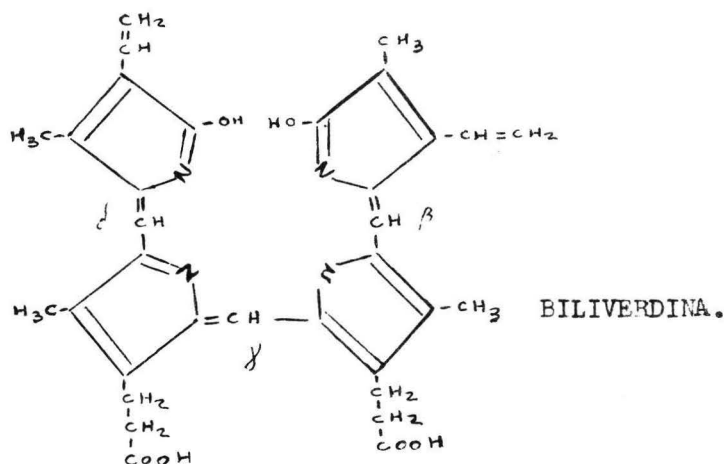
VERDO-HEMOGLOBINA.

6

FERRO-BILI-VERDIN-GLOBINA.

FIGURA I.

El siguiente paso es la remoción del fierro y de la globina para formar la BILIVERDINA y de ésta la reducción del grupo γ meteno a grupo metileno constituyéndose la BILIRRUBINA.



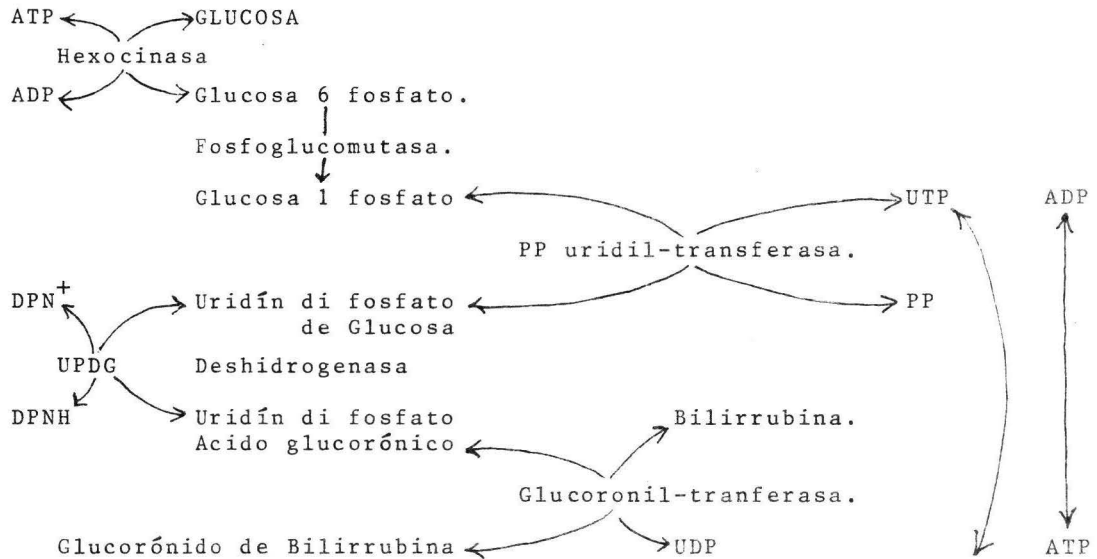
A la cadena de cuatro núcleos pirrólicos así constituida se le llama "bilirrubina indirecta", ya que no reacciona en medio acuoso con el diazo-reactivo, - también se le llama "proteinato de bilirrubina". Esta bilirrubina es transportada en el plasma unida a las albúminas

principalmente y es tomada por las células del parénquima hepático por medio de aceptores específicos.

La afinidad del hígado por la bilirrubina transportada en estas condiciones es muy grande, se ha podido determinar en ratas, que el 65 % de una inyección intravenosa de bilirrubina radiactiva desaparece en menos de 5 minutos. (17).

El mecanismo de esta rápida transferencia no está dilucidado, sin embargo se sabe que está encomendado a dos proteínas que actúan como aceptores y que se les ha designado con las letras Y y Z, las cuales después de separar a la bilirrubina de la albúmina, permiten su entrada a la célula hepática. Este sistema parece ser también importante en la introducción de ciertas drogas y esteroides en la misma célula. (16).

La conjugación toma lugar a través de la utilización del ácido glucurónico en un sistema enzimático realizado por la enzima conocida comúnmente como glucuronil-transglucuronilasa, la cual cataliza la transferencia del ácido glucurónico a varios receptores aminos, carboxílicos y fenólicos. La bilirrubina forma un éster glucurónico-carboxílico y su síntesis se efectúa en una de las vías del metabolismo de la glucosa.



El glucurónido de bilirrubina que es un compuesto soluble en agua es transportado a través de la célula hasta el aparato de Golgi y los canalículos biliares, en donde es activamente excretado por un proceso en el cual la membrana plasmática parece ejercer un papel importante, en virtud de que su superficie es grandemente incrementada por la formación de microvellosidades y por la presencia de fosfatasa que están relacionadas con el transporte activo de iones en otras células. (17).

La bilirrubina conjugada pasa a formar parte de los componentes de la bilis, que es almacenada y concentrada en la vesícula biliar. La eliminación de esta mezcla de compuestos se efectúa por contracción de la vesícula biliar gobernada por la enzima colecistoquinina pancreozimina (2). La bilis del hígado es mucho más diluida que la de la vesícula biliar y el contenido de sales biliares parece tener una gran importancia para mantener la solubilidad de esta última y evitar la formación de cálculos biliares, ya que se ha sugerido que la pérdida de sales biliares aumenta el riesgo en el establecimiento de dicho proceso patológico (3).

La bilirrubina al ser conjugada se convierte en un compuesto insoluble en solventes de lípidos ---

y este hecho previene el regreso a la circulación a través de la mucosa del intestino delgado. Las bacterias la reducen en el colon transformándola en estercobilinógeno, del cual un porcentaje pequeño es absorbido y excretado en la orina como urobilinógeno.

Una falla parcial o total en cualquier punto de toda la secuencia descrita anteriormente puede dar como resultado la aparición de ictericia.

CUANTIFICACION DE BILIRRUBINA.

Para la determinación de bilirrubinas los métodos más usados se han basado en los descubrimientos de Erlich (1883), él describió el acoplamiento de la bilirrubina con el ácido sulfanílico diazoado para formar un pigmento rojo en soluciones neutras y un pigmento azul en soluciones fuertemente ácidas ó alcalinas. VAN DEN BERGH Y SNAPPER (30) usaron este color para mediciones cuantitativas en suero.

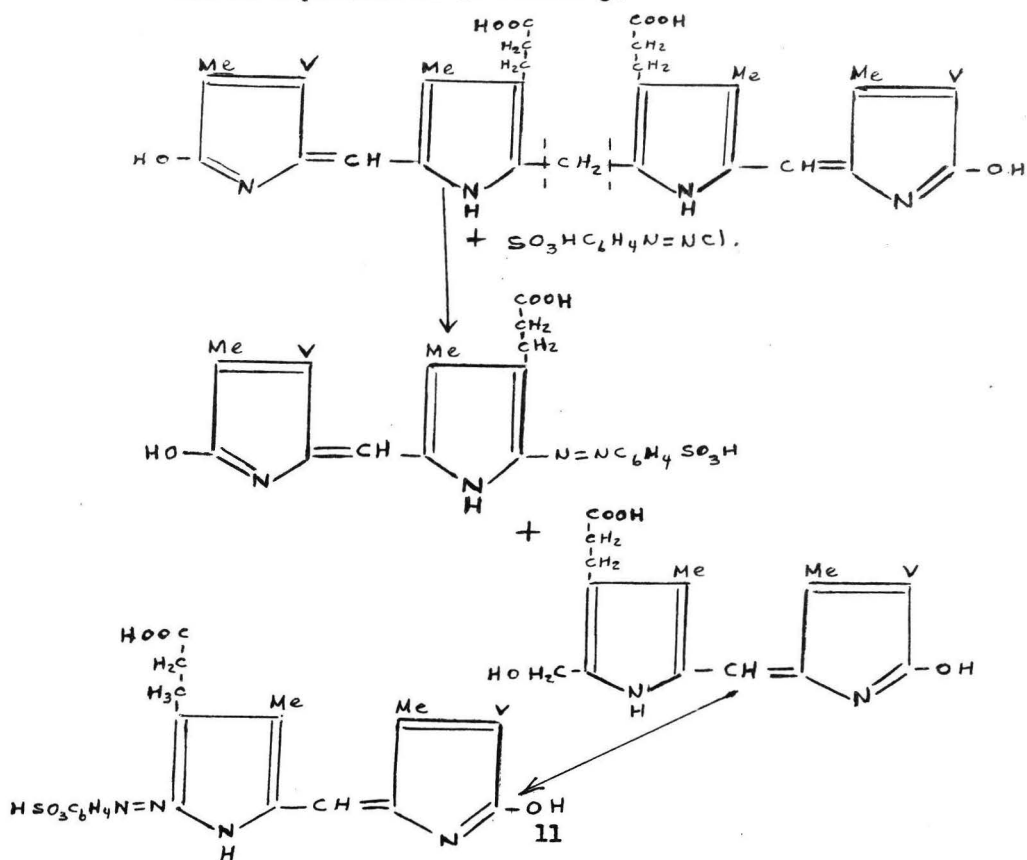
Más tarde VAN DEN BERGH Y MULLER (31) descubrieron el efecto "acelerador" del alcohol en la reacción de acoplamiento.

ADLER Y STRAUS (1) encontraron aceleración con cafeína-benzoato de sodio. JENDRASSIK Y GROF (15) combinaron cafeína-benzoato de sodio con acetato de sodio diazoado con ácido sulfanílico al 0.5 % (P/V) y formaron la azobilirrubina alcalina a pH de 13.4 WITH (32) FOG (12) NOSSLIN (21) Y MICHAELSSON (20) hicieron estudios detallados con resultados favorables para este método. SCHELLONG Y WENDE (26) Y SCHELLONG (27) reportaron favorablemente una micromodificación para usos pediátricos.

OVERBEEK, VINK Y DEENSTRA en 1955 (22) de-

mostraron que en un sistema de solventes orgánicos la reacción de acoplamiento se efectúa en dos fases, y que la primera reacción se produce a una considerable mayor velocidad que la segunda.

La reacción entre la bilirrubina y el ácido diazobencen p-sulfónico ha sido postulada de acuerdo -- con lo expresado en la FIGURA 3.



(Posteriormente BILLING Y LATHE en 1958, la modificaron).

Las flechas marcan las dos fases de la reacción.

Me = Metil.

V = Vinil.

R = H en bilirrubina no conjugada.

R = glucuronyl, en bilirrubina diglucurónico.

Los dos isómeros azopigmentados tienen idénticos espectros de absorción (22) y ellos comunmente se refieren a azobilirrubina.

Las curvas de absorción a diferente pH han sido estudiadas sistemáticamente por FOG.

El diglucurónido de bilirrubina es fácilmente soluble en agua e insoluble en cloroformo. Después de la separación cromatográfica es muy inestable y rápidamente se oxida a biliverdina. Tratando con álcali la unión éster rápidamente se hidroliza formando bilirrubina no conjugada y ácido glucurónico.

No obstante no ha sido posible aislar o sintetizar cada uno de los pigmentos conjugados en su forma pura.

La primera contribución de importancia fué hecha por COLE Y LATHE en 1953, (8) cuando separaron por cromatografía los pigmentos de las reacciones directa e indirecta del suero.

Al mismo tiempo COLE, LATHE Y BILLING en 1954 (9) demostraron que el pigmento de la reacción directa es tá formado por dos compuestos llamados provisionalmente: Pigmento I y Pigmento II. Más tarde ellos encontraron que estos pigmentos eran conjugados de bilirrubina y ácido glucurónico. BILLING Y LATHE (5); BILLING, COLE Y LATHE (6).

La presencia del ácido glucurónico en el pigmento de la reacción directa fué demostrado simultáneamente por SCHMID (28) Y TALAFANT en 1956 (29).

En 1916 HIJMANS VAN DEN BERGH Y MULLER (31) describieron las diazo-reacciones de bilirrubinas directa e indirecta en suero.

Ellos encontraron la bilirrubina indirecta - en sueros de pacientes con ictericia hemolítica. Esta bilirrubina dió reacción únicamente después de la adición del etanol. La bilirrubina directa se encontró en sueros de pacientes con ictericia obstructiva y en estos sueros pudo verificarse la reacción sin agregar etanol. La explicación para este diferente comportamiento de las bilirrubinas en suero ha sido dado ahora por los trabajos de --- COLE Y LATHE (8), COLE, LATHE Y BILLING (9), BILLING Y -- LATHE (5), SCHMID (28) y TALAFANT (29).

