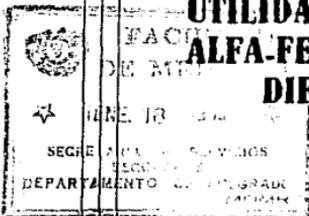


11237142
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA I. M. S. S.
Curso de Especialidad en Pediatría Médica



UTILIDAD DE LOS NIVELES SERICOS DE ALFA-FETO-PROTEINA EN EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DEL SINDROME DE COLESTASIS

TESIS RECEPTACIONAL
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN PEDIATRIA
MEDICA

P R E S E N T A :

Rafael Ramón Ariza del Castillo

A S E S O R D E T E S I S

Dra Celia Laura Cerdán Silva



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

	<u>PAG.</u>
I DATOS GENERALES	1
TITULO	
II. DISEÑO DE INVESTIGACION	
ANTECEDENTES CIENTIFICOS	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
OBJETIVO E HIPOTESIS	6
TIPO DE ESTUDIO Y VARIABLES	7
MATERIAL Y METODO	8
ANALISIS ESTADISTICO	9
HOJA RECOLIPACION DATOS	10
RESULTADOS	11
DISCUSION	14
CONCLUSIONES	15
GRAFICAS	16
BIBLIOGRAFIA	25

I. DATOS GENERALES DEL PROYECTO

TITULO :

UTILIDAD DE LOS NIVELES SERICOS DE ALFA-FETO-PROTEINA
EN EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DEL SINDROME DE COLESTASIS.

II. DISEÑO DE INVESTIGACION.

ANTECEDENTES CIENTIFICOS

La colestasis obstructiva prolongada en la etapa neonatal y del lactante, es un síndrome que se presenta secundario a la reducción del flujo biliar, condicionado por una obstrucción a nivel intra o extrahepático.

La importancia en la diferenciación temprana de su origen, ha generado la búsqueda continua de pruebas diagnósticas que si bien informan acerca del grado de colestasis, son incapaces para diferenciar el origen de la obstrucción (1-4).

La colestasis intrahepática de tipo no obstructivo es más frecuente que la de origen obstructiva. Los mecanismos por los cuales se produce, son complejos, van desde procesos infecciosos, congénitos, metabólicos, genéticos y otros, siendo la más frecuente la hepatitis neonatal (5-6).

La colestasis de tipo obstructivo en pediatría, puede ser condicionada con mayor frecuencia por el quiste de colédoco, hipoplasia y/o atresia de las vías biliares.

El síndrome de colestasis prolongada del lactante se reconoce por la presencia de "Ictericia, coluria, acolia, hipoacolia, hepatomegalia e hiperbilirrubinemia con predominio de la directa". Hasta el momento, no se ha encontrado elemento alguno que oriente de manera precisa la etiología de la colestasis. Alagille (7), hace referencia de cuatro criterios clínicos, para orientarnos hacia el posible sitio de obstrucción: a) coloración de las heces durante 10 días consecutivos, b) peso al nacer, c) edad en la que se inicia la decoloración de las heces, d) características clínicas de la hepatomegalia.

En el síndrome de colestasis prolongada del lactante, son muchas las pruebas paraclínicas que se utilizan para llegar a una orientación diagnóstica precisa como son: determinación de bilirrubinas y ácidos biliares (3-9), tiempo de protombina y tromboplastina, presencia de bils en heces, determinaciones inmunológicas para el virus de la hepatitis, rubéola, citomegalovirus, sífilis y otros; alfa-1-antitripsina, aminoácidos séricos y urinarios, sustancias reductoras en orina, determinación de hormonas tiroideas, electrolitos en sudor, ultrasonografía de hígado y vías biliares, prueba de Grenne(10), centellografía hepatobiliar (11-12), eliminación de colorante Rosa de Bengala (13). Algunas de las anteriores en desuso. Actualmente la mayoría de los autores (14), sugieren la realización de un protocolo no tan extenso, pero más orientador para determinar a la mayor brevedad el tipo de colestasis. Esto consiste en la realización de la prueba de Grenne determinación sérica de bilirrubinas, transaminasas, tiempo de protombina y tromboplastina, serología para virus, ultrasonido abdominal y gammagrama hepático. Con estos estudios se puede tener una orientación en cuanto al tipo de obstrucción, para posteriormente realizar una biopsia hepática percutánea y así determinar si el paciente debe ser explorado quirúrgicamente (15-16). Algunos pacientes con colestasis no obstructiva grave, son sometidos a laparatomía exploradora sin ser necesaria; es por ello la búsqueda continua de nuevos métodos paraclínicos de apoyo.

