

Valores de referencia pediátricos para los parámetros bioquímicos glucosa y fosfatasa alcalina en una escuela rural del estado Mérida, Venezuela

JOHANA CADENAS¹, LILIANA ARAUJO¹, ZULAY LABRADOR² Y JESÚS PEÑA³

¹Laboratorio de Bioquímica General, ²Laboratorio de Bioquímica Clínica y ³Cátedra de Deontología y Bioestadística. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela.

e-mails: johanacadenas471@hotmail.com, lilianaa@ula.ve, carmenzulayl@yahoo.es, japg@ula.ve

Recibido septiembre 2005 - Aceptado julio 2006

RESUMEN

Con el objeto de establecer los valores de referencia específicos por edad y género para dos parámetros bioquímicos de una población infantil aparentemente sana, residente en una zona rural del Estado Mérida, y además, compararlos con los suministrados en los equipos de reactivos comerciales utilizados, se determinó la concentración de la glucosa y la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP; EC 3.1.3.1) en muestras de suero de 366 niños (180 del género masculino y 186 del género femenino), con edades comprendidas entre 6 y 12 años. Los intervalos de referencia normales inferiores y superiores fueron determinados por un método no paramétrico mediante la estimación de los percentiles 5 y 95. Los valores de referencia encontrados para la glucosa mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el efecto simultáneo de género y edad. Para la fosfatasa alcalina las diferencias fueron significativas únicamente entre los subgrupos de edad ($p < 0,05$). Se concluyó que ambas variables influyen significativamente en la determinación de los valores de referencia para la glucosa, sin embargo, sólo la variable género mostró efecto sobre los valores de referencia de la fosfatasa alcalina. Se observaron diferencias entre los resultados obtenidos en comparación con los suministrados en los equipos de reactivos utilizados.

PALABRAS CLAVE

valores de referencia, intervalos de referencia, glucosa, fosfatasa alcalina.

ABSTRACT

In order to establish the specific reference values according to age and gender, for two biochemical

parameters in an apparently healthy infantile population in a rural area of the state of Mérida, and also in order to compare the obtained values with those provided with the commercial reagent equipment, glucose concentration of glucose and alkaline phosphatase activity (ALP; EC 3.1.3.1) were determined in samples of 366 children's serum (180 males and 186 females), with ages comprised between 6 and 12 years. Upper and lower normal reference intervals were determined by a non parametric method to estimate 5 and 95 percentiles. The reference values found for the glucose showed significant differences ($p < 0,05$) for the interaction of the gender and age variables. For alkaline phosphatase the differences were significant only among the age subgroups ($p < 0,05$). It was concluded that both variables exert a influence significantly in the determinations of the reference values for glucose, however, only the gender variable showed an effect on the reference values for the alkaline phosphatase. We found differences among the obtained results and those provided with the commercial reagent equipment.

INTRODUCCIÓN

Los valores de referencia biológicos están contemplados dentro de los procedimientos analíticos y son requeridos para todas las pruebas realizadas en el laboratorio clínico, no sólo de individuos sanos sino también de pacientes con enfermedades relevantes. La Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) recomienda el uso del término valores de referencia y de términos relacionados como individuo de referencia, límite de referencia, intervalo de referencia y valores observados (Ashwood y Burtis, 2001). Los valores de referencia son los resultados de una magnitud, que se obtienen a partir de un solo individuo o un grupo de individuos que reúnen unas características concretas

y previamente definidas. Se expresan generalmente teniendo en cuenta los límites inferiores y superiores también denominados Límites de Referencia definidos, determinados mediante métodos estadísticos. Los resultados de una prueba de laboratorio y, en general, de cualquier prueba diagnóstica, no tienen valor por sí mismos, y sólo cuando se comparan con otros datos se convierten en información. Habitualmente, se considera que la interpretación no se realiza correctamente si no se cuenta con datos obtenidos de personas sanas, aunque esto no significa que se está en condiciones de establecer un determinado diagnóstico (González et al., 2002).

Para determinar los límites de referencia debe considerarse el analito que se trata, el tamaño y las características de la muestra de referencia, la variabilidad inter e intra-humana y la variabilidad metodológica, los cuales pueden influir en mayor o menor grado en los valores de referencia de cada sustancia por analizar (Alva et al., 1988).