La bilirrubina conjugada con ácido glucurónico, tiene la propiedad de reaccionar directamente con ácido diazobencen p-sulfónico mientras que la bilirrubina no conjugada necesita la adición de un "acelerador" antes de acoplarse

La propiedad de ciertas sustancias para acelerar la reacción ha sido claramente explicada. Ello se atribuye a una acción "solubilizante" sobre la bilirrubina no conjugada, al pH de la reacción es insoluble en agua. Otra explicación es que el diazo-acoplamiento de la bilirrubina no conjugada es posible únicamente cuando alguno de los sustituyentes es movido de una posición de acoplamiento de la bilirrubina (25). El efecto de las sustancias aceleradoras debe entonces de facilitar esta substitución.

Se conocen gran número de sustancias aceleradoras y han sido usadas en los diversos métodos y modificaciones de éstos, para la determinación de bilirrubinas en suero. Los aceleradores más comunmente usados son: metanol, etanol, cafeína-benzoato de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio y urea.

MATERIAL Y METODOS.

El trabajo fué realizado en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional del I.M.S.S. y se dividió en tres partes:

- a).- Análisis de las características del método empleado.
- b).- Influencia de diferentes factores.
- c).- Investigación de la dispersión de valores en población aparentemente sana.

a).- El método empleado se basa en el descrito por JENDRASSIK Y GROF (15) el cual ha sido modificado para hacer un micrométodo, adaptando el principio general a la determinación de la bilirrubina total y de la determinación de bilirrubina directa, con el objeto de obtener al final, el mismo compuesto colorido en B. directa y en B.total, lo cual no habíamos visto descrito previamente.

La B. indirecta se obtiene por diferencia.

FUNDAMENTO DEL METODO.

Bilirrubina total.

El suero o plasma es agregado a una solución que es una mezcla de acetato de sodio y cafeína benzoato de sodio.

El amortiguador de acetato de sodio controla el pH de la reacción diazoica, mientras que la cafeína benzoato de sodio acelera la unión de la bilirrubina con el diazoico del ácido sulfanílico.

Se agrega una solución fuertemente alcalina para convertir el rojo de la azobilirrubina en azul, ya que esta inversión de color aumenta la especificidad en cuanto a su comportamiento óptico. A 600 nm. los pigmentos amarillos - no bilirrubínicos y otros rojos y pardos no muestran actividad óptica importante. El color aparece verde finalmente porque la azobilirrubina alcalina de color azul se mezcla con pigmentos amarillos derivados de una reacción entre cafeína y diazo-reactivo.

Bilirrubina directa.

La bilirrubina directa se acopla al diazo-reactivo en medio ácido (pH 1.5), y una vez terminado el --- tiempo de reacción, se adiciona ácido ascórbico, reactivo de cafeína, reactivo alcalino y se mide fotométricamente.

El ácido ascórbico actúa como inhibidor del acoplamiento entre diazo-reactivo y bilirrubina aún en presencia de aceleradores.

MATERIAL BIOLÓGICO.- Suero.

El material biológico utilizado se obtuvo de -- 319 niños en edades comprendidas de 1 mes a 16 años, y en condiciones lo más cercanas a las basales.

El suero se separó por centrifugación dentro - de los 30 minutos después de haber obtenido la muestra de sangre.

MATERIAL DE VIDRIERIA Y EQUIPO.

Pipeteadores Oxford modelo R y modelo S-A.

Micropipetas tipo K M P de 0.025 ml.

Pipetas serológicas de 0.1 ml.

Pipetas serológicas de 0.2 ml.

Pipetas serológicas de 2.0 ml.

Pipetas volumétricas de 1.0 ml.

Pipetas volumétricas de 3.0 ml.

Matraces aforados de 500 ml. y de 1000 ml.

Centrífuga.

Celdillas de 1 cm. de paso de luz.

Celdillas de sílica cuadradas de 1 cm. de paso de luz.

Absorciómetro L. K. B. 7400.

Espectrofotómetro P. M. Q. II de Carl-Zeiss.

Pipetas Pasteur.

Tubos de ensaye.

REACTIVOS.

- 1.- Mezcla de cafeína-benzoato de sodio, acetato de sodio para B. total.
- 2.- Mezcla de cafeína-benzoato de sodio, acetato de sodio para B. directa.
- 3.- Mezcla alcalina.
- 4.- Diazo A.
- 5.- Nitrito de sodio al 20 % (P/V).
- 6.- Diazo-reactivo.
- 7.- Acido ascórbico al 5 %.
- 8.- Acido clorhídrico 0.05 N.

PREPARACION DE REACTIVOS.

1.- MEZCLA DE CAFEINA PARA B. TOTAL.

50g. de cafeína alcaloide purificada	$C_{18}H_{10}N_4O_2$
75 g. de benzoato de sodio	$C_6H_5COO Na$ U.S.P.
125 g. de acetato de sodio granular	$CH_3COO Na \cdot 3 H_2O$

Disolverlos en agua destilada a 50°- 60° C enfriar y aforar a 1 lt. Este reactivo guardado en frascos de vidrio ó polietileno es estable por más de 6 meses a la temperatura ambiente.

2.- MEZCLA DE CAFEINA PARA B. DIRECTA.

100 g. de cafeína alcaloide purificada	$C_{18}H_{10}N_4O_2$
150 g. de benzoato de sodio	$C_6H_5COO Na$ U.S.P.
250 g. de acetato de sodio granular	$CH_3COO Na \cdot 3 H_2O$

Disolverlos en agua destilada a 50°- 60°C,-
enfriar y aforar a 1 lt. Este reactivo es igual de estable --
que el anterior y se conserva en las mismas condiciones.

3.- MEZCLA ALCALINA.

100 g. de Na OH.

350 g. de tartrato de sodio y potasio $K Na C_4 H_4 O_4 \cdot 4 H_2 O$

Disolverlos en agua destilada y aforar a -
1 lt. Esta solución es estable y puede durar más de 6 meses
a la temperatura ambiente, guardada en frascos de vidrio ó po
lietileno.

4.- DIAZO A.

5 g. de ácido sulfanílico.

60 ml. de H Cl.

Se disuelven 5 g. de ácido sulfanílico en -
60 ml. de H Cl conc. Se mezclan y se diluyen a 1 lt. con agua
destilada.

5.- NITRITO DE SODIO.

Disolver 20 g. de nitrito de sodio en agua
destilada y diluir a 100 ml. Esta solución deberá guardarse -
en frascos de color ámbar y en el refrigerador. La solución
de nitrito de sodio puede guardarse indefinidamente, pero es
preferible descartarla si se vuelve ligeramente amarilla.

DIAZO B.

Diluir el nitrito de sodio al 20 ‰, 1:10 -
para usarse. Este reactivo debe prepararse diariamente.

6.- DIAZO-REACTIVO.

Mezclar 5 ml. de Diazo A más 0.15 ml. de Diazo B. Este reactivo es estable solamente 30 minutos.

7.- ACIDO ASCORBICO al 5 %.

Disolver 5 g. de ácido ascórbico en 100 - ml. de agua destilada. Este reactivo debe guardarse en el refrigerador, es estable por 3 meses como mínimo.

8.- ACIDO CLORHIDRICO 0.05 N

4.3 ml. de ácido clorhídrico concentrado y aforar a 1 lt. con agua destilada.

PROCEDIMIENTO.

En tres celdillas marcadas:

1 B.directa. 2 B.total. 3 Blanco.

(Para cada determinación.)

1.- Se utilizó un pipeteador Oxford modelo R para medir en las celdillas 2 y 3, 0.6 ml. de la mezcla del reactivo para la cuantificación de B.total. En la celdilla 1 se midieron 0.3 ml. de H Cl 0.05 N.

2.- Se agregó a cada una de las celdillas 0.025 ml. de suero en estudio, procurando la mayor exactitud posible.

3.- A la celdilla 3 se agregaron 0.05 ml. de ácido ascórbico al 5 % y en seguida,

4.- Se agregó a cada una de las tres celdillas 0.2 ml. de diazo-reactivo y se agitó perfectamente para mezclar los reactivos.

Se dejaron 10 minutos a la temperatura ambiente la celdilla 1 y 30 minutos la celdilla 2.

5.- Se agregaron 0.05 ml. de ácido ascórbico a las celdillas 1 y 2.

6.- Se agregó en la celdilla 1, 0.3 ml. de la mezcla cafeína-benzoato de sodio para B. directa y se agitó muy bien.

7.- A cada una de las tres celdillas se agregaron 0.25 ml. de la mezcla alcalina, agitando muy bien y se dejaron en reposo 30 minutos, al cabo de los cuales se hicieron las lecturas a 600 nm. de longitud de onda.

Las lecturas obtenidas en D.O. se convirtieron a mg/% en las tablas de calibración.

Se corrió un patrón de concentración - conocida diariamente.

	B. directa.	B. total.	Blanco.
Tubo No.	1	2	3
Ac. Clorhídrico 0.05 N	0.3 ml.	-----	-----
Cafeína (Total).	-----	0.6 ml.	0.6 ml.
Suero.	0.025 ml.	0.025 ml.	0.025 ml.
Acido ascórbico 5 ‰	-----	-----	0.05 ml.
Diazo-reactivo.	0.2 ml.	0.2 ml.	0.2 ml.

Agitar suavemente para mezclar los reactivos.

1.- Se deja 10 minutos a la temperatura ambiente el tubo de bilirrubina directa.

2.- Se deja 30 minutos a la temperatura ambiente el tubo de bilirrubina total.

Acido ascórbico 5 ‰	0.05 ml.	0.05 ml.	-----
Cafeína (Directa).	0.3 ml.	-----	-----
Mezcla alcalina.	0.25 ml.	0.25 ml.	0.25 ml.

Mezclar perfectamente los reactivos.

Se dejan en reposo 30 minutos y se leen contra el -
Blanco a 600 nm. de longitud de onda.

CURVA DE CALIBRACION.

La curva de calibración se hizo con una solución patrón de bilirrubina, (Versatol Pediátrico de 21.0 mg/%), - haciendo las diluciones del Versatol con albúmina preparada - al 6 %.

No. Tubo.	ml. Versatol.	ml. Albúmina 6%.	Conc. mg/ %.
1	0.1	0.9	2.1
2	0.2	0.8	4.2
3	0.3	0.7	6.3
4	0.4	0.6	8.4
5	0.5	0.5	10.5
6	0.6	0.4	12.6
7	0.7	0.3	14.7
8	0.8	0.2	16.8
9	0.9	0.1	18.9
10	1.0	0	21.0

De cada una de las diluciones anteriores se - tomaron 0.025 ml. para la B.total y se efectuaron las reac - ciones como las indica la microtécnica.- El Blanco lleva - 0.025 ml. de albúmina al 6 %.

Los valores obtenidos se graficaron colocando en la abcisa la concentración en mg/ % de bilirrubina y en la - ordenada la densidad óptica (D.O.)

RESULTADOS.

a.- ANALISIS DE LAS CARACTERISTICAS DEL METODO.

1).- Espectro de absorción.

Se estudió el espectro de absorción del compuesto colorido con el objeto de determinar el comportamiento óptico del mismo y establecer la longitud de onda en la cual se obtiene la máxima sensibilidad.

Se utilizó una solución valorada de bilirrubina de 20.0 mg. por 100 ml. y simultáneamente se leyó el espectro de absorción del blanco de reactivos. Ambos compuestos: la azobilirrubina alcalina y el blanco de reactivos fueron leídos contra agua destilada.

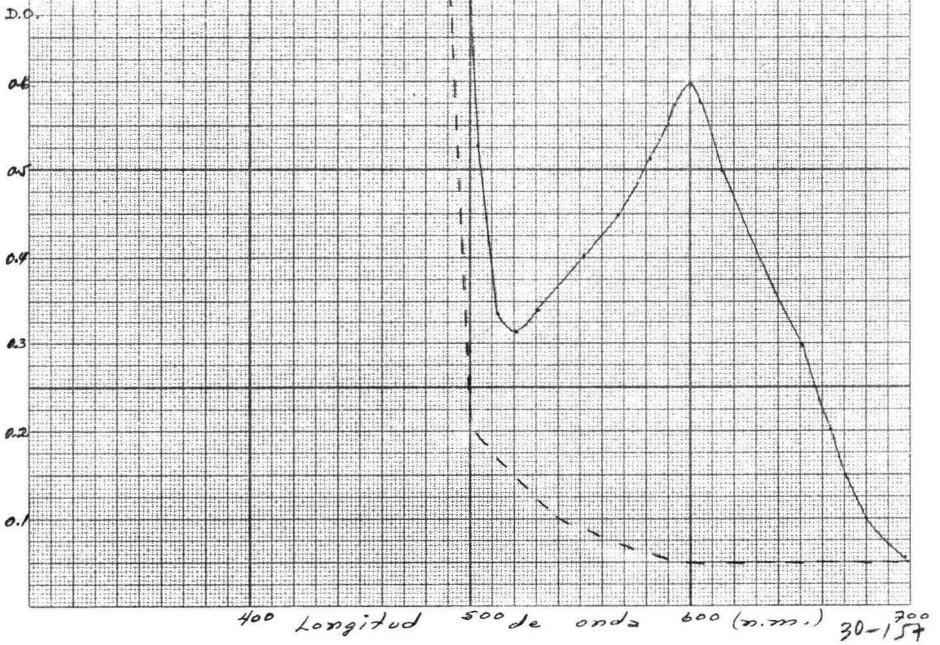
Se puede ver que la absorción es paralela - en la porción cercana del espectro visible, pero a partir de 480 - 500 nm. se separan, produciéndose la máxima absorción para el problema a 600 nm., longitud de onda en la cual el blanco absorbe muy poca luz.