A partir de 1974 Laskari y Matsanlotis (17) utilizaron la determinación de alfa-feto-proteína como un implemento diagnóstico del síndrome de colestasis. Takahashi e Higashido (18) detectan incremento de la alfa-feto-proteína en pacientes con deficiencia de alfa-1-antitripsina.

Johnson y Mowat, en 1976 (19) reportan la utilidad de la determinación sérica de alfa-feto-proteína en pacientes con colestasis, al encontrar que en los casos de hepatitis neonatal, se incrementan los niveles séricos, sin rebasar el rango considerado como normal en un 80% de los casos; no así en los casos con colestasis secundaria a la atresia de vías biliares, en los cuales no se incrementa de una manera mínima (3%), ya que hasta la fecha

el incremento de alfa-feto-proteína por arriba de 40ng/ml es indicador de masa tumoral (20-24).

Otros autores (25) reportan que la determinación sérica de alfa-feto-proteína se considera como significativa para el diagnóstico de hepatitis neonatal, siempre que se incremente por arriba de 40ng/ml.

Así como otros autores (26), no reportan ninguna modificación en los niveles séricos de alfa-feto-proteína.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Será de utilidad los niveles séricos de alfa-feto-protefna en el diagnóstico diferencial entre la colestasis intrahepática y colestasis extrahepática?

OBJETIVO:

Determinar la utilidad de los niveles séricos de alfa-feto-proteína en el diagnóstico diferencial de colestasis secundaria a hepatitis neonatal y colestasis secundaria a atresia biliar.

HIPOTESIS ALTERNA

Los niveles séricos de alfa-feto-proteína tienen mayor incremento en los pacientes con colestasis secundaria a hepatitis neonatal, que en los pacientes con colestasis secundaria a atresia de las vías biliares.

HIPOTESIS NULA

Los niveles séricos de alfa-feto-proteína, son iguales en los pacientes con colestasis secundaria a hepatitis neonatal y atresia de las vías biliares.

TIPO DE ESTUDIO.

Comparativo, transversal, para investigar la utilidad de una prueba diagnóstica.

VARIABLE DEPENDIENTE:

Niveles séricos de alfa-feto-proteína.

VARIABLE INDEPENDIENTE:

Colestasis intrahepática secundaria a hepatitis neonatal y/o colestasis extrahepática secundaria a atresia de las vías biliares.

ESCALA DE MEDICION DE VARIABLES:

Escalar - continúa.

MATERIAL Y METODO

El presente estudio se realizó en el Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital General Centro Médico "La Raza", I.M.S.S. con el apoyo del Departamento de Inmunología del laboratorio central del mismo hospital, durante los meses de junio a noviembre de 1992. El criterio de inclusión fue; todo paciente pediátrico que tuviera el diagnóstico presuncional de colestasis basado en lo siguiente: a) bilirrubina directa mayor de 1mg/dl, b) ictericia, c) coluria, d) hipoacolia o acolia. Se excluyeron los pacientes a los que no fue posible obtener el resultado de la determinación sérica de alfa-feto-proteína.

Una vez admitidos los pacientes al protocolo de estudio, se les realizó lo siguiente: a) historia clínica completa, b) revisión del expediente de donde se obtuvieron los siguientes datos: nombre, afiliación, edad, antecedentes perinatales, peso al ingreso, edad de aparición de la ictericia, coluria, acolia, hipocolia, hepatomegalia, esplenomegalia, antecedentes de infección materna; c) se captaron los resultados de los estudios solicitados de acuerdo al protocolo de estudio para colestasis del servicio de Gastroenterología Pediátrica que incluyeron: determinación sérica de transaminasas, pruebas de coagulación, biometría hemática, búsqueda de citomegalovirus en orina, prueba de Grenne, ultrasonido abdominal, radiografía de cráneo y columna, serología para hepatitis y otros virus, determinación de bilirrubinas y proteínas séricas, d) previa información a los padres del paciente, se solicitó por escrito la autorización para la toma de 5cc de sangre periférica, la cual se efectuó localizando una vena periférica, previa asepsia, se introdujo una aguja estéril 20 X 32mm desechable, colocada en una jeringa de 5cc estéril y desechable, e) cada muestra fue centrifugada a 3000 RPM durante un tiempo de 3 minutos; posteriormente fue enviada al departamento de inmunología previamente etiquetada para someterla al procedimiento establecido (método de ELISA), f) de acuerdo a lo establecido en el Servicio de Gastroenterología Pediátrica, cada paciente fue sometido a biopsia hepática percutánea para confirmación histológica de su diagnóstico.

ANALISIS ESTADISTICO.

Obtenidos los resultados de la determinación sérica de alfa-feto-proteína, así como los reportes de la biopsia hepática, los datos fueron analizados mediante una prueba de sensibilidad, especificidad y valor predictivo, así como también se analizaron por medio de la t student.