Los factores relacionados con el paciente que pueden afectar la determinación de ciertos analitos se dividen en aquellos que no se pueden modificar como la edad, el género, el origen étnico, y los que pueden controlarse, como por ejemplo: la tensión mental (estrés) o física, el ejercicio, la dieta, el fumar, la postura al momento de la extracción de la muestra y el consumo de medicamentos, entre otros (Boquet et al., 1995).

La edad y el género son los criterios más usados para establecer los subgrupos porque diversos analitos varían significativamente entre los diferentes grupos de edad y género. La edad puede ser catalogada por intervalos iguales (ejemplo, por décadas) o por intervalos más pequeños en los períodos de la vida donde se observa la mayor variación (Ashwood y Burtis, 2001).

Algunas distribuciones de datos biológicos no se ajustan a la distribución de Gauss (Daniel, 2004), por lo que no es apropiado utilizar métodos paramétricos y se deben realizar transformaciones. La Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) sugiere que se calcule el intervalo no paramétrico por los percentiles 2.5% y 97.5% (Jagarinec et al., 1998). Sin embargo, Solbergh (1986) recomienda los percentiles 5% y 95% y Gómez et al. (1984) escogen percentiles 3% y 97%.

Cada laboratorio debe establecer los valores de referencia propios de la población donde funciona. El laboratorio que acepta los valores de referencia obtenidos en otro lugar debe conocer la forma en que fueron obtenidos, en relación con la característica de la población origen de los sujetos estudiados y sus criterios de inclusión o exclusión, el modo de obtener el material biológico, el procesado de la muestra, la metodología analítica utilizada y el

tratamiento de los resultados, para saber si son semejantes a los propios y si se pueden asumir esos valores acerca (González et al., 2002).

En Venezuela no existen publicaciones de la investigación de valores de referencia en laboratorios clínicos. Los profesionales del área de la salud que brindan sus servicios en los diferentes centros médicos comparan los resultados de la valoración de las muestras biológicas de las personas que acuden a los mismos, con aquellos adjuntos a los equipos de reactivos. Si bien es cierto, que los valores de referencia establecidos por las casas comerciales que elaboran dichos equipos de reactivos cumplen con un estricto control de calidad, éstos son determinados en países en los cuales existen condiciones ambientales, dieta, estilo de vida, entre otros factores, diferentes a las de nuestro país. En consecuencia se propuso determinar los valores de referencia para la glucosa y la fosfatasa alcalina (ALP; EC 3.1.3.1) en muestras de suero de una población infantil aparentemente sana de la Escuela Bolivariana 24 de Junio del Municipio Sucre (San Juan de Lagunillas) del Estado Mérida, Venezuela, procesadas en el laboratorio clínico del Hospital tipo I ubicado en la misma localidad, considerando las variables fisiológicas como la edad y el género, y comparar los valores de referencia de la población en estudio, con los indicados en los equipos de reactivos comerciales utilizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población en estudio

La población de referencia estuvo conformada por 366 niños (180 del género masculino y 186 del género femenino) de la Escuela Bolivariana 24 de Julio del Municipio Sucre, ubicada en San Juan de Lagunillas, Región de Los Andes venezolanos, presumiblemente sanos, con edades comprendidas entre 6 y 12 años, los cuales fueron divididos en subgrupos de edades: de 6-7, de 8-9 y de 10-12 años. Se incluyeron los niños con una alimentación balanceada y se excluyeron aquellos que estuviesen bajo tratamiento médico y/o con enfermedades aparentes.

Condiciones del paciente:

Las indicaciones señaladas a los pacientes fueron un ayuno de 12 horas y evitar la realización de ejercicio físico 12 horas antes de la obtención del espécimen.

Material biológico:

Las muestras de sangre total (5 mL) se extrajeron de las venas del antebrazo, mediante agujas de acero inoxidable y jeringas plásticas, entre 7:00-9:00 am. Las

muestras fueron colocadas en tubos de ensayo de vidrio, se les dejó coagular espontáneamente y se centrifugaron durante 10 minutos a 3.000 rpm para asegurar la rápida obtención de los sueros correspondientes utilizados para los análisis respectivos.