Gráfica No. 1.

----- Blanco de Reactivos y suero.
----- Bilirrubina alcalina.

Espectro de Absorción.

Bilirrubina



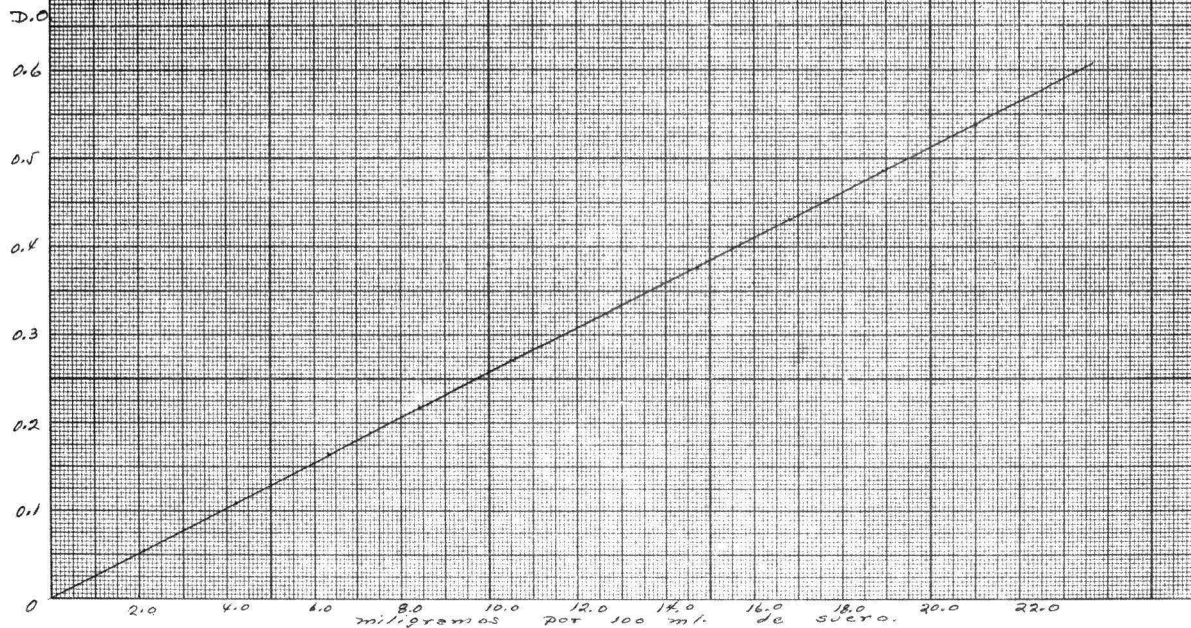
2.- CURVA DE CALIBRACION.

Se puede observar que dentro del rango experimental, que fué de 2.1 a 21.0 mg/%, la densidad óptica es directamente proporcional a la concentración, por lo que se obtiene una línea recta que une todos los puntos de la calibración. Se obtuvo el factor de la pendiente de la línea que resultó del estudio y el cual es de :

$$F = 0.039 \text{ mg}/0.001 \text{ D.O.}$$

Gráfico No. 2.

Bilirrubina. Curva de calibración.



3.- ANALISIS ESTADISTICO DE LA CURVA DE CALIBRACION.

En la tabla No. I se encuentran consignados los valores paramétricos de la repetición de las curvas de calibración, cambiando diariamente las soluciones patrón y los reactivos.

Se estableció la desviación estandard, el error estandard y el coeficiente de variación y se consideró como límite de permisibilidad la dispersión de ± 2 desviaciones estandard, tomando en cuenta que fenómenos sujetos al azar quedan comprendidos el 95 % de los casos en ± 2 desviaciones estandard (4).

Se puede ver que entre 4 y 21.0 mg los coeficientes de variación son muy semejantes y además muy bajos ya que se encuentran por debajo de 5 %.

TABLA No. I

Con - centra- ción. mg/%.	No.	Desviación estandard.	Error estandard.	Coefficien- te de Va- riación.	Límite de permisibili- dad $\pm 2 \sigma$ estandard.
2.1	32	0.17 mg/%	0.03 mg/%	8.2 %	0.34 mg/%
4.2	32	0.21 "	0.04 "	5.0 "	0.42 "
6.3	32	0.25 "	0.04 "	3.9 "	0.50 "
8.4	32	0.29 "	0.05 "	3.4 "	0.58 "
10.5	32	0.33 "	0.06 "	3.2 "	0.66 "
12.6	32	0.35 "	0.06 "	2.8 "	0.70 "
14.7	32	0.47 "	0.08 "	3.3 "	0.94 "
16.8	32	0.60 "	0.10 "	3.6 "	1.2 "
18.9	32	0.69 "	0.14 "	4.2 "	1.38 "
21.0	32	0.71 "	0.12 "	3.4 "	1.42 "

No.- Número de determinaciones.

b).- INFLUENCIA DE DIFERENTES FACTORES SOBRE EL METODO.

1.- Especificidad de la reacción.

Con el objeto de estudiar la especificidad de la absorción del complejo formado en el presente método, se comparó el espectro obtenido en el sistema coloreado con cuatro sistemas de trabajo en los cuales se hicieron combinaciones de reactivos sin suero ó bien la reacción de éste y el diazo-reactivo había sido previamente inhibida.

Utilizamos un patrón de bilirrubina de 20.0 mg/100 ml.

SISTEMA I.

Cafeína ----- 0.6 ml.
Sol. patrón ----- 0.025 ml.
Diazo-reactivo ----- 0.2 ml.
Dejar reposar 20 minutos.
Ac. ascórbico ----- 0.05 ml.
Mezcla alcalina ----- 0.25 ml.
Reposar 5 minutos y leer.
Blanco.- Agua destilada.

SISTEMA II.

Cafeína ----- 0.6 ml.
Ac. ascórbico ----- 0.05 ml.
Sol. patrón ----- 0.025 ml.
Diazo-reactivo ----- 0.2 ml.
Dejar reposar 20 minutos.
Mezcla alcalina ----- 0.25 ml.
Reposar 5 minutos y leer.
Blanco.- Agua destilada.

SISTEMA III.

Cafeína ----- 0.6 ml.
Agua ----- 0.025 ml.
Diazo-reactivo ----- 0.2 ml.
Dejar reposar 20 minutos.
Acido ascórbico ----- 0.05 ml.
Mezcla alcalina ----- 0.25 ml.
Reposar 5 minutos y leer.
Blanco.- Agua destilada.

SISTEMA IV.

Cafeína ----- 0.6 ml.
Acido ascórbico ----- 0.05 ml.
Agua ----- 0.025 ml.
Diazo-reactivo ----- 0.2 ml.
Dejar reposar 20 minutos.
Mezcla alcalina ----- 0.25 ml.
Reposar 5 minutos y leer.
Blanco.- Agua destilada.

SISTEMA V.

Cafeína ----- 0.6 ml.
Sol. patrón ----- 0.025 ml.
Acido sulfanílico ----- 0.2 ml.
Dejar reposar 20 minutos.
Acido ascórbico ----- 0.05 ml.
Mezcla alcalina ----- 0.25 ml.
Reposar 5 minutos y leer.
Blanco.- Agua destilada.

Los resultados obtenidos en un espectro-
fotómetro P.M.Q. II de Carl-Zeiss y un absorciómetro -
L.K.B. 7400 se presentan en la gráfica No. 3.

El estudio se realizó en 20 sueros - problema. Se tomó particular interés en conocer la diferencia de absorción cuando se adicionaba ácido sulfanílico solo ó diazo-reactivo en un sistema en que estaba inhibida la formación de azobilirrubina por la adición del ácido ascórbico (Ver sistemas II y V). La absorción fué ligeramente más elevada en los problemas con diazo-reactivo que en los que contenían ácido sulfanílico solamente. Sin embargo la magnitud de las diferencias es insignificante a concentraciones muy elevadas ya que fué de 0.15. Nosotros nos inclinamos por usar el diazo-reactivo en el blanco, sobre todo en problemas de pequeña concentración para eliminar completamente la influencia del compuesto amarillo formado por la mezcla de caféina-diazo-reactivo.

Como consecuencia de las observaciones anteriores se estudió la importancia que tiene el suero como compuesto absorbente a 600 nm. para ver si era posible utilizar un blanco de agua destilada, eliminando el suero problema y disminuyendo con ésto la cantidad de suero necesario en la reacción, para lo cual se utilizaron los sistemas II y IV.

Se estudiaron 100 sueros problema con bilirrubina total que fluctuaba de 0.4 a 5.0 mg. Se observó que la absorción de los blancos que contenían suero -----

era más elevada que la de los que contenían agua solamente y que la diferencia en D.O. varió de 0.15 a 0.45 mg. por - lo que no es posible prescindir del suero en los blancos a menos que la concentración de bilirrubinas sea muy elevada y que se haga una corrección de esta magnitud. Sin embargo creemos que ésto solo deberá realizarse cuando no se tenga suficiente suero.

Pudimos observar que a menos de 500 nm. todos los sistemas muestran una gran absorción siendo menor para el sistema I (GRAFICA No. 3).

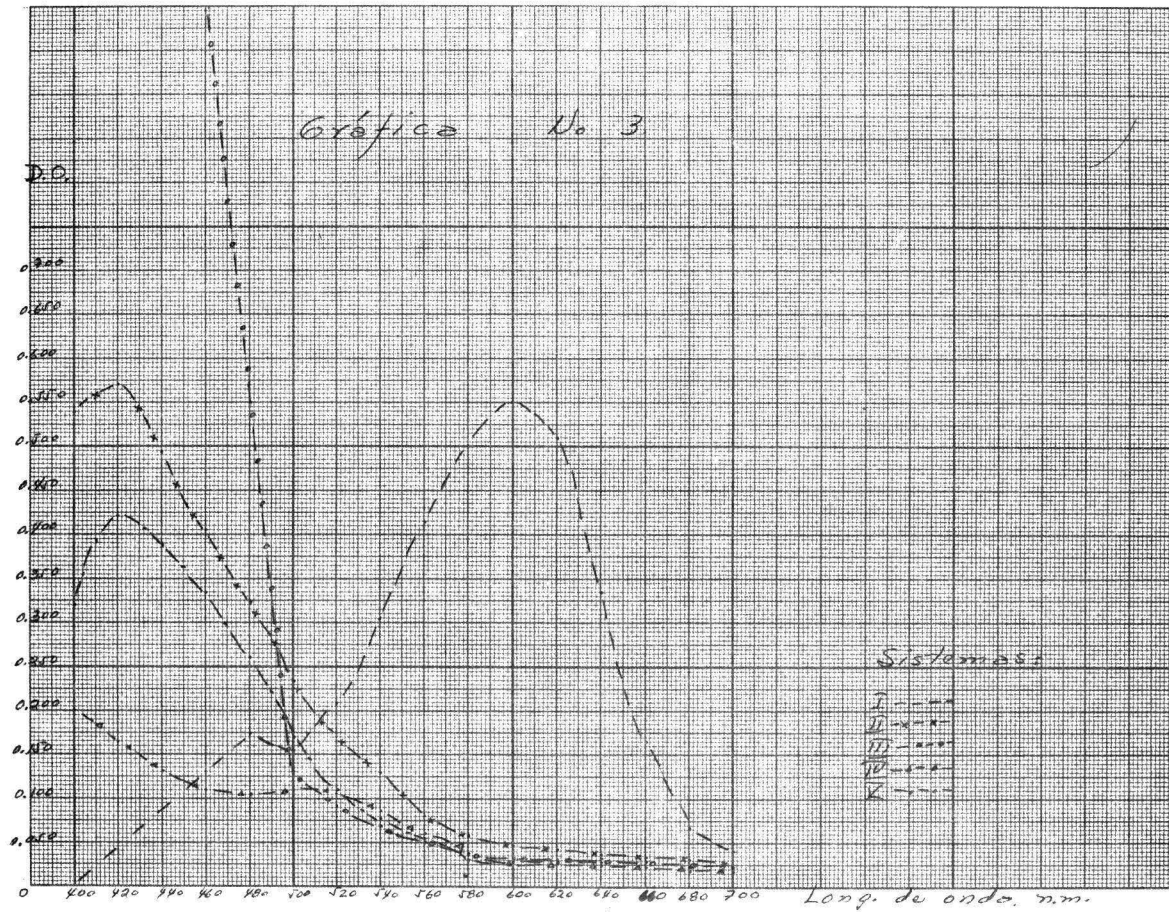
El sistema III en el cual se mezclan cafeína y diazo-reactivo sin bilirrubina exhibe una extraordinaria absorción a menos de 460 nm. la cual disminuye rápidamente y es prácticamente insignificante a 600 nm.