HOJA DE RECOPIACION DE DATOS

Paciente No. _____

Nombre _____

Afiliaión _____

Edad _____

Peso Ingreso _____

Edad aparición de la ictericia _____

Coluria si/no _____

Acolia si/no _____

Hepatomegalia 1-4 † _____

Esplenomegalia 1-4 † _____

Antecedente infec. viral
durante el embarazo _____

Hemoglobina _____

AST/ALT _____

BI/BD _____

DHL _____

Albúmina _____

Globulina _____

Fos. alcalina _____

TP/TPT _____

Prueba de Grenn _____

Ultrasonido abd. _____

Grammagrama hepático _____

Serología _____

CMV en orina _____

Radiografías _____

Biopsia hepática _____

Alfa-feto-proteína _____

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESULTADOS.

El presente estudio se realizó en el servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital General Centro Médico "La Raza", I.M.S.S. con apoyo del departamento de inmunología del Servicio de Laboratorio General del mismo hospital durante el período comprendido de los meses de junio a noviembre de 1992.

Cumplieron con los criterios de inclusión 37 pacientes, se excluyeron 16 pacientes por no procesarse la muestra. Con los 21 pacientes restantes se formaron dos grupos; el grupo I formado por los pacientes que cursaron con colestasis prolongada del lactante de tipo no obstructiva secundaria a hepatitis neonatal, de los cuales correspondieron once para el sexo masculino y dos para el sexo femenino, con una media de edad de 58 ± 14 días (Gráfica 1).

El grupo II estuvo formado por los pacientes que cursaron con el diagnóstico de colestasis prolongada del lactante de tipo obstructiva secundaria a la atresia de las vías biliares, correspondiendo al sexo femenino siete pacientes, y uno al sexo masculino (Gráfica 2), con una media para la edad de 71 ± 16 días.

Al analizar los valores séricos de alfa-feto-proteína se obtuvo lo siguiente: para el grupo I, pacientes con colestasis no obstructiva secundaria a hepatitis neonatal, la \bar{X} fue de 36160.461ng/ml con una e.s. 6749.627ng/ml y con d.s. de 24336.127ng/ml.

Para el grupo II, pacientes con colestasis obstructiva secundaria a la atresia de vías biliares, la \bar{X} de 4328.125ng/ml con un e.s. 1779.242ng/ml y con una d.s. de 7209.434. Al analizar estos datos con la t student, para grupos independientes se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de ambos grupos con $t=3.57$ y con una $p < 0.01$ (Gráfica 3).

Al analizar los niveles séricos de alanino transferasa (ALT) por medio de la t student para grupos independientes se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de ambos grupos con una $t=2.2$ y con una $p<0.05$ (Gráfica 4).

En cuanto a las Gráficas 5 y 6, representan los valores obtenidos para cada grupo, que al buscar las diferencias de los valores, no se encontró significancia estadística.

Al realizar pruebas estadísticas para encontrar el valor de alfa-feto-proteína, como una prueba diagnóstica para la colestasis no obstructiva se decidió tomar como una prueba positiva para esta entidad, los valores arriba de la mediana (16000ng) se calculó esta tomando en cuenta los niveles séricos de alfa-feto-proteína de ambos grupos (Gráfica 7). Se encontró una sensibilidad del 76.9%, una especificidad del 87.5% con un valor predictivo positivo de 90.9% y con un valor predictivo negativo de 70%, la proporción de falsos positivos fue de 12.5% y de falsas negativas de 30% (Cuadro 1). Entendiendo por sensibilidad, "la proporción de sujetos con la enfermedad que tiene una prueba positiva para la enfermedad". Para especificidad, como la "proporción de sujetos sin la enfermedad que tienen una prueba negativa". Para valor predictivo positivo como "la probabilidad de enfermedad en un paciente con resultados positivos" y para valor predictivo negativo como la "probabilidad de no tener la enfermedad cuando el resultado de la prueba es negativo".

Al analizar los valores de los niveles séricos de alanino transferasa, se encontró una diferencia estadísticamente significativa, con una $t=2.2$ y una $p<0.05$, resultado que no lo correlacionamos con lo reportado en la literatura en la cual se menciona, que las transaminasas (aspartato y alanino), se incrementan más en los procesos inflamatorios ya sea por agentes virales o inmunológicos, así como está descrito, que en los procesos de tipo obstructivo como lo es la atresia biliar no es tan importante la elevación de éstas.

La prueba de Greene (sondeo duodenal), nuevamente demostró una alta sensibilidad (75%) y una alta especificidad (86%), como prueba diagnóstica para la atresia biliar, al igual que lo reportado en la literatura japonesa.