Instrumento:

Se utilizó el instrumento Express Pluss (Oberlin, Ohio, USA) automatizado, perteneciente al Laboratorio ubicado en el Hospital tipo I de Lagunillas. Se utilizaron multicalibradores nivel 1, lote N° A05001 y nivel 2, lote N° A05002 (marca Ciba Corning) para la calibración y alícuotas de suero control nivel normal y control nivel anormal.

Métodos utilizados en las determinaciones analíticas:

Para la cuantificación de la glucosa se utilizó el método enzimático oxidasa/peroxidasa (Trinder, 1969), del reactivo marca Biosystem y el método de p-nitrofenol para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) (Davidsohn y Henry, 1969; Tietz, 1976; Hepler, 1957 y Cohn et al., 1939), del reactivo marca Sigma Diagnostics (St. Louis, USA).

Análisis estadístico

Se trabajó con una sola escuela del Municipio Sucre del Estado Mérida, en consecuencia se aplicó un método de muestreo no probabilístico:

1. Los niños se clasificaron en seis (06) grupos, combinando género con tres categorías de edad (6-7, 8-9 y 10-12 años). Luego se determinó el posible efecto del género, la edad y la interacción de éstos para cada uno de los analitos.

2. Los grupos así definidos quedaron de diferente tamaño, y en consecuencia no se cumplió el supuesto de normalidad e igualdad de varianzas entre los grupos de género y edad.

3. Una forma de subsanar el cumplimiento de los supuestos estadísticos, es ajustar los grupos a un mismo tamaño. En este caso, el tamaño común de los grupos se hizo en función de aquel que tenía la menor cantidad de individuos, para luego seleccionar de los demás en forma aleatoria dicha cantidad. De esta manera es irrelevante el cumplimiento del supuesto de igualdad de varianzas entre grupos (Prueba de Levene) (Gujarati, 2000).

4. Para determinar si existe efecto del género, de la edad e interacción en los niveles de los analitos glucosa y fosfatasa alcalina, se aplicó el análisis de varianza

para un experimento completamente aleatorizado de doble factor (modelo de efecto fijos) (Daniel, 2004).

5. El cálculo de los intervalos de referencia se realizó mediante los percentiles 5 y 95, cubriendo un 90% de los valores de la población en estudio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Mediante la prueba de Kolmogorov - Smirnov (Pardo y Ruiz, 2002) se analizó la distribución de los datos para determinar su ajuste a la curva de normalidad, encontrándose que este supuesto se cumple en los siguientes grupos, para el analito glucosa, en los niños con edades de 6 a 7 años y niñas con edades de 6 a 7 años y de 10 a 12 años. Para la fosfatasa alcalina, los niños con edades de 8 a 9 y de 10 a 12 años, y para las niñas se cumple en todos los grupos de edad, de 6 a 7, de 8 a 9 y de 10 a 12 años como se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

Pruebas de normalidad mediante el estadístico de Kolmogorov - Smirnov, para la glucosa y la fosfatasa alcalina según el género y la edad

Analito	Género	Edad	Estadístico	* gL	p_valor
Glucosa	Masculino	6 - 7	0.076	52	0.200
		8 - 9	0.126	52	0.039
		10 - 12	0.131	52	0.026
	Femenino	6 - 7	0.093	52	0.200
		8 - 9	0.135	52	0.018
		10 - 12	0.085	52	0.200
Fosfatasa alcalina	Masculino	6 - 7	0.145	52	0.008
		8 - 9	0.092	52	0.200
		10 - 12	0.119	52	0.063
	Femenino	6 - 7	0.053	52	0.200
		8 - 9	0.114	52	0.087
		10 - 12	0.087	52	0.200

* gL: grados de Libertad
p_valor > 0.05 se cumple supuesto de Normalidad

En la Tabla 2 se muestran los resultados de las pruebas de igualdad de varianzas, prueba estadística de Levene (Pardo y Ruiz, 2002), para los analitos glucosa y fosfatasa alcalina según la edad. Este método estadístico permite contrastar la hipótesis nula de que los grupos comparados tienen la misma varianza. Como se observa para ambos analitos, no en todos los casos considerados se satisface el supuesto de igualdad de varianzas (p<0.05). Sin embargo, según Gujarati (2000) si los tamaños de los grupos son iguales y suficientemente grandes, no es muy relevante el incumplimiento del supuesto de igualdad de varianzas.