Entre 500 y 600 nm. todos los sistemas del II al V exhiben un descenso progresivo en la absorción, no así el sistema I que va incrementándose hasta llegar a su máximo que es de 600 nm.

Como podemos ver la especificidad de la absorción de la azobilirrubina alcalina no deja lugar a dudas con relación a la absorción que puedan tener los reactivos ó el suero problema.

Cuando se adiciona diazo-reactivo a una mezcla en donde no se puede desarrollar la formación de azobilirrubina como es en los sistemas II y IV se forma un compuesto amarillo, mucho mayor que el que se observa en el sistema V que contiene ácido sulfanílico en lugar de diazo-reactivo.

Gráfica No 3



2.- TIEMPO DE DESARROLLO DE COLOR PARA LA BILIRRUBINA DIRECTA.

Para conocer el tiempo óptimo de desarrollo de color para la bilirrubina directa o conjugada, se procedió a efectuar mediciones a diferentes tiempos, utilizando varios sueros con bilirrubina directa elevada, obtenidos de pacientes con ictericia obstructiva de diferente índole --- (hepatitis, colestasis, atresia de las vías biliares). Previamente estos sueros habían sido tratados con cloroformo - con el fin de extraerles la bilirrubina indirecta que es soluble en dicho compuesto.

A continuación tenemos una curva tipo de las obtenidas las cuales mostraron la misma tendencia, con pequeñas variaciones que no afectaron los resultados finales.

Gráfica No. 4.

Bilirrubina Directa.

D.O.

0.30

0.25

0.20

0.15

0.10

0.05

0

5

10

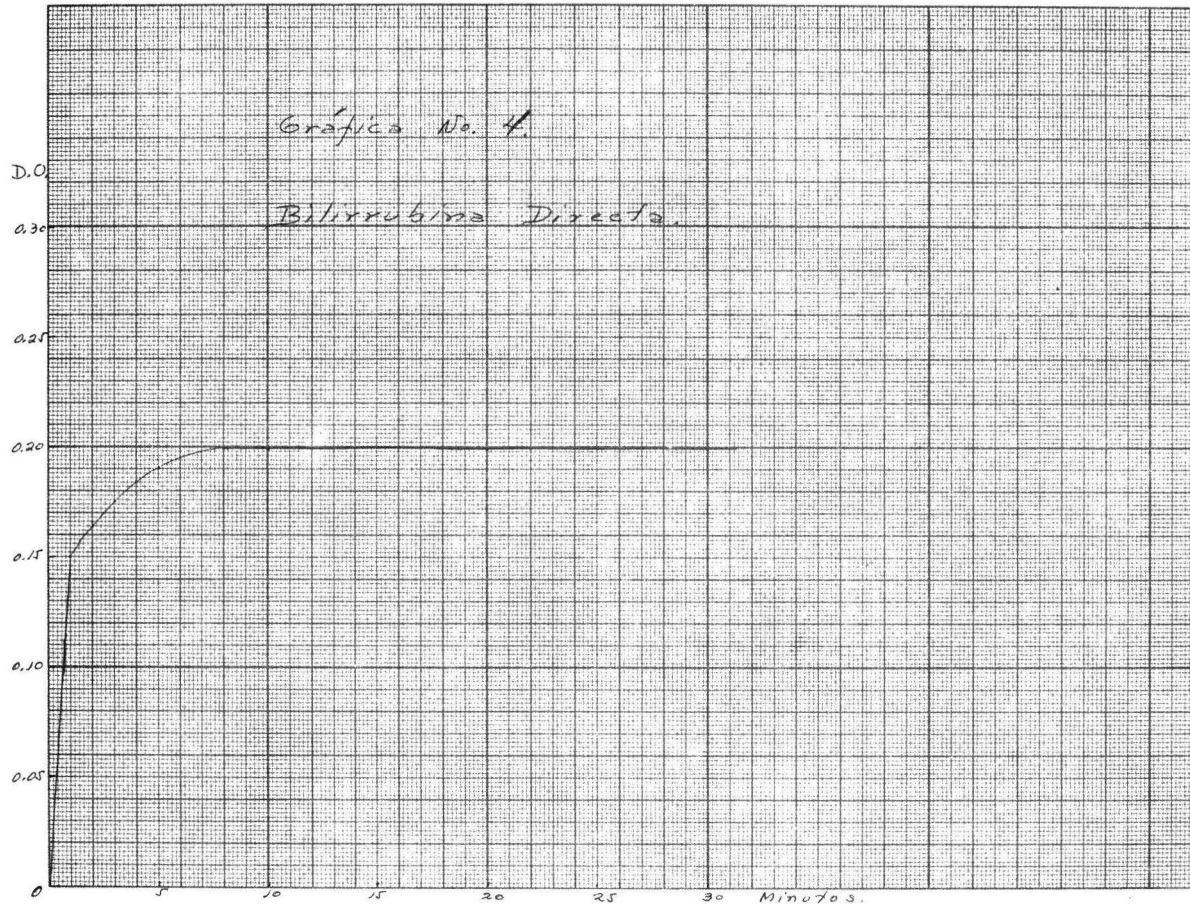
15

20

25

30

Minutos.



Como se ve en la figura anterior, el tiempo total de la reacción se efectúa entre los 5 y 8 minutos y después permanece estable hasta los 30 minutos. Por esta razón se eligió el tiempo de 10 minutos. Desde luego no aceptamos el tiempo de 1 minuto propuesto por algunos autores, por considerarlo absolutamente insuficiente.

3.- TIEMPO DE DESARROLLO DE COLOR PARA LA BILIRRUBINA INDIRECTA.

Con el objeto de conocer el tiempo óptimo de desarrollo de color para la bilirrubina indirecta, se procedió a efectuar mediciones a diferentes tiempos, para lo cual se utilizaron varios sueros con bilirrubina indirecta elevada, procedentes de pacientes con ictericia hemolítica por -- isoimmunización y sueros patrones de procedencia comercial.

A todos los sueros se les extrajo la bilirrubina indirecta en cloroforme, el cual se evaporó y la bilirrubina se redisolvió en Na OH 0.02 N y albúmina al 6 %, -- utilizando una variante del método descrito por ----- MICHAELSSON (20).

A continuación se presenta una curva tipo de las obtenidas, todas las cuales mostraron la misma tendencia, con pequeñas variaciones que no afectaron los resultados finales.

Gráfica No. 5.

Bilirrubina Indirecta

D.O.

0.5

0.4

0.3

0.2

0.1

0

10

20

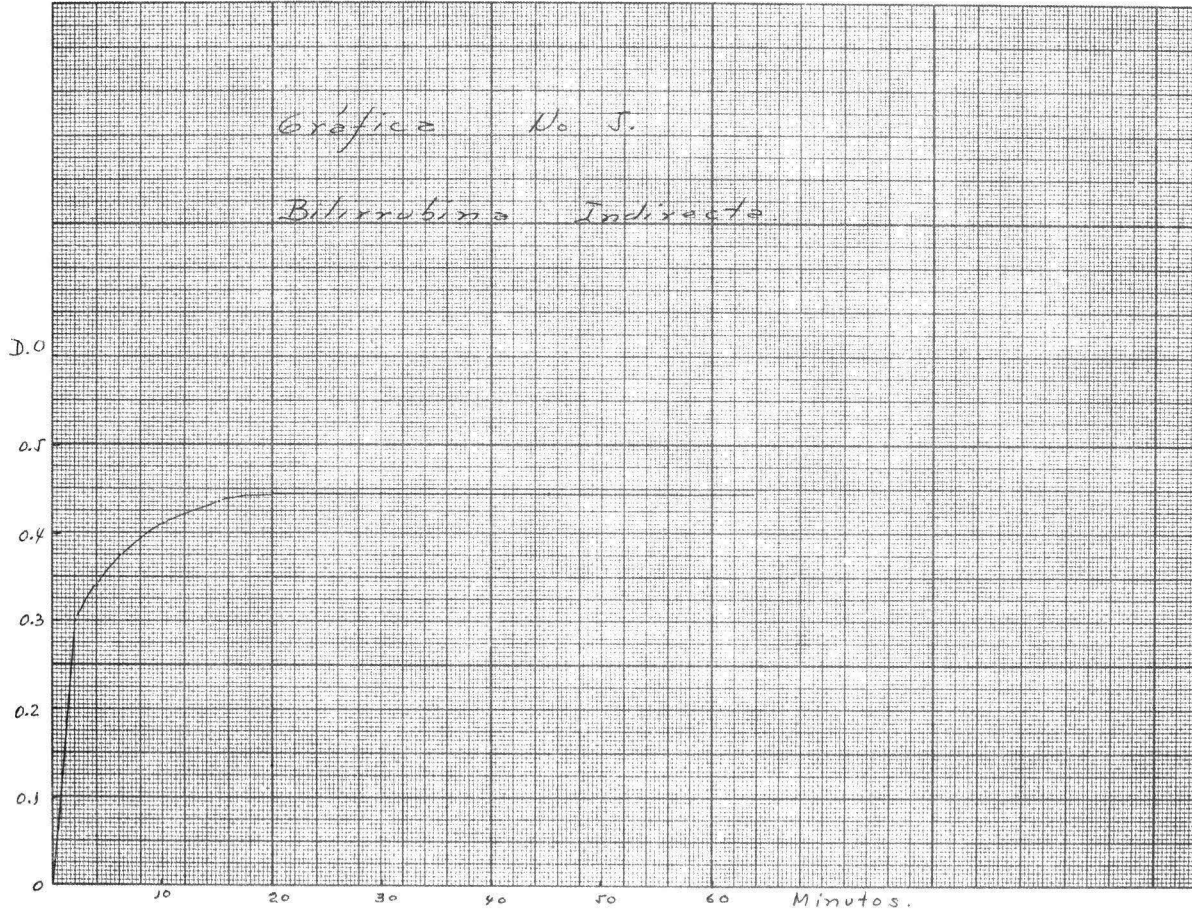
30

40

50

60

Minutos.



En la figura anterior podemos observar que el tiempo total de la reacción se efectúa entre los 15 y 20 minutos y después permanece estable hasta los 60 minutos.

Para dejar un margen de tiempo muy tolerante - se eligió como límite para detener la reacción el de 30 - minutos.

4.- ACOPLAMIENTO ESPONTANEO DE LA BILIRRUBINA INDIRECTA CON EL DIAZO-REACTIVO.

Se ha descrito que la bilirrubina indirecta se acopla en forma espontánea con el diazo-reactivo sin la presencia de un acelerador, sin embargo en pH bajo este acoplamiento es insignificante (14).

Para conocer la influencia de este hecho en la cuantificación de la bilirrubina directa en este método, utilizamos una solución patrón de bilirrubina indirecta, obtenida como lo indicamos anteriormente en el inciso correspondiente a: (Tiempo de desarrollo de color para bilirrubina indirecta), cuyo valor fué de 13.0 mg por 100 ml. o sea de una concentración elevada. Se incubó la bilirrubina indirecta en las condiciones en que se determina la directa y se leyó la absorción a diferentes tiempos.

Tiempo.	Densidad óptica.	Concentración mg/%.	Porcentaje de la concentración.
1 minuto.	0.002	0.076	0.6 %
3 minutos.	0.003	0.11	0.8 "
5 "	0.0035	0.13	1.0 "
10 "	0.006	0.22	1.7 "
15 "	0.0065	0.24	1.85"
20 "	0.008	0.3	2.3 "
25 "	0.0085	0.32	2.4 "
30 "	0.013	0.5	3.8 "
45 "	0.020	0.7	5.4 "

Como se puede ver por los resultados obtenidos, a los 10 minutos (que es el tiempo utilizado en la reacción de bilirrubina directa), solamente se acopla espontáneamente al - diazo-reactivo el 1.7 % de la bilirrubina indirecta contenida - en la muestra. Esto nos indica que a pesar de la alta concentra- ción de este compuesto en los sueros analizados, más del 98 % permanece inalterable por lo que no es posible la contaminación de resultados entre bilirrubinas, cuando menos con una magnitud que pueda afectar la decisión clínica en relación a un paciente, ya que se necesitan 45 minutos de incubación para que se afecte en 5 % el resultado.