La edad de aparición del tinte icterico en nuestro estudio, no guardó una relación directa con alguna de las dos entidades (hepatitis neonatal/atresia biliar), ya que en ocho de los trece pacientes con el diagnóstico de hepatitis neonatal, la edad de aparición del tinte icterico fue por arriba de los 15 días.

El diagnóstico clínico fue confirmado en ambos grupos mediante la realización de una biopsia hepática percutánea, reportándose en los cortes histológicos lo siguiente: para el grupo I hepatitis neonatal, se observaron infiltrado inflamatorio mononuclear con espacios porta con formación de puentes entre uno y otro, con colestasis intracelular e intracanalicular, hepatocitos con edema, degeneración plumoide, con transformación pseudoglandular focal y numerosas células gigantes multinucleadas. Para el grupo II Atresia de vía biliar; fibrosis e inflamación portal moderada con proliferación colangiolos. Colestasis intensa intracelular e intraductal. Colangitis y pericolangitis, datos compatibles con obstrucción parcial al flujo biliar (Gráfica 8).

DISCUSION.

La colestasis prolongada del lactante en nuestro medio, tiene como importancia un diagnóstico oportuno, ya que según la entidad clínica que la produzca va a depender su pronóstico. Afortunadamente, la frecuencia de la hepatitis neonatal en nuestro medio, es mucho más alta que la atresia de la vía biliar; siendo ésta última la de peor pronóstico. Es por ello, la necesidad de buscar más pruebas que nos orienten al diagnóstico diferencial entre estas dos entidades. La prueba de Grenne (sondeo duodenal) de bajo costo, con un 90% de sensibilidad, pero desafortunadamente en nuestro medio, no siempre se logra llevar a efecto a su totalidad. El estudio de gabinete no invasivo, como lo es el ultrasonido de hígado y vías biliares, requiere siempre de interpretación por expertos. Someter al paciente a una intervención quirúrgica también tiene sus riesgos, ya que en caso de los pacientes con hepatitis neonatal, puede condicionar complicaciones graves secundarias a la insuficiencia hepática. Por ello, en el presente estudio, nosotros propusimos que los niveles séricos de alfa-feto-proteína, se podrían incrementar en los pacientes con colestasis secundaria a hepatitis neonatal (hipótesis alterna) mucho más que en los pacientes con colestasis secundaria a atresia biliar. Los resultados obtenidos muestran un incremento de los niveles séricos de alfa-feto-proteína, en pacientes con hepatitis neonatal con una sensibilidad del 76.9%, con una especificidad de 87.5% con un valor predictivo positivo de 90.9% y valor predictivo negativo del 70%, mostrando una $t=3.57$ y p altamente significativa 0.01.

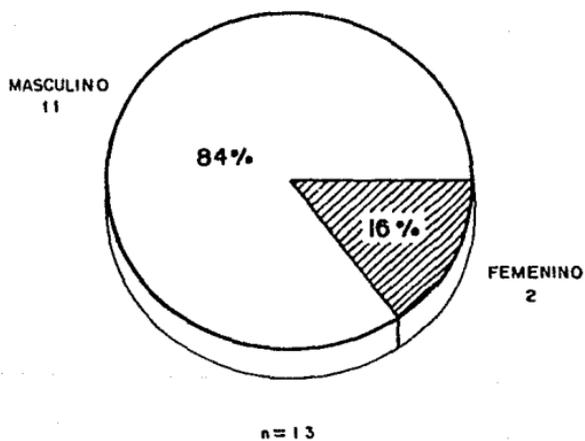
La prueba de Grenne (sondeo duodenal) nuevamente demostró una alta sensibilidad del 75% y especificidad del 86% como prueba diagnóstica para la atresia de vías biliares.

La edad de aparición de la ictericia en nuestros dos grupos, no tuvo relación alguna al tipo de entidad nosológica.

CONCLUSIONES.

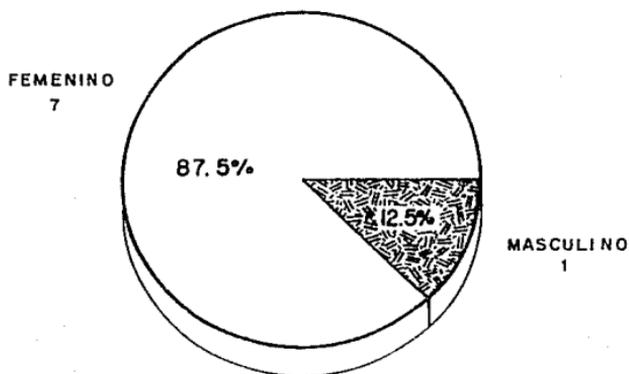
1. Los niveles séricos de alfa-feto-proteína se incrementan en pacientes con colestasis secundaria a hepatitis neonatal. Por tal motivo sugerimos que podría incluirse en el protocolo de estudio de los pacientes con colestasis prolongada del lactante, síndrome en el que es primordial el diagnóstico diferencial para su tratamiento oportuno.
2. El incremento de los niveles séricos de alanino-aspartato transferasa, no es predictivo para la hepatitis neonatal ni para la atresia biliar.
3. La prolongación en el tiempo de protombina y del tiempo parcial de tromboplastina no es predictiva de hepatitis neonatal ni de atresia biliar.
4. La prueba de Gremc(sondeo duodenal) tiene una alta sensibilidad y especificidad como prueba diagnóstica para la atresia biliar.
4. La edad de aparición de la ictericia no guarda relación con ninguna de las dos entidades.
6. El diagnóstico histopatológico es fundamental para el diagnóstico diferencial entre hepatitis neonatal y la atresia biliar.