TABLA 2

Pruebas de igualdad de varianzas, para la glucosa según el género y la edad

Analito	Género	Estadístico de Levene	gl1	gl2	p_valor	Edad(años)	Estadístico de Levene	gl1	gl2	p_valor
Glucosa	Masculino	1.432	1	310	0.232	6 - 7	2.397	2	309	0.093
						8 - 9				
	Femenino					10 - 12				
Fosfatasa alcalina	Masculino	2.848	1	310	0.092	6 - 7	4.800	2	309	0.009
						8 - 9				
	Femenino					10 - 12				

p_valor > 0.05 se cumple supuesto de Igualdad de Varianzas

En la Tabla 3 (ANOVA), el género, la edad y el efecto simultaneo de ambas variables, son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) para la glucosa. En consecuencia, se obtuvieron valores de referencia del analito para cada género según la edad. Con respecto a la fosfatasa alcalina (Tabla 4) se tiene que la edad es el único factor estadísticamente significativo ($p < 0.05$), ya que el efecto simultaneo de edad y género no es estadísticamente significativo ($p > 0.05$). En consecuencia se obtuvieron valores de referencia de la fosfatasa alcalina según la edad.

TABLA 3

ANOVA para un experimento completamente aleatorizado de doble factor (modelo de efecto fijos)

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl ⁻¹	Cuadrados Medios	Razón de Varianza	p_valor
A	475.0801	1	475.0801	9,05	0.0028
B	484.0449	2	242.0224	4,61	0.0106
AB	344.4295	2	172.2147	3,28	0.0389
Tratamientos	1303.5545	5	260.7109	4,97	0.0002
Residual	16060.0577	306	52.4839		
Total	17363.6122	311			

Donde: A: Género. B: Edad
p_valor < 0.05 es un efecto significativo
Variable Dependiente: Glucosa

TABLA 4

ANOVA para un experimento completamente aleatorizado de doble factor (modelo de efecto fijos)

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl ⁻¹	Cuadrados Medios	Razón de Varianza	p_valor
A	5425.0032	1	5425.0032	1,49	0,2233
B	66762.25	2	33381.125	9,16	0,0001
AB	3952.1218	2	1976.0609	0,54	0,5819
Tratamientos	76139.375	5	15227.875	4,18	0,0011
Residual	1114835.6	306	3643.254		
Total	1190974.97	311			

Donde: A: Género. B: Edad
P_valor < 0.05 es un efecto significativo
Variable Dependiente: Fosfatasa alcalina

Los valores de referencia se determinaron mediante la aplicación del método no paramétrico de los percentiles 5 y 95, que consideran el 90% central de los valores poblacionales, excluyendo el 5% de los valores más altos y más bajos del conjunto de datos.

Los valores de referencia para los analitos glucosa y fosfatasa alcalina para cada uno de los grupos de género y edad (Tabla 5), se comparan con aquellos impresos en los métodos utilizados para las valoraciones analíticas de cada una de las pruebas. Es importante señalar que los valores de referencia suministrados en el método analítico que se empleó para glucosa, son valores únicos sin establecer diferencias por edad y por género.

TABLA 5

Valores de referencia para la glucosa y comparación con los valores suministrados en la literatura de los equipos de reactivos

Analito	Género	Edad (años)	Valores obtenidos (mg/dL)	Valores de los equipos de reactivos utilizados (mg/dL)
Glucosa	Masculino	6 - 7	70.00 - 97.35	70 - 105
		8 - 9	70.65 - 100.35	
		10 - 12	73.95 - 93.45	
	Femenino	6 - 7	70.00 - 92.35	
		8 - 9	68.60 - 96.40	
		10 - 12	73.30 - 94.75	
Masculino y Femenino	Todas las edades			