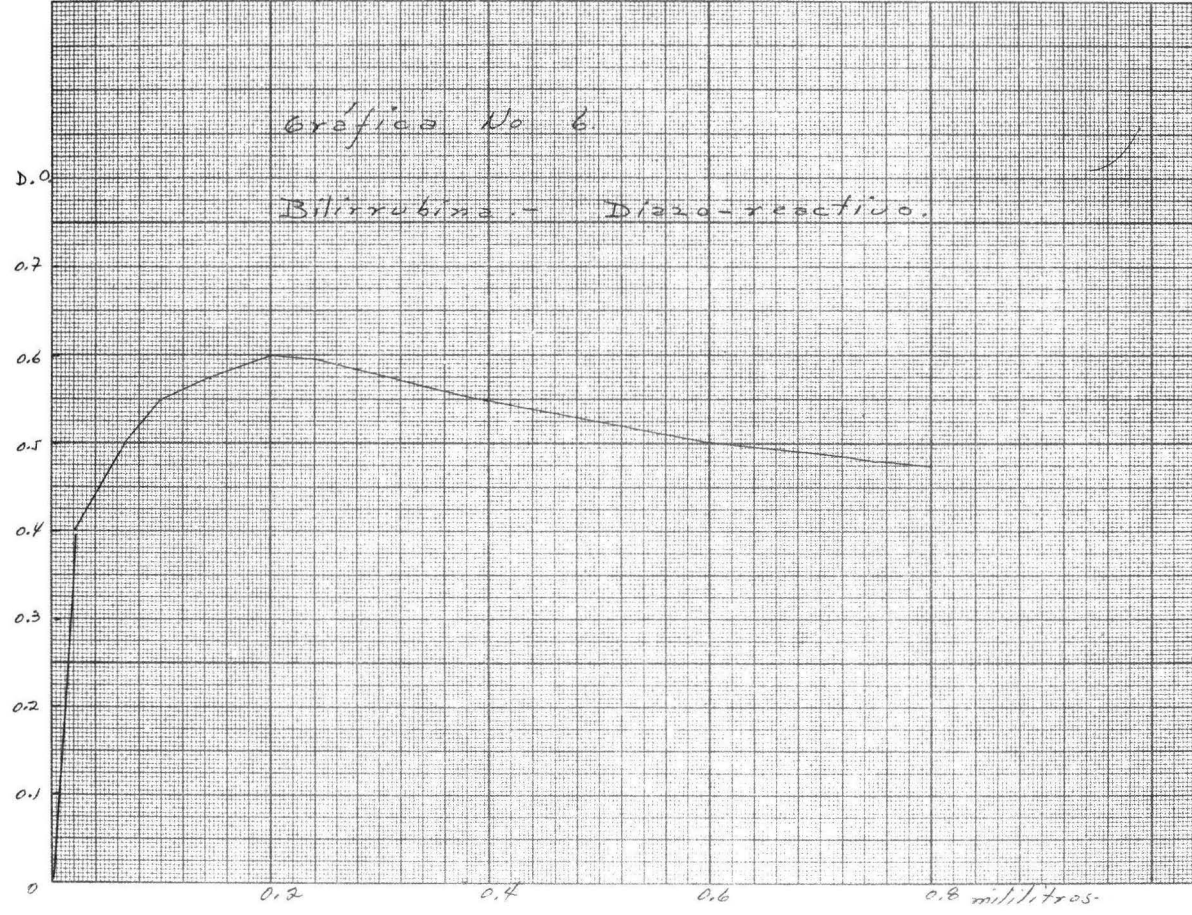
5.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DEL DIAZO-REACTIVO.

Con el objeto de determinar la concentración óptima de diazo-reactivo en el sistema, se adicionaron cantidades crecientes de este reactivo.

Como podemos observar en la gráfica siguiente la mejor concentración es la obtenida con 0.2 - ml. de diazo-reactivo.

Gráfica No. 6.

Bilirrubina - Diazo-reactivo.



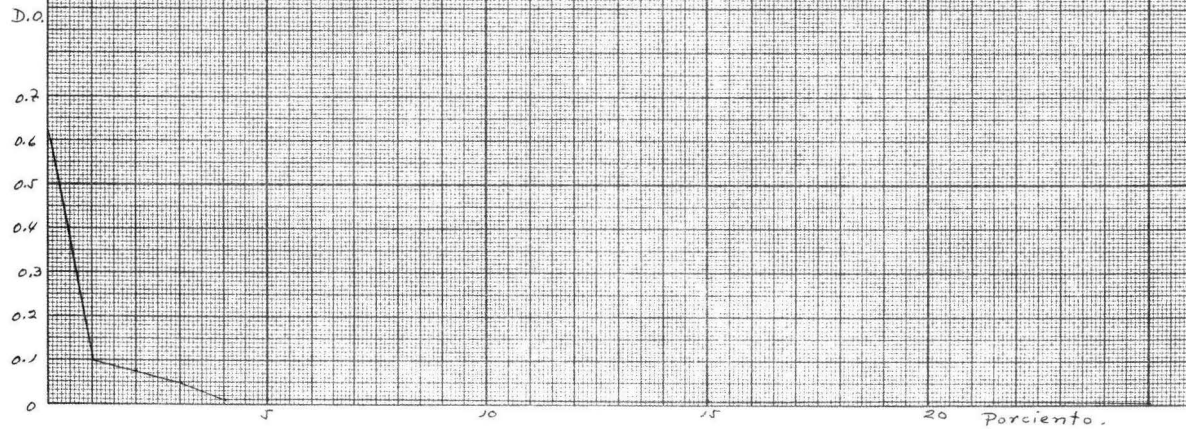
6.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DEL ACIDO ASCORBICO.

El ácido ascórbico es un potente inhibidor del acoplamiento entre diazo-reactivo y la bilirrubina, aún en presencia de aceleradores. Se estudió la concentración óptima para detener dicho acoplamiento, para lo cual se prepararon soluciones de ácido ascórbico en cantidades crecientes desde 1 a 20 %.

Como se puede ver en la figura, desde -- 4 % de concentración de ácido ascórbico, se inhibe completamente el desarrollo de color, con el objeto de dar un margen de seguridad se eligió el 5 % como la concentración a emplear.

Gráfico No. 7.

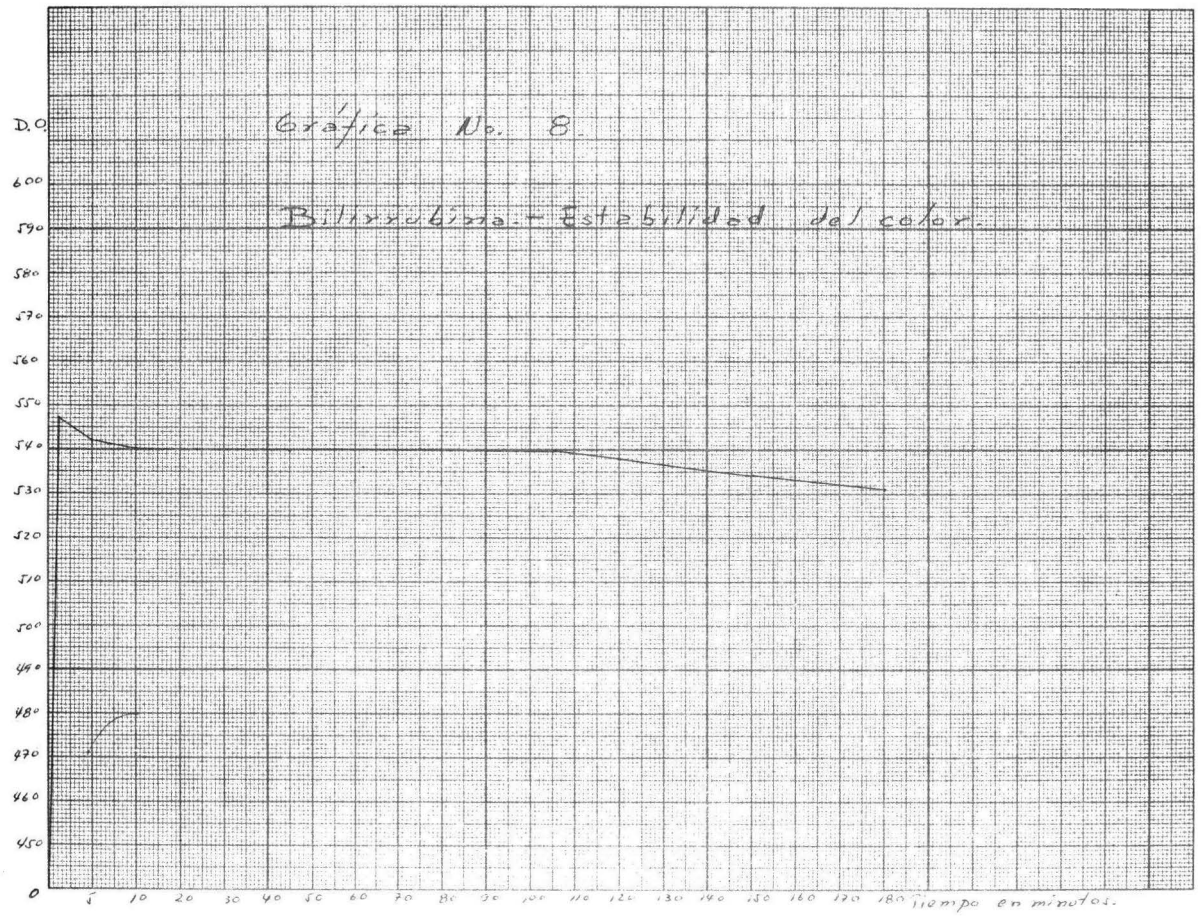
Bilirrubina - Acido escórbico.



7.- INFLUENCIA DEL TIEMPO EN LA ESTABILIDAD DEL COMPUESTO COLORIDO.

El compuesto colorido final va de un color amarillo verde pálido a verde intenso, dependiendo de la concentración de bilirrubina. El color verde se forma de la combinación del amarillo producido en la reacción entre cafeína y diazo-reactivo y el azul de la azobilirrubina alcalina.

Con el fin de conocer la estabilidad del color desarrollado, se midió a diferentes tiempos la densidad óptica, lo cual aparece en la siguiente figura.



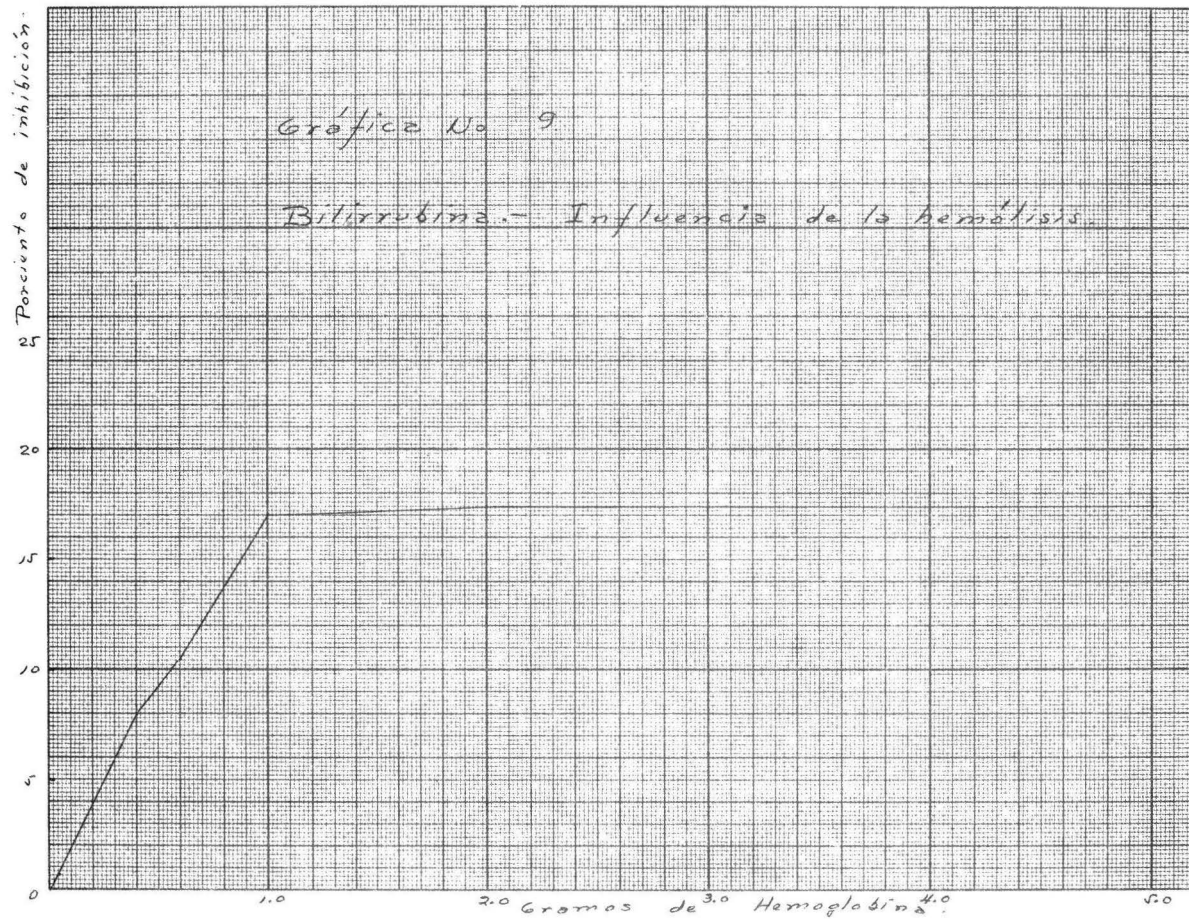
Observamos una rápida aparición del color con una ligera caída paulatina de su intensidad, cuya pendiente es mucho más rápida en los primeros diez minutos, - para volverse más estable posteriormente y el tiempo óptimo para leer se encuentra entre 10 y 30 minutos.