GRAFICA 1
COLESTASIS NO OBSTRUCTIVA
SECUNDARIA A HEPATITIS NEONATAL
GRUPO I



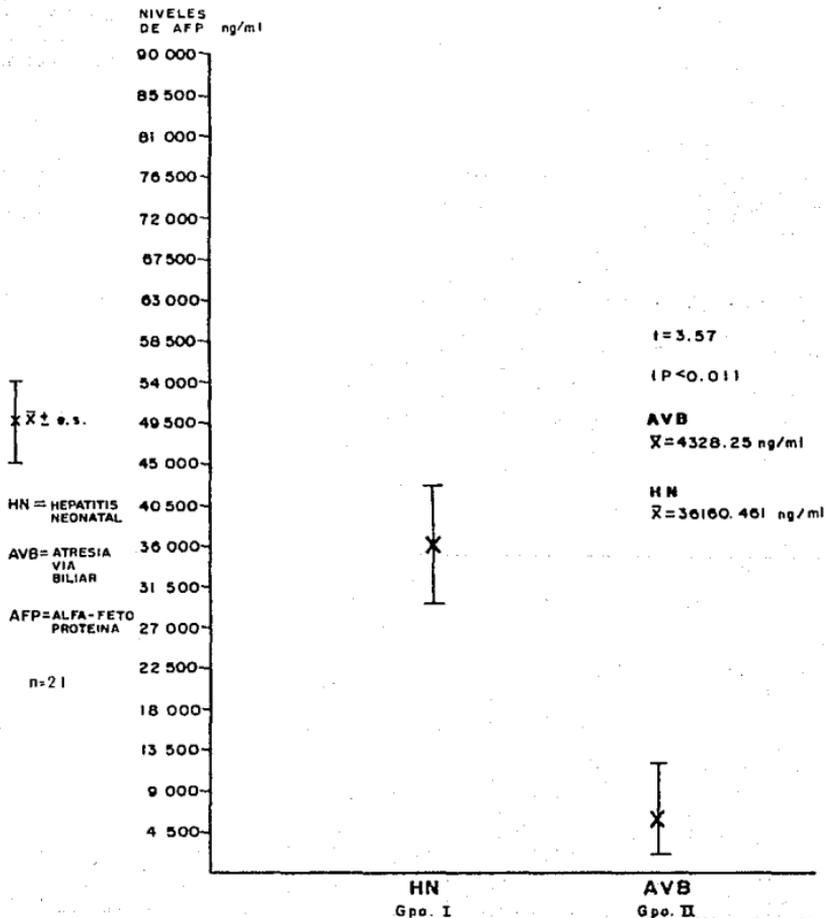
GRAFICA 2
**COLESTASIS OBSTRUCTIVA
SECUNDARIA A LA ATRESIA BILIAR**

GRUPO II

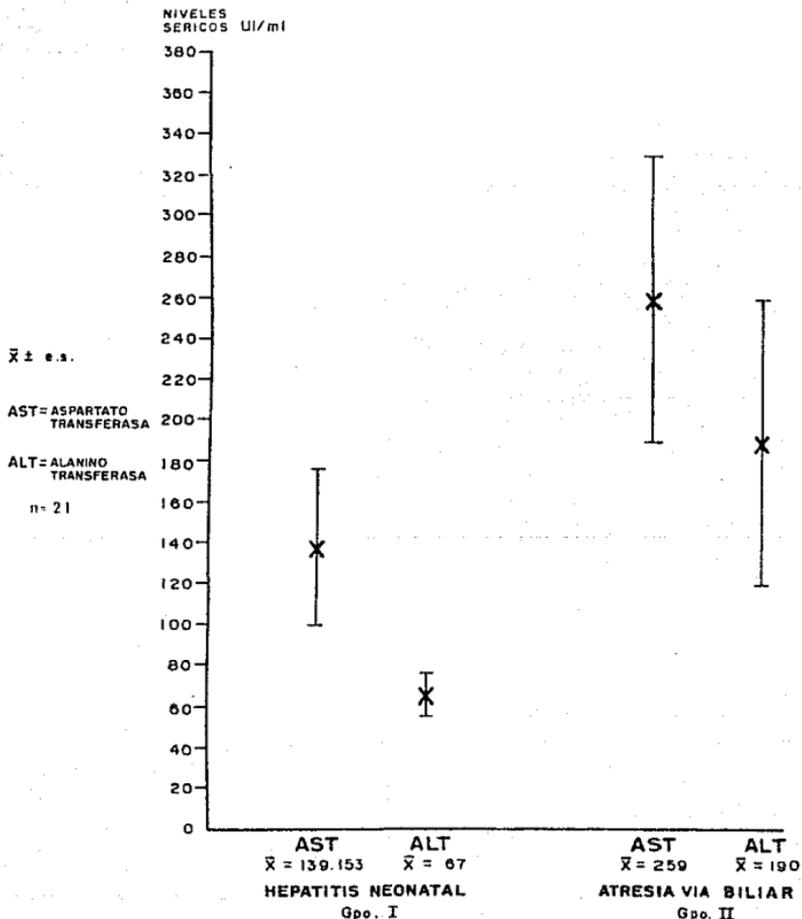


n = 8

GRAFICA 3

CORRELACION DE LOS NIVELES SERICOS DE ALFA-FETO
PROTEINA DE LOS PACIENTES CON COLESTASIS

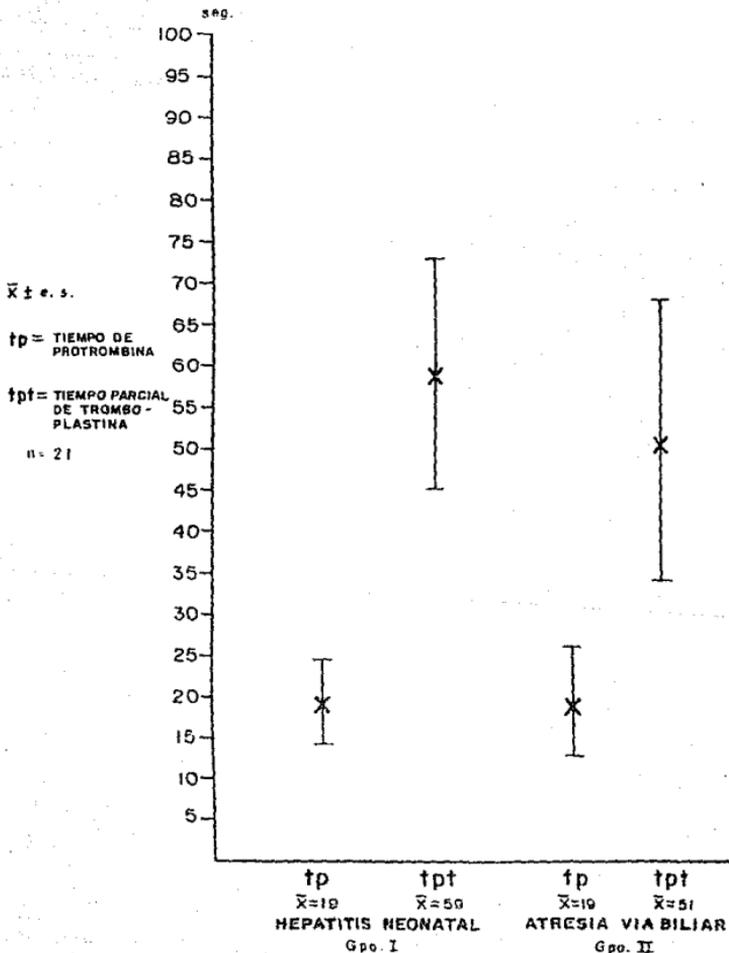
NIVELES SERICOS DE ALANINO Y ASPARTATO TRANSFERASAS EN PACIENTES CON COLESTASIS