El análisis estadístico aplicado, arrojó valores de referencia específicos según el género, muestra que los límites superiores de los valores de la glucosa del género masculino están por encima de los del género femenino para todos los grupos de edad, pero son menores al límite superior publicado en la metodología del equipo empleado para su determinación. Tanto en el género masculino como en el femenino, a medida que se incrementa la edad, el nivel de glucosa también tiende a aumentar, aunque en algunos casos se observa una leve disminución del mismo. Las razones de estas consideraciones se desconocen por lo que pueden darse resultados inesperados, entre ellos, que pudieran ser por cambios hormonales, degenerativos o bien de adaptación a la población. En un estudio publicado por Jagarinec et al. (1998), en el cual se compararon los valores de referencia, obtenidos por métodos no paramétricos (percentiles 2,5 y 97,5), de una población de niños escolares y adolescentes (8-18 años), con los de una población adulta (20-30 años), de la misma área geográfica, se encontró que para la glucosa, y otros analitos del suero, no existen diferencias con respecto a la edad y el género entre los valores, lo cual, no coincide con nuestros resultados.

La valoración de la fosfatasa alcalina clasificada en grupos de edad, muestra una tendencia significativa

($p < 0.05$) al incremento conforme aumenta la edad. Estos resultados referentes a la edad son contrarios a los publicados en la metodología empleada para su detección. Sin embargo, no podemos establecer una comparación bien definida; ya que, ésta muestra los valores de referencia establecidos en subgrupos de infantes, niños y adultos, sin especificar las edades. Sin embargo, Lockith et al. (1988) para la fosfatasa alcalina, de acuerdo con estos investigadores se encontraron diferencias marcadas relacionadas con la edad y el género, los valores aumentaron progresivamente con la edad hasta los once años sin existir diferencias entre los géneros hasta los nueve años, en el rango de 10-11 años los valores de las niñas fueron superiores a los de los niños. A partir de la edad de 12 años disminuyen los valores conforme aumenta la edad hasta los 19 años, siendo los valores de las niñas siempre menor a los de los niños. Por otra parte, Jagarinec et al. (1998) al comparar los valores de referencia de una población de niños escolares y adolescentes (8 - 18 años), con los de una población adulta (20-30 años), la fosfatasa alcalina, presentó valores de referencia más altos que la población adulta. En un trabajo realizado por Gómez et al. (1984), los valores de referencia determinados no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) relacionadas con el género para fosfatasa alcalina, los resultados del análisis de varianza entre todas las edades combinadas indicaron que esta enzima mostró valores altos durante el período de crecimiento para ambos géneros hasta los 14 años, siendo este valor mayor para los varones, sin embargo a la edad de 12 años los valores de las hembras disminuyeron abruptamente. Con respecto a la glucosa no hubo variaciones significativas ($p > 0.05$) relacionadas con la edad durante la infancia, excepto por los valores bajos observados en la primera semana postnatal.

Los resultados descritos por Guneral y Bachemann (1990), indican que la edad de un individuo es un factor importante en la concentración de un analito en particular. La infancia y la pubertad están marcadas relativamente por cambios fisiológicos rápidos los cuales no siempre van acompañados de cambios en las concentraciones de los analitos con el incremento de la edad.

Los resultados de las pruebas de laboratorio tienen un rol sustancial en el diagnóstico de las enfermedades. Sin embargo, los resultados arrojados por el laboratorio no siempre corresponden con el estado clínico del paciente. Ellos pueden ser inesperados y sorprendentes. Un resultado anormal de laboratorio puede ser aceptado e interpretado como un signo de enfermedad. Sin embargo, el resultado anormal puede ser debido a la incidencia de otros factores diferentes

a la enfermedad. Convencionalmente, esos factores han sido divididos en preanalíticos y analíticos que actúan *in vivo* e *in vitro*. Hay que tener presente que esa lista es larga y laboriosa (Irijala y Gronroos, 1998).

CONCLUSIONES

1.- Para el analito glucosa se consideró que ambas variables, género (masculino y femenino) y la edad (subgrupos de 6-7, de 8-9 y de 10-12 años), influyen significativamente en las determinaciones de los valores de referencia, de acuerdo al nivel de significancia (0.05) y a los p _valor obtenidos.