Posteriormente hay un descenso de color de mucha menor importancia, a los 120 minutos.

8.- INFLUENCIA DE LA HEMOLISIS.

La hemólisis ha sido descrita como un factor de interferencia en el acoplamiento entre el diazo-reactivo y la bilirrubina. Con el objeto de conocer la influencia de dicha situación en el método aquí descrito, se rehidrataron soluciones patrón liofilizadas, con hemolizados cuya concentración en hemoglobina fué aumentando gradualmente hasta llegar a 4.6 g. por 100 ml.

En la figura siguiente podemos ver que solamente concentraciones de hemoglobina tan bajas como --- 0.05 g/% producen inhibición de menos de 1 %, sin embargo de ahí asciende rápidamente hasta alcanzar el 10 % en 0.5 g/%, es importante también observar que la inhibición se hace de la misma magnitud a partir de 2.0 g. de hemoglobina por 100 ml. en una cifra muy cercana al 20 % de inhibición.



c.- INVESTIGACION DE LA DISPERSION DE VALORES EN POBLACION
APARENTEMENTE SANA.

Los resultados se encuentran a continuación
en forma de listas para sexo masculino y para sexo femenino
en cada uno de los cuatro grupos estudiados.

Edad 1 mes a 1 año.

B.Total.		B.Directa.		B.Indirecta.	
masculino	femenino.	masculino	femenino.	masculino	femenino.
1.- 0.741	- 0.663	0.390	- 0.039	0.351	- 0.624
2.- 0.663	- 0.624	0.195	- 0.273	0.468	- 0.351
3.- 0.663	- 0.585	0.078	- 0.078	0.585	- 0.507
4.- 0.663	- 0.585	0.039	- 0.351	0.624	- 0.234
5.- 0.624	- 0.507	0.156	- 0.390	0.468	- 0.117
6.- 0.546	- 0.429	0.117	- 0.351	0.429	- 0.078
7.- 0.546	- 0.390	0.039	- 0.156	0.507	- 0.234
8.- 0.468	- 0.351	0.429	- 0.195	0.039	- 0.156
9.- 0.390	- 0.312	0.312	- 0.195	0.078	- 0.117
10.- 0.390	- 0.312	0.234	- 0.039	0.156	- 0.273
11.- 0.390	- 0.273	0.078	- 0.078	0.312	- 0.195
12.- 0.390	- 0.195	0.117	- 0.039	0.273	- 0.156
13.- 0.351		0.039		0.312	
14.- 0.273		0.039		0.234	
15.- 0.234		0.195		0.039	
16.- 0.195		0.078		0.117	
17.- 0.195		0.039		0.156	
18.- 0.195		0.117		0.078	

RESULTADOS OBTENIDOS.

Niños mayores de 1 año y menores de 2.

B.Total.		B.Directa.		B.Indirecta.	
masculino	femenino.	masculino	femenino.	masculino	femenino.
1.-	0.702 - 0.819	0.039	- 0.195	0.663	- 0.624
2.-	0.702 - 0.780	0.078	- 0.585	0.624	- 0.195
3.-	0.546 - 0.624	0.078	- 0.117	0.468	- 0.507
4.-	0.546 - 0.507	0.039	- 0.078	0.507	- 0.429
5.-	0.546 - 0.390	0.312	- 0.195	0.234	- 0.195
6.-	0.507 - 0.390	0.390	- 0.195	0.117	- 0.195
7.-	0.460 - 0.390	0.156	- 0.312	0.304	- 0.078
8.-	0.429 - 0.351	0.039	- 0.078	0.390	- 0.273
9.-	0.429 - 0.351	0.039	- 0.078	0.390	- 0.273
10.-	0.390 - 0.312	0.078	- 0.156	0.312	- 0.156
11.-	0.390 - 0.312	0.234	- 0.195	0.156	- 0.117
12.-	0.390 - 0.312	0.078	- 0.178	0.312	- 0.234
13.-	0.390 - 0.234	0.117	- 0.078	0.273	- 0.156
14.-	0.351 - 0.195	0.117	- 0.078	0.234	- 0.117
15.-	0.351	0.078		0.273	
16.-	0.312	0.234		0.078	
17.-	0.312	0.195		0.117	
18.-	0.273	0.078		0.195	
19.-	0.234	0.039		0.195	
20.-	0.234	0.156		0.078	
21.-	0.195	0.039		0.156	
22.-	0.156	0.078		0.078	
23.-	0.156	0.039		0.117	
24.-	0.117	0.039		0.078	

RESULTADOS OBTENIDOS.

Niños mayores de 2 años y menores de 6.

B.Total.			B.Directa.		B.Indirecta.	
masculino	femenino.		masculino	femenino.	masculino	femenino.
1.-	0.975	- 0.975	0.195	- 0.741	0.780	- 0.234
2.-	0.897	- 0.975	0.312	- 0.312	0.585	- 0.663
3.-	0.858	- 0.858	0.429	- 0.348	0.429	- 0.510
4.-	0.858	- 0.858	0.117	- 0.078	0.741	- 0.780
5.-	0.819	- 0.819	0.702	- 0.429	0.117	- 0.390
6.-	0.819	- 0.819	0.273	- 0.351	0.546	- 0.468
7.-	0.780	- 0.819	0.234	- 0.468	0.546	- 0.351
8.-	0.780	- 0.780	0.156	- 0.039	0.624	- 0.741
9.-	0.741	- 0.780	0.078	- 0.156	0.663	- 0.624
10.-	0.702	- 0.780	0.312	- 0.156	0.390	- 0.624
11.-	0.702	- 0.741	0.156	- 0.468	0.546	- 0.273
12.-	0.702	- 0.702	0.039	- 0.468	0.663	- 0.234
13.-	0.702	- 0.702	0.195	- 0.195	0.507	- 0.507
14.-	0.702	- 0.663	0.039	- 0.429	0.663	- 0.234
15.-	0.663	- 0.624	0.312	- 0.468	0.351	- 0.156
16.-	0.663	- 0.624	0.351	- 0.351	0.312	- 0.273
17.-	0.585	- 0.624	0.234	- 0.195	0.351	- 0.429
18.-	0.585	- 0.585	0.078	- 0.390	0.507	- 0.195
19.-	0.585	- 0.585	0.195	- 0.234	0.390	- 0.351
20.-	0.585	- 0.585	0.039	- 0.234	0.546	- 0.351
21.-	0.546	- 0.585	0.351	- 0.312	0.195	- 0.273
22.-	0.546	- 0.546	0.078	- 0.273	0.468	- 0.273
23.-	0.546	- 0.507	0.312	- 0.195	0.234	- 0.312
24.-	0.546	- 0.507	0.039	- 0.351	0.507	- 0.156
25.-	0.546	- 0.507	0.312	- 0.078	0.234	- 0.429
26.-	0.507	- 0.507	0.429	- 0.078	0.078	- 0.429
27.-	0.507	- 0.507	0.273	- 0.039	0.234	- 0.468
28.-	0.507	- 0.504	0.117	- 0.192	0.390	- 0.312
29.-	0.507	- 0.468	0.156	- 0.117	0.351	- 0.351
30.-	0.507	- 0.468	0.117	- 0.156	0.390	- 0.312

Niños mayores de 2 años y menores de 6.

B.Total.		B.Directa.		B.Indirecta.	
masculino	femenino.	masculino	femenino.	masculino	femenino.
31.-	0.468 - 0.429	0.351	- 0.234	0.117	- 0.195
32.-	0.468 - 0.429	0.078	- 0.039	0.390	- 0.390
33.-	0.468 - 0.429	0.078	- 0.039	0.390	- 0.390
34.-	0.468 - 0.429	0.195	- 0.078	0.273	- 0.351
35.-	0.468 - 0.429	0.156	- 0.156	0.312	- 0.273
36.-	0.468 - 0.390	0.078	- 0.195	0.390	- 0.195
37.-	0.429 - 0.390	0.078	- 0.312	0.351	- 0.078
38.-	0.429 - 0.390	0.156	- 0.156	0.273	- 0.234
39.-	0.429 - 0.390	0.156	- 0.078	0.273	- 0.312
40.-	0.390 - 0.390	0.156	- 0.039	0.234	- 0.351
41.-	0.390 - 0.390	0.117	- 0.195	0.273	- 0.195
42.-	0.355 - 0.390	0.273	- 0.156	0.082	- 0.234
43.-	0.351 - 0.351	0.195	- 0.039	0.156	- 0.312
44.-	0.351 - 0.351	0.195	- 0.117	0.156	- 0.234
45.-	0.351 - 0.351	0.312	- 0.039	0.039	- 0.312
46.-	0.351 - 0.312	0.039	- 0.273	0.312	- 0.039
47.-	0.312 - 0.312	0.078	- 0.039	0.234	- 0.273
48.-	0.312 - 0.312	0.078	- 0.117	0.234	- 0.195
49.-	0.312 - 0.312	0.078	- 0.078	0.234	- 0.234
50.-	0.312 - 0.312	0.234	- 0.195	0.078	- 0.117
51.-	0.312 - 0.273	0.039	- 0.117	0.273	- 0.156
52.-	0.312 - 0.234	0.156	- 0.156	0.156	- 0.078
53.-	0.273 - 0.234	0.039	- 0.078	0.234	- 0.156
54.-	0.273 - 0.234	0.039	- 0.078	0.234	- 0.156
55.-	0.234 - 0.195	0.039	- 0.039	0.195	- 0.156
56.-	0.234 - 0.156	0.117	- 0.039	0.117	- 0.117
57.-	0.234 - 0.117	0.039	- 0.039	0.195	- 0.078
58.-	0.234 - 0.078	0.078	- 0.039	0.156	- 0.039
59.-	0.195	0.078		0.117	
60.-	0.156	0.039		0.117	

RESULTADOS OBTENIDOS.

Niños mayores de 6 años y menores de 16.

B.Total.		B.Directa.		B.Indirecta.	
masculino	femenino.	masculino	femenino.	masculino	femenino.
1.-	0.897 - 0.975	0.156	- 0.429	0.741	- 0.546
2.-	0.897 - 0.858	0.195	- 0.195	0.702	- 0.663
3.-	0.858 - 0.858	0.195	- 0.156	0.663	- 0.702
4.-	0.819 - 0.819	0.195	- 0.507	0.624	- 0.312
5.-	0.819 - 0.819	0.468	- 0.390	0.351	- 0.429
6.-	0.780 - 0.819	0.156	- 0.117	0.624	- 0.702
7.-	0.780 - 0.819	0.663	- 0.234	0.117	- 0.585
8.-	0.741 - 0.819	0.039	- 0.663	0.702	- 0.156
9.-	0.741 - 0.780	0.351	- 0.039	0.390	- 0.751
10.-	0.741 - 0.780	0.156	- 0.117	0.585	- 0.663
11.-	0.741 - 0.780	0.156	- 0.468	0.585	- 0.312
12.-	0.738 - 0.741	0.156	- 0.039	0.582	- 0.702
13.-	0.702 - 0.741	0.273	- 0.078	0.429	- 0.663
14.-	0.702 - 0.741	0.078	- 0.078	0.624	- 0.663
15.-	0.702 - 0.702	0.234	- 0.663	0.468	- 0.039
16.-	0.663 - 0.702	0.078	- 0.273	0.585	- 0.429
17.-	0.663 - 0.702	0.195	- 0.156	0.468	- 0.546
18.-	0.624 - 0.702	0.117	- 0.351	0.507	- 0.351
19.-	0.624 - 0.663	0.156	- 0.429	0.468	- 0.234
20.-	0.624 - 0.663	0.117	- 0.273	0.507	- 0.234
21.-	0.585 - 0.663	0.351	- 0.078	0.234	- 0.585
22.-	0.546 - 0.660	0.039	- 0.546	0.507	- 0.114
23.-	0.546 - 0.624	0.390	- 0.039	0.156	- 0.585
24.-	0.546 - 0.624	0.429	- 0.156	0.117	- 0.468
25.-	0.546 - 0.624	0.156	- 0.195	0.390	- 0.429
26.-	0.546 - 0.585	0.234	- 0.273	0.312	- 0.312
27.-	0.546 - 0.585	0.312	- 0.078	0.234	- 0.517
28.-	0.507 - 0.585	0.468	- 0.312	0.039	- 0.273
29.-	0.507 - 0.585	0.195	- 0.078	0.312	- 0.507
30.-	0.507 - 0.585	0.429	- 0.039	0.078	- 0.546
31.-	0.507 - 0.546	0.117	- 0.234	0.390	- 0.312
32.-	0.507 - 0.546	0.156	- 0.078	0.351	- 0.468
33.-	0.507 - 0.546	0.078	- 0.039	0.429	- 0.507
34.-	0.468 - 0.546	0.195	- 0.390	0.273	- 0.156
35.-	0.468 - 0.546	0.195	- 0.039	0.273	- 0.507
36.-	0.468 - 0.468	0.156	- 0.078	0.312	- 0.390

Niños mayores de 6 años y menores de 16.