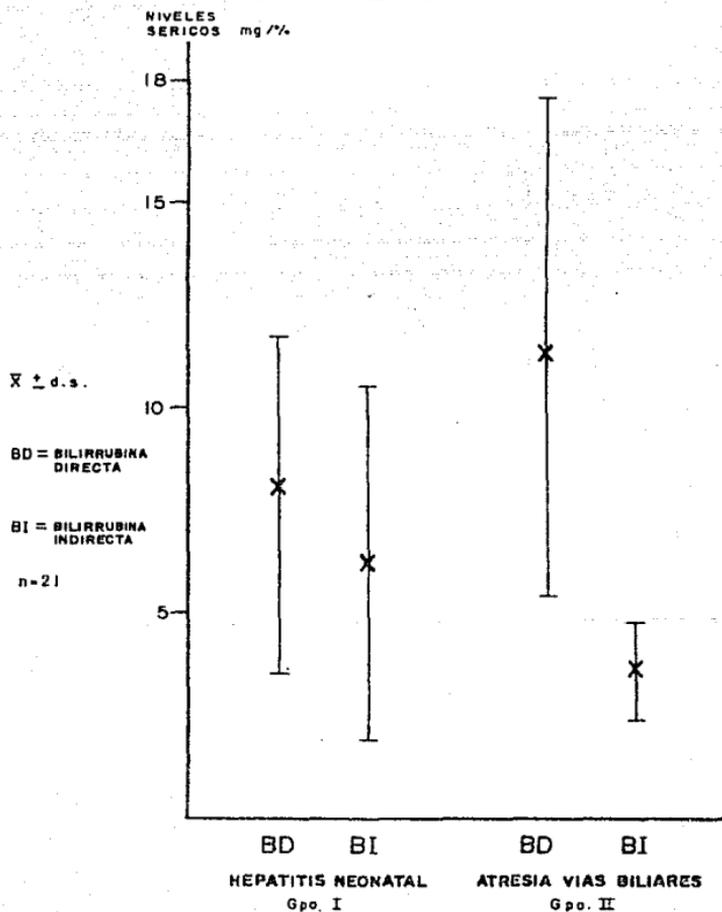
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

GRAFICA 5

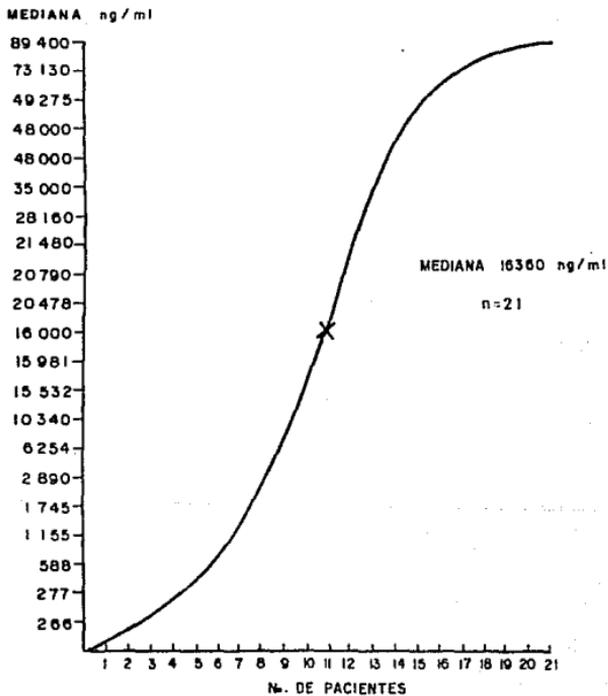
NIVELES SANGUINEOS DE tp y tpt EN PACIENTES CON COLESTASIS



GRAFICA 6
 NIVELES SERICOS DE BILIRRUBINAS
 EN PACIENTES CON COLESTASIS



GRAFICA 7

NIVELES SERICOS DE ALFA-FETO PROTEINA
EN PACIENTES CON COLESTASIS

CUADRO 1

**ALFA-FETO PROTEINA COMO PRUEBA DIAGNOSTICA
EN COLESTASIS NO OBSTRUCTIVA**