2.- Con respecto a las fosfatasas alcalinas, las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$) únicamente entre los subgrupos de edad (de 6-7, de 8-9 y de 10-12 años).

3.- Se apreciaron diferencias entre los valores de referencia hallados en este estudio para los analitos estudiados y los valores suministrados por los equipos de reactivos utilizados (determinados en una población bajo condiciones diferentes a las estudiadas).

RECOMENDACIONES

En investigaciones futuras se deben estudiar poblaciones infantiles residentes urbanas y rurales y evaluar la influencia de otros factores tales como el estado nutricional (mal nutrición), peso, talla, condiciones geográficas, estrato socioeconómico, nivel educativo, entre otros.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alva, S. Cadena, M., Himmelstine, M. y Sánchez, J. 1988. "**Valores de referencia para glucosa plasmática. Efecto del sexo, la edad y el embarazo**". Acta Bioquím. Clín. Latinoam. Vol. 22,(4): 499-507.

Ashwood, E. and Burtis, C. 2001. **Fundamentals of Clinical Chemistry**. Quinta edición. Parte I, Capitulo 2. P. 30 - 54b; Parte III, Capitulo 14. P. 251 - 261.

Boquet, J., Castillo, S. y Cáceres, M. 1995. "**Mejoría continua de la calidad**" Editorial Médica Panamericana, México. P. 27-50.

Cohn, C. and Kaplan, A. 1966. **Blood Chemistry. Clinical Pathology**, 7th ed. SE Miller, Editor, Williams & Wikins, Baltimore (MD). P. 316.

Daniel, W. 2004. **Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud**, Editorial Limusa Wiley, México. P. 295 - 399.

Davidsohn, I. and Henry, J. 1969. "**Clinical Diagnosis**", 14th ed. Saunders, Philadelphia. P. 719 - 720.

Gómez, P., Coca, C., Vargas, C., Acebillo, J. y Martínez, A. 1984: "**Normal Refence-Intervals for 20**

biochemical variables in Healthy infants, children, and adolescents". Clin. Chem. Vol. 30(3):407 - 412.

González de B. J. M., Arilla E., Rodríguez M. y Sánchez A. 2002. **Bioquímica Clínica**. Editorial McGraw Hill, España P. 125-133, P. 356-359.

Gujarati, D. 2000. **Econometría**. Editorial McGRAW-HILL. Bogotá. P.

Guneral, F. and Bachmann, C. 1990. **"Age-related values for urinary organic acids in healthy Turkish pediatric population"**. Clin. Chem. Vol. 40:862-868.

Hepler, OE. 1957. **"Manual of Clinical Laboratory Methods"**, 4th ed. Thomas, Springfield (IL). P. 312.

Irjala, KM. and Gronroos, PE. 1998. **"Prenalytical and analytical factors affecting laboratory results"**. Ann. Med. Vol. 30(3):267-272.

Jagarinec, N., Flegar-Mestreic, Z., Surina, B., Vrhovski-Hebrang, D. and Preden-Kerokovic, V. 1998. **"Pediatric reference intervals for 34 biochemical**

analytes in urban school children and adolescents". Clin. Chem. Lab. Med. Vol. 36(5):327 - 337.

Lockitch, G, Halstead, A., Albersheim, S., MacCallum, C. and Quigley, G. 1988. **Age-and sex-specific pediatric reference intervals for biochemistry analytes as measured with the Ektachem-700 analyzer**. Clin. Chem., Vol.34(8):1622-1625.

Pardo, A., y Ruiz, M., 2002. **SPSS 11. Guía para el análisis de datos**. Editorial McGraw Hill, España. p. 269 - 308.

Solbergh, H. E. 1986. **"Teoría de valores de referencia. Concepto de valores de referencia "**. Acta de Bioquím. Clín. Latinoam. Vol. 20, (3):485-492.

Tietz, NW. 1976: **"Fundamentals of Clinical Chemistry"**, Saunders, Philadelphia. P. 603.

Trinder, P. 1969. **"Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor"**. Ann. Clin. Biochem. Vol. 6:24 - 27.