B.Total.			B.Directa.		B.Indirecta.	
masculino	femenino.		masculino	femenino.	masculino	femenino.
37.-	0.468	- 0.468	0.078	- 0.234	0.390	- 0.234
38.-	0.468	- 0.468	0.234	- 0.156	0.234	- 0.312
39.-	0.468	- 0.468	0.390	- 0.078	0.078	- 0.390
40.-	0.468	- 0.468	0.117	- 0.117	0.351	- 0.351
41.-	0.468	- 0.460	0.078	- 0.039	0.390	- 0.421
42.-	0.468	- 0.429	0.234	- 0.351	0.234	- 0.078
43.-	0.429	- 0.429	0.039	- 0.039	0.390	- 0.390
44.-	0.429	- 0.429	0.156	- 0.273	0.273	- 0.156
45.-	0.429	- 0.429	0.156	- 0.039	0.273	- 0.390
46.-	0.429	- 0.390	0.078	- 0.195	0.351	- 0.195
47.-	0.390	- 0.390	0.078	- 0.234	0.312	- 0.156
48.-	0.390	- 0.390	0.039	- 0.039	0.351	- 0.351
49.-	0.390	- 0.390	0.039	- 0.156	0.351	- 0.234
50.-	0.351	- 0.351	0.078	- 0.039	0.273	- 0.312
51.-	0.351	- 0.390	0.078	- 0.039	0.273	- 0.351
52.-	0.351	- 0.312	0.078	- 0.039	0.273	- 0.273
53.-	0.351	- 0.312	0.117	- 0.039	0.234	- 0.273
54.-	0.351	- 0.312	0.117	- 0.039	0.234	- 0.273
55.-	0.351	- 0.312	0.234	- 0.039	0.117	- 0.273
56.-	0.312	- 0.273	0.039	- 0.195	0.273	- 0.195
57.-	0.312	- 0.273	0.078	- 0.078	0.234	- 0.195
58.-	0.312	- 0.273	0.117	- 0.039	0.195	- 0.234
59.-	0.312	- 0.234	0.078	- 0.156	0.234	- 0.078
60.-	0.312	- 0.234	0.039	- 0.039	0.273	- 0.195
61.-	0.273	- 0.117	0.078	- 0.078	0.195	- 0.039
62.-	0.273	- 0.078	0.117	- 0.039	0.156	- 0.039
63.-	0.273		0.039		0.234	
64.-	0.273		0.039		0.234	
65.-	0.234		0.039		0.195	
66.-	0.234		0.078		0.156	
67.-	0.195		0.039		0.156	
68.-	0.195		0.039		0.156	
69.-	0.156		0.039		0.117	
70.-	0.117		0.078		0.039	
71.-	0.078		0.039		0.039	

Por los resultados obtenidos podemos concluir que desde 1 mes hasta los 16 años el sexo no estableció ninguna diferencia.

Una vez que fué establecida la igualdad entre sexos se compararon los resultados de los dos sexos en cada uno de los grupos con el resto de los grupos con el objeto de saber si la edad a su vez establecía alguna diferencia significativa.

Los datos relativos a la comparación entre grupos se encuentran consignados en la TABLA No. IV y se puede ver que solamente el grupo II fué diferente estadísticamente de los demás en lo referente a B. total y B. indirecta.

El resto de los grupos no fueron diferentes y hubo dos ocasiones en que fueron idénticos.

En la TABLA No. 2 Se concentran los valores de todos los grupos.

TABLA No. 2 Valores encontrados en diferentes edades
(en los dos sexos)

RANGO	MEDIA			DESVIACION ESTANDARD					
	Bilirrubina Directa	Bilirrubina Indirecta	Bilirrubina Total	Bilirru- bina Directa	Bilirru- bina In- directa	Bilirru- bina Total	Bilirru- bina Directa	Bilirru- bina In- directa	Bilirru- bina Total
1 mes a 1 año	0.039-0.429	0.039-0.624	0.195-0.741	0.16	0.28	0.44	0.12	0.17	0.18
>1 año <2 años	0.039-0.585	0.039-0.624	0.195-0.819	0.14	0.26	0.40	0.14	0.16	0.16
>2 años <6 años	0.039-0.702	0.039-0.741	0.078-0.702	0.18	0.32	0.50	0.14	0.16	0.20
>6 años <16 años	0.078-0.663	0.039-0.751	0.078-0.975	0.17	0.35	0.52	0.14	0.18	0.19
Todos los grupos	0.039-0.702	0.039-0.780	0.078-0.975	0.17	0.32	0.49	0.13	0.17	0.19

En la TABLA No. III se hace un análisis en cada grupo entre los pacientes del sexo femenino y los de sexo masculino para establecer si el sexo fué determinante en diferencias estadísticamente significativas, tanto para la B. total como para sus fracciones.

TABLA No. III
 DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA
 DIVISION DE BIOMATEMATICAS
 PRUEBA DE " t "

M A S C U L I N O

F E M E N I N O

Casos "n"	Promedio x	Desviación estandard	Casos "n"	Promedio x	Desviación estandard	Prueba de "t"	P	Grados de Libertad
EDAD DE 1 MES A 1 AÑO								
18	B. total M vs F 0.44	0.19	12	0.43	0.16	0.185	NS*	28
18	B. directa M vs F 0.15	0.12	12	0.18	0.12	0.967-	NS	28
18	B. indirecta M vs F 0.29	0.19	12	0.25	0.16	0.740	NS	28
EDAD MAYOR DE 1 AÑO Y MENOR DE 2								
24	B. total M vs F 0.38	0.15	14	0.42	0.18	0.909-	NS	36
24	B. directa M vs F 0.11	0.09	14	0.17	0.13	1.681001-	NS	36
24	B. indirecta M vs F 0.27	0.16	14	0.25	0.16	0.371781	NS	36

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA
 DIVISION DE BIOMATEMATICAS
 PRUEBA DE " t "

M A S C U L I N O			F E M E N I N O			Prueba "t"	P	Grados de Libertad
Casos "n"	Promedio x	Desviación estandard	Casos "n"	Promedio x	Desviación estandard			
EDAD MAYOR DE 2 AÑOS Y MENORES DE 6								
60	B.total M vs F 0.50	0.19	58	0.50	0.21	0.000000	NS	116
60	B.directa M vs F 0.17	0.12	58	0.19	0.15	0.801956	-NS	116
60	B.indirecta M vs. F 0.33	0.18	58	0.31	0.16	0.637267	NS	116
EDAD MAYORES DE 6 AÑOS Y MENORES DE 16								
71	B. total M vs F 0.49	0.19	62	0.55	0.20	1.773206	-NS	131
71	B.directa M vs F 0.16	0.13	62	0.18	0.16	0.795576	-NS	131
71	B.indirecta M vs F 0.33	0.17	62	0.37	0.19	1.281722	NS	131

* No significativa.

T A B L A No. IV
 DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA
 DIVISION DE BIOMATEMATICAS
 PRUEBA DE " t " .

Casos "n"	Promedio x	Desviación estandard	vs Grupo	Casos "n"	Promedio x	Desviación estandard	Prueba de "t"	P	Grados de libertad
GRUPO I									
B.directa									
30	0.16	0.12	2	38	0.14	0.14	0.622587	NS	66
30	0.16	0.12	3	118	0.18	0.14	0.718442-	NS	146
30	0.16	0.12	4	133	0.17	0.14	0.362266-	NS	161
30	0.16	0.12	5	319	0.17	0.13	0.405564-	NS	347
B.indirecta									
30	0.28	0.17	2	38	0.26	0.16	0.498144	NS	66
30	0.28	0.17	3	118	0.32	0.16	1.207729-	NS	146
30	0.28	0.17	4	133	0.35	0.18	1.944444-	NS	161
30	0.28	0.17	5	319	0.32	0.17	1.232703-	NS	347
B. Total									
30	0.44	0.18	2	38	0.40	0.16	0.969015	NS	66
30	0.44	0.18	3	118	0.50	0.20	1.495811-	NS	146
30	0.44	0.18	4	133	0.52	0.19	2.103104-	P<.05	161
30	0.44	0.18	5	319	0.49	0.19	1.384121-	NS	347
GRUPO II									
B.directa									
38	0.14	0.14	3	118	0.18	0.14	1.532860-	NS	154
38	0.14	0.14	4	133	0.17	0.14	1.165999-	NS	169
38	0.14	0.14	5	319	0.17	0.13	1.334994-	NS	357
B.indirecta									
38	0.26	0.16	3	118	0.32	0.16	2.012342-	P<.05	154
38	0.32	0.16	4	133	0.35	0.18	0.928045-	NS	169
38	0.26	0.16	5	319	0.32	0.17	2.070250	P<.05	357

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA
 DIVISION DE BIOMATEMATICAS
 PRUEBA DE " t "

Casos "n"	Promedio x	Desviación estandard	vs Grupo	Casos "n"	Promedio x	Desviación estandard	Prueba de "t"	P	Grados de libertad
B. Total									
38	0.40	0.16	3	118	0.50	0.20	2.806072-	P<.01	154
38	0.40	0.16	4	133	0.52	0.19	3.549455-	P<.001	169
38	0.40	0.16	5	319	0.49	0.19	2.804349-	P<.01	357
GRUPO III									
B.directa									
118	0.18	0.14	4	133	0.17	0.14	0.565259	NS	249
118	0.18	0.14	5	319	0.17	0.13	0.700182	NS	435
B.indirecta									
118	0.32	0.16	4	133	0.35	0.18	1.389725-	NS	249
118	0.32	0.16	5	319	0.32	0.17	0.000000	*	435
B. Total									
118	0.50	0.20	4	133	0.52	0.19	0.812446-	NS	249
118	0.50	0.20	5	319	0.49	0.19	0.482253	NS	249
GRUPO IV									
B.directa									
133	0.17	0.14	5	319	0.17	0.13	0.000000	*	450
B.indirecta									
133	0.35	0.18	5	319	0.32	0.17	1.682368	NS	450
B. Total									
133	0.52	0.19	5	319	0.49	0.19	1.531002	NS	450

* Idénticos.

DISCUSION.

El estudio de las características fotoquímicas de un cromógeno y su relación con las sustancias químicas utilizadas en la reacción, el cual es formado durante la investigación de un compuesto biológico normal en el organismo, así como la concentración que este compuesto alcanza en personas ausentes de patología, plantea un análisis sistemático, que a la vez que resulta fascinante ocasiona problemas de solución a veces difícil.

La cuantificación de bilirrubina ha sido motivo de múltiples discusiones acerca de las ventajas y desventajas de los numerosos métodos que actualmente existen, particularmente cuando esto se refiere a muestras biológicas provenientes de pacientes a los que hay necesidad de hacer varias determinaciones en corto tiempo, y en los cuales solamente es posible tomar pequeños volúmenes, como sucede en el recién nacido. Este es el problema que he tratado de analizar en este trabajo.

El primer obstáculo que se plantea en este tema es el de preparar un patrón que reúna las características señaladas por la American Academy of Pediatrics, el College of American Pathologists, la American Association

of Clinical Chemists y el National Institute of Health, - el cual si es preparado en el laboratorio, puede convertirse en una limitación grande al estudio en gran escala, por lo tedioso que resulta la preparación del estandar.