NIVELES SERICOS
DE AFP

↑ 16,000. ng/ml

HEPATITIS NEONATAL
(Diagnóstico histológico)

	SI	NO
PRUEBA POSITIVA	10 pacientes	1 paciente
PRUEBA NEGATIVA	3 pacientes	7 pacientes

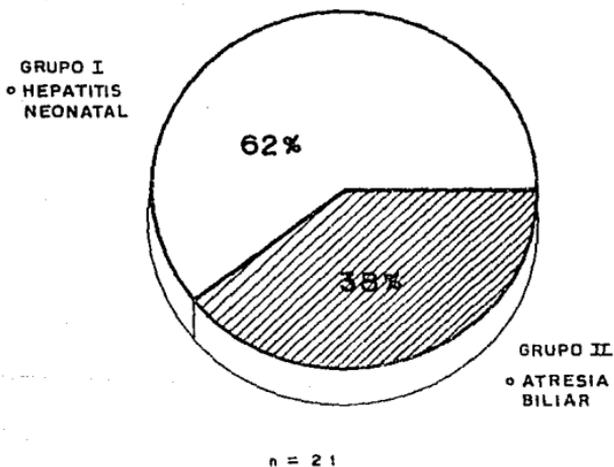
SENSIBILIDAD 76.9 %

ESPECIFICIDAD 87.5%

VALOR PREDICTIVO POSITIVO 90%

n=21

GRAFICA 8

**HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS
DE LOS PACIENTES CON COLESTASIS**

BIBLIOGRAFIA:

