



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETECCION TEMPRANA DE INFECCION
INTRAUTERINA, UTILIZANDO COMO
INDICADOR UNA PROTEINA DE FASE
AGUDA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
LAURA ELENA VAZQUEZ TRUJILLO

MEXICO, D. F.

1992

FAJLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

I N D I C E

INTRODUCCION

I. GENERALIDADES

- 1.1 Aspectos históricos.
- 1.2 Biosíntesis de la PCR.
- 1.3 Estructura de la PCR.
- 1.4 Actividades biológicas.
- 1.5 Relación de la PCR con enfermedad y significado patológico.
- 1.6 Métodos de determinación.
- 1.7 Infección intrauterina.
 - 1.7.1 Etiologías.
 - 1.7.2 Patogenia.
 - 1.7.3 Manifestaciones clínicas.
 - 1.7.4 Signos clínicos.

II PARTE EXPERIMENTAL

- 2.1 Diagrama de bloques.
- 2.2 Grupos de estudio.
- 2.3 Toma y conservación de las muestras.
- 2.4 Determinación de la PCR por el método inmunoturbidimétrico.
 - 2.4.1 Construcción de la curva estándar de PCR.
 - 2.4.2 Procesamiento de las muestras.
- 2.5 Evaluación del método.
- 2.6 Análisis estadístico.

III RESULTADOS

- 3.1 Determinación de PCR.
- 3.2 Evaluación del método.

IV DISCUSION DE LOS RESULTADOS

V CONCLUSIONES

VI BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

Durante la fase aguda de muchas enfermedades ocurren cambios característicos en las células sanguíneas y el plasma. Las substancias que modifican sus niveles séricos como parte de este proceso se conocen como reactantes de fase aguda, siendo la proteína C reactiva el prototipo de éstas.

La proteína C reactiva (PCR) fué reportada por Tillet y Francis desde 1930. Observaron que una fracción de polisacárido somático no específico de neumococo, designada fracción C, precipitaba con el suero de pacientes en etapa aguda de enfermedad. Posteriormente la caracterizaron Abernethy y Avery, quienes encontraron que requiere de iones calcio para su reacción con el polisacárido C. La PCR está presente en individuos normales en concentraciones muy bajas, las cuales se elevan en respuesta a muchas situaciones inflamatorias, daño tisular y neoplasias malignas. Aunque el aumento de los niveles de la PCR no es una respuesta específica, su determinación es una ayuda valuable en el diagnóstico y el pronóstico de enfermedad, así como en la evaluación terapéutica durante la misma, y durante el proceso de recuperación postquirúrgica.

Existe una gran variedad de pruebas inmunológicas que se han utilizado en la determinación de la PCR. En un principio se emplearon técnicas, que entre otras desventajas, tienen las características de ser poco sensibles, no cuantitativas, de interpretación subjetiva, etc., como la precipitación en tubo de ensayo, usada por Tillet y Francis, la técnica en tubo capilar y la prueba de aglutinación en látex, que pueden aplicarse de manera cualitativa o semicuantitativa. Además, se ha hecho uso de

una serie de métodos de precipitación por inmunodifusión en gel, tales como las técnicas modificadas de Ouchterlony, Oudin y Mancini; los cuales se emplean con muy poca frecuencia por ser lentos, complicados, de baja sensibilidad y ser sólo semicuantitativos. También se han utilizado técnicas inmunolectroforéticas en gel de agarosa, que si bien pueden ser cuantitativas, siguen siendo sofisticadas, tardadas y costosas por que requieren del aparato de electroforesis. Se han desarrollado mejores técnicas con mayor sensibilidad, como el radioinmunoanálisis que puede detectar nanogramos de la proteína, pero que tiene el inconveniente de ser altamente costosa, ya que se necesita un contador de centelleo para medir radioactividad y reactivos marcados con radioisótopos que además son inestables y de gran riesgo en su manejo. Actualmente, la turbidimetría y la nefelometría son técnicas con mucho auge, proporcionan alta sensibilidad, rapidez y sencillez en el procedimiento, por lo que la determinación de la PCR se simplifica.

La determinación de la PCR como predicción de infecciones en el recién nacido se ha estudiado como apoyo en diversas situaciones, como sepsis, meningitis y en los que presentan ruptura prematura de membrana.

El recién nacido que adquiere una infección puede haberlo hecho intrauterinamente o durante el parto. En el primer caso, puede adquirirse por dos vías: mediante la propagación por el torrente circulatorio materno a través de las membranas fetales, y ascendiendo desde el cérvix hasta el líquido amniótico. Por otro lado, si existen infecciones vaginales en la madre, como las causadas por Herpes virus, Chlamydia, Candida, etc., éstas pueden afectar

al neonato e infectarlo al pasar por el canal de parto. En ambas situaciones, las infecciones pueden ser de etiología bacteriana, micótica, viral, parasitaria, o bien debido a espiroquetas.

Además de la investigación de PCR, la detección temprana de infección en el recién nacido puede apoyarse en otras determinaciones clínicas como velocidad de sedimentación globular, conteo de leucocitos, cuantificación del complemento y de los niveles de IgA e IgM, las cuales se encaminan a establecer técnicas inmunológicas y microbiológicas que identifican al agente etiológico para establecer el diagnóstico específico.

En estos casos, la determinación de la PCR es importante para apoyar un diagnóstico presuntivo de infección, y de esta manera dar un manejo adecuado al recién nacido, especialmente para administrar, evitar o descontinuar una terapia.

En nuestro país no existe trabajo alguno que valore la determinación cuantitativa de PCR en neonatos como índice de infección, por lo que se plantea la utilidad de esta determinación en nuestro medio, para conocer el índice real de infección neonatal.

El objetivo de este trabajo es proponer el empleo de un método inmunoturbidimétrico sensible y sencillo para la determinación cuantitativa de la PCR, valorándolo en un grupo de 24 pacientes recién nacidos con sospecha de infección neonatal y tomando como grupo control 32 neonatos sanos.

I. GENERALIDADES.

I.1. Aspectos Históricos.

El conocimiento de la proteína C reactiva (PCR) tiene su origen en el estudio de la neumonía y en el desarrollo de un producto farmacéutico para su tratamiento.

De una revisión efectuada hace 10 años (18), se mencionarán todos los siguientes datos : en 1930 William S. Tillett y Thomas Francis, quienes habían estudiado la respuesta inmunológica al polisacárido capsular y a una fracción nucleoprotéica del neumococo en pacientes con neumonía, decidieron realizar otras investigaciones con el nuevo antígeno que un año antes había descubierto Tillett. Se trataba de una preparación antigénica soluble, de una cepa de neumococo no capsulado, a la cual designó como fracción C, por su analogía con la substancia C específica de grupo de los estreptococos hemolíticos que Lancefield había descrito algunos años antes. Todos los pacientes con neumonía mostraron fuertes reacciones de precipitación con la fracción C, pero esta reacción disminuía o desaparecía conforme el paciente se alejaba de la etapa aguda de la enfermedad. Obtuvieron pruebas positivas en cuatro casos de endocarditis bacteriana subaguda, en quince de fiebre reumática aguda y en uno de osteomielitis estafilocócica; pero en pacientes con sarampión, tuberculosis y malaria los resultados fueron negativos. Con esto concluyeron que esta reacción no era específica en la neumonía por neumococo.

Rachel Asch, en 1933, reportó la aplicación de la prueba de precipitación con fracción C a una variedad de enfermedades infantiles asociadas a cocos Gram positivos y microorganismos

Gram negativos.

En 1941, Avery publicó una serie de tres artículos donde estableció la naturaleza proteica y definió algunas propiedades de la sustancia C reactiva. En el primer artículo, Avery y Abernethy describieron la termolabilidad de la sustancia C reactiva (se inactiva a temperaturas mayores de 65°C) y su distribución en suero demostró que permanece en la fracción gamma; además, descubrieron que el