El haber contado con soluciones valoradas de procedencia comercial, que reúnen las características mínimas recomendadas por dicho comité y que son -- las siguientes:

- a).- Tiene que estar liofilizado.
- b).- Envasado en frasco ampula sellado y de color ámbar.
- c).- Que contenga proteínas en una concentración mínima de 5.0 gramos por ciento y
- d).- Que pueda ser usado inmediatamente después de preparado.

Lo que permitió estudiar con facilidad el comportamiento óptico a diferentes concentraciones y lograr de esta manera trabajar con curva de calibración ó bien relacionar la lectura de la solución patrón a la concentración del problema, en base a la linealidad -- obtenida.

Por los resultados obtenidos se puede - ver que ambas situaciones son factibles de manera absoluta dentro de un rango clínico muy útil, con el estandar comercial empleado.

Los coeficientes de variación obtenidos a concentraciones superiores a 4.2 mg/% indican que la reproducibilidad del método es bastante satisfactoria ya que se encuentra por abajo del 5 %, bastante cercanas a las obtenidas por MICHAELSSON para un macrométodo que utilizaba el mismo principio que yo emplee (20).

A concentraciones menores de 4 mg el coeficiente de variación se incrementa por lo que es recomendable cuando se trabajan problemas de pacientes sin ictericia o muy ligera, duplicar si es posible la cantidad de -- suero.

En relación a la especificidad de la reacción colorida, se puede ver que a la longitud de onda empleada solamente absorbe luz en grandes cantidades la azobilirrubina alcalina, sin embargo a concentraciones muy bajas el resultado puede ser afectado por la coloración amarilla obtenida de la combinación de diazo-reactivo-cafeína y además por la absorción natural del suero, de lo que se deduce que es conveniente que ambos elementos absorbentes se encuentren presentes en él, particularmente los de baja concentración en bilirrubina.

El estudio del tiempo suficiente para desarrollo del color de la bilirrubina directa demostró que el tiempo de 1 minuto sugerido por DUCCI Y WATSON (10),-

es totalmente insuficiente para que el glucurónido de bilirrubina reaccione con el diazo-reactivo, lo cual ya había sido observado por varios autores. (13) y (14).

La determinación del tiempo óptimo de desarrollo de color considero que puede ser un aspecto muy importante en la cuantificación de las fracciones.

Así mismo fué útil conocer en las condiciones experimentales del diseño descrito aquí, el tiempo de desarrollo de color para la B. indirecta que como se discute en el capítulo de generalidades, requiere de un acelerador para acoplarse al diazo-reactivo, como el color desarrollado es muy estable se puede contar con un margen para la medición fotométrica.

La preocupación que sugiere el acoplamiento espontáneo entre la B. indirecta y el diazo-reactivo quedó eliminada en el método por la incapacidad que -- tiene dicha bilirrubina para acoplarse en un pH extremadamente bajo, lo cual ya había sido descrito por HENRY (14) atribuyéndose este hecho a que la bilirrubina indirecta es insoluble en ácido.

Con relación a la concentración de diazo-reactivo, cantidades crecientes producen un desarrollo óptimo a partir del cual no se mejora la reacción sino -- que la inhiben en parte, probablemente porque el ácido --

clorhídrico en exceso de este reactivo, transforma el benzoato de sodio en ácido benzoico, el cual es inhibidor de la reacción de acoplamiento.

El ácido ascórbico que inhibe completamente la reacción de la bilirrubina con el diazo-reactivo debe ser manejado con cuidado para evitar la contaminación en la muestra ó en los reactivos, ya que pudiera producir error en la determinación. Por lo que se cree conveniente respetar el órden de adición de la muestra y de los reactivos en los tubos "blanco" y "problema" para eliminar esta posibilidad. Esta recomendación es tambien de importancia en lo que se refiere a cafeína.

Con relación a la estabilidad del color formado por la azobilirrubina alcalina se pudo establecer que es bastante satisfactoria ya que solo hay un descenso de 3 % en un lapso de 2 horas, lo que no altera el resultado final ni la interpretación clínica.

La hemólisis constituye uno de los problemas más importantes en la determinación de la bilirrubina por la gran inhibición de color que produce. En este estudio se ha podido llegar a demostrar que ésta puede ser hasta de 20 % y que por lo tanto debe tenerse especial cuidado en la toma del producto para evitar el error de este factor.

Este fenómeno ha sido descrito previamente aunque con resultados ligeramente diferentes; GAMBINO - obtuvo un máximo de 15 % de inhibición (13) y MICHAELSSON de 6 a 8 % (20).

Con relación a las cifras encontradas en población aparentemente sana, dos tipos de consideraciones es necesario hacer:

La primera se refiere a la diferencia entre sexos. Por los resultados obtenidos aquí, a ninguno de los grupos estudiados se encontró diferencia estadísticamente significativa, condicionada por el sexo.

No pudimos encontrar literatura que confirmara o negara este hecho por lo que no hacemos más consideraciones al respecto y simplemente se asientan los resultados obtenidos.

Se sabe que en el recién nacido en condiciones normales la concentración de bilirrubina alcanza el máximo valor. Sin embargo estos valores descienden rápidamente después de los primeros 7 días de vida hasta alcanzar la cifra que prácticamente se mantiene estable durante toda la vida. En estos casos no se estudiaron pacientes menores de 1 mes porque no podemos hacer consideraciones en este sentido. Sin embargo llama la atención que un

grupo fué estadísticamente significativo en lo que se refiere a B. indirecta y total, que fué el grupo comprendido entre 1 y 2 años (GRUPO II). No tengo explicación para este fenómeno, sobre todo porque esta diferencia fué en el sentido de un valor más bajo y por lo tanto totalmente dentro del rango de valores normales para todos los grupos.

En el resto de los grupos no existió ninguna diferencia lo cual confirma lo anteriormente dicho de la estabilidad de esta constante biológica a través de los años.

Con relación a los valores encontrados en todos los grupos, éstos son ligeramente menores a los reportados por autores como GAMBINO (13) que da valores entre 0.15 y 1.2 mg o los señalados por GARTNER (17) que da el valor de la B. total normal hasta de 1.5 mg y está de acuerdo con los reportados por Mac DONALD que dan de 0 a 1 mg.

No tengo explicación precisa para estas diferencias, sin embargo se puede aducir que la gran insensibilidad del aparato usado en este estudio, el cual puede medir hasta 0.001 de unidades ópticas, podría representar una mayor posibilidad de acercamiento al valor exacto.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1.- Se tratan generalidades sobre los pigmentos biliares. Así como una breve historia sobre la metodología empleada para la determinación de bilirrubinas.

2.- Se describe el método JENDRASSIK Y GROF que se siguió en este trabajo y que difiere del original en la cantidad de muestra utilizada, ya que aquí utilizo 0.025 ml. en vez de 0.05 ml. determinándose también el espectro de absorción para saber a qué longitud de onda deberían hacerse las lecturas. GRAFICA No. 1. La longitud de onda obtenida fué de 600 nm.

3.- Se estudió la influencia de diferentes factores sobre el método, como está señalado en la GRAFICA No. 3 en donde se hacen variar los distintos reactivos utilizados.

Por los resultados obtenidos en este trabajo se concluye lo siguiente:

Dependiendo de la influencia de los diferentes factores en el método, las cantidades usadas de los reactivos no producen variación alguna en la reacción, pero deberá usarse siempre un blanco de suero para compensar las absorciones no específicas.

El método estudiado presenta la ventaja de su simplicidad, dada las pocas manipulaciones necesarias para su ejecución.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- ADLER, E. Y STRAUSS, L.
Beitrag zum mechanismus der Bilirubinreaktion im blut.
Kli. Wochschr. 1, 2285-2286 (1922).
- 2.- A.E.READ.
Clinical physiology of the liver.
British Journal of anaesthesia. Vol. 44, No. 8
September (1972).
- 3.- AMIRAND, W.H. AND SMALL, D.M.
The physiochemical basis of cholestrol in man.
J. Clin. Invest. 47, 1043 (1968).
- 4.- BANCROFT HULDAH.
Introduction to biostatistics.
Nueva York, Hoeber - Harper, 1957.
- 5.- BILLING, B.H. & LATHE, G.H.
The excretion of bilirubin as an ester glucuronide
giving the direct van den Bergh reaction.
Biochem. J. 63, 6P (1956).
- 6.- BILLING, B.H. COLE, P.G. & LATHE, G.H.
The excretion of bilirubin as a diglucuronide giving
the direct van den Bergh reaction.
Biochem. J. 65, 774-784 (1957).
- 7.- BILLING, B.H. & LATHE, G.H.
Bilirubin metabolism in jaundice.
Am. J. Med. 24, 111-121 (1958).
- 8.- COLE, P.G. & LATHE, G.H.
The separation of serum pigments giving the direct and
indirect van den Bergh reaction.
J. Clin. Path. 6, 99 (1953).

- 9.- COLE, P.G. LATHE, G.H. & BILLING, B.H.
Separation of the bile pigments of serum, bile and urine.
Biochem. J. 57, 514-518 (1954).
- 10.- DUCCI, H. Y WATSON, C.J.
The quantitative determination of serum bilirubin
with especial reference to the prompt reacting and the
eloroform soluble types.
J. Lab. Clin. Med. 29, 412-417 (1958).
- 11.- ERLICH, P.
Sulfodiazobenzol, ein reagens auf bilirubin.
Centr. Klin. Med. 4, 721-723 (1883).
- 12.- FOG, J.
Determination of bilirubin in serum as alkaline azobi-
lirubin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 10, 241-245 (1958).
- 13.- GAMBINO, S.R.
Bilirrubina. (Método de JENDRASSIK Y GROF modificado).
Métodos seleccionados de Análisis clínicos.
Vol. V 68, (1969).
- 14.- HENRY, R.J.
Clinical Chemistry.
Ed. John Weatherhill, Tokio, Japón.
1a. edición 1966 P. 578.
- 15.- JENDRASSIK, L. Y GROF, P.
Vereinfachte photometrische methoden zur Bestimmung des
Blutbilirubins.
Biochem. Z. 297, 81-89 (1938).
- 16.- LEVI, A.J. GATMAITAN, Z. Y ARIAS, I.M.
Two cytoplasmic proteins from rat liver and their role
in hepatic up take of sulfobrom o phthalein (B.S.P.) and
bilirubin.
J. Clin. Invest. 47, 61 (1968).

- 17.- M. GARTNER AND M. ARIAS.
Formation, transport, metabolism and excretion of bilirubin.
New England J. Med. 280, 1339 (1969).
- 18.- MALLOY, H.T. Y EVELYN, K.A.
The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter.
J. Biol. Chem. 119, 481-490 (1937).
- 19.- MEITES SCAND HOGG C.K.
Studies on the use of the van den Bergh reagent for the determination of serum bilirubin.
Clin. Chem. 5, 470-478 (1959).
- 20.- MICHAELSSON, M.
Bilirubin determination in serum and urine.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 13, suppl. 56, 1-79 (1960).
- 21.- NOSSLIN, B.
The direct diazo-reaction of bile pigments in serum.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12, suppl. 49, 1-76 (1960).
- 22.- OVERBEEK, J.T.H.G. VINK, C.L.J. & DEENSTRA, H.
Kinetics of the formation of azobilirubin.
Rec. d. trav. chim. d. Pays Bas 74, 85 (1955).
- 23.- PAGE, L.B. & CULVER, P.J.
A Syllabus of laboratory examinations in clinical diagnosis. (1961).
- 24.- RODERICK, P. Mac DONALD, HARPER.
(Método de Malloy-Evelyn, modificado).
Provisional.
Métodos seleccionados de Análisis Clínicos.
Vol. V Pág. 86, (1969).

- 25.- SAUNDERS, K.H.
The aromatic diazo-compounds.
Arnold, London. (1949).
- 26.- SCHELLONG, G. Y WENDE, U.
Mikromethode zur Bestimmung des serumbilirubins aus
Kapillarblut bei Neugeborenen.
Arch. Kinderheilk, 162, 126-135 (1960).
- 27.- SCHELLONG, G.
Mikromethode zur Bestimmung des Gesamtbilirubins bei
Neugeborenen.
Aerztl. Lab. 4, 110-113 (1963).
- 28.- SCHMID, R.
Direct reacting bilirubin glucuronide in serum, bile
and urine.
Science. 124, 76-77 (1956).
- 29.- TALAFANT, E.
Properties and composition of the bile pigments gi-
ving a direct diazo-reaction.
Nature. 178, 312 (1956).
- 30.- van den Bergh, A.A.H. Y SNAPPER, J.
Die Farbstoffe des Blutserums.
Deut. Arch. Klin. Med. 110, 540-561 (1913).
- 31.- van den Bergh, A.A.H. Y MULLER, P.
Über eine direkte und eine indirekte Diazoreaktion
auf Bilirubin.
Biochem. Z. 77, 90-103 (1916).
- 32.- WITH, T.K.
The diazo-reaction of bilirubin.
Acta Physiol. Scand. 10, 181-192. (1945).