1. Gelis S, Asia D. Prolonged obstructive jaundice in infancy. *Am J Dis Child* 1954;88:13-19.
2. Hays M. Biliary atresia: the current state of confusion. *Surg Clin North Am* 1973;53:1257-73.
3. Cambell P, Poley R, Alaupovic P y Smith E. The differential diagnosis of neonatal hepatitis and biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1974;9:699-704.
4. Guiscare H, Muñoz O, Vázquez M, Sánchez-Burgos Y, Fierro H. Hepatitis neonatal y atresia de vías biliares. *Gac Med Mex* 1978;114(11):545-49.
5. Lebenthal E. *Gastroenterología y Nutrición en Pediatría*. Barcelona: Editorial Salvat, 1985.
6. Roy C, Silverman A. *Pediatric Clinical Gastroenterology*. Saint Luis Mosby 1983.
7. Alagille DO. *Enfermedades del Hígado y de las vías biliares en el niño*. España: Gráficas Renacimiento, 1981.
8. Morrissey KP, Javitt NB. Extrahepatic biliary atresia: Diagnosis by serum bile acid patterns and response to cholestyramine. *Surgery* 1973;74:116-21.
9. Javitt NB, Morrissey KP, Siegel E. et al. Cholestasis syndromes in infancy: Diagnostic value of serum bile acids pattern and cholestyramine administration. *Pediatr Res* 1973;7: 119-25.
10. Grenne H, Helneck G, Moran R, O'Neill J. A. Diagnostic approach to prolonged obstructive jaundice by 24 hours collection of duodenal fluid. *J. Pediatr* 1979;95(3):412-14.

11. Leonard C, Hithe B, Marion C. The Use of the diethyl-IDA T_C^{99m} Clearance curves in the differentiation of biliary atresia from other of neonatal jaundice. *Radiology* 1982;142:773-76.
12. Glicklinch R, Rabbit P, Starahak R. T_C^{99m} biliary imaging in pediatrics surgical problems. *J Ped Surg* 1981;16:686-90.
13. Paweel S, Stels M, Beckers C. Clinical evaluation of T_C^{99m} diethyl-IDA in hepatobiliary disorders. *J Nucl Med* 1978;19:783-88.
14. Ballistreri Willians F. Interrelationship between the Infantile cholangiopathias and paucity of the intrahepatic bile ducts. *En Pediatric Hepatology. USA;Ed Hemisphere publishing Corporation* 1990;1-18.
15. Ballistreri WF. Neonatal cholestasis. *J Pediatr* 1985;106:171-84.
16. Larrosa HA, Ribiesca GF, Coello RP. Diagnóstico de atresia de vfas biliares. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1986;43:329-30.
17. Kattamis CA, Laskari S, Matsaniotis NS. Differentation between neonatal hepatitis and biliary atresia by measuring serum alpha-fetoprotein. *Lancet* 1979;ii:650.
18. Kang KY, Higashino K, Takahashi Y, et al. Alpha-fetoprotein in infantile disease. *Clin Chin Acta* 1975;42:175.
19. Johnston DI, Mowat AP. Serum Alpha-fetoprotein levels in extrahepatic biliary atresia, Idiopathic neonatal hepatitis and alpha-1-antitrypsin. *Acta Pediatr Scand* 1976;65:623-29.
20. Yoshiaki T, Tashiro K, Masanori F. The ratio of fucosylation of alpha-feto protein in hepatoblastoma. *Cancer* 1989;63:2174-76.
21. Saiko H, Minoru M, Kazuhiro N. Detection of Membrane-bound alpha-feto protein in human hepatoma cell lines by monoclonal antibody 19F12. *Cancer Res* 1989;49:361-66.

22. Yoshiaki T, Yoshiaori U, Yasuo E, et al. A study on alpha-fetoprotein and endodermal sinus tumor. *J Ped Surg* 1975;10(4):501-6.
23. Yoshiaki T, Sumio S, Masanobu I, et al. Yolk sac tumor (endodermal sinus tumor) and alpha-fetoprotein. *Cancer* 1973;32:917-21.
24. Yoshiari T, Hiroshi H. The diagnostic value of alpha-fetoprotein in infants and children with teratomas: A questionnaire surgery in Japan. *J Ped Surg* 1983;18(2):152-55.
25. Mowat Alex P. Laboratory assesment of hepatobiliary disease En: *Liver Disorders in Childhood*. London;Ed Butterworths 1990;366-84.
26. Chandra RK. Hepatitis antigen and alpha-fetoprotein in neonatal hepatitis. *Arch Dis Child* 1973;48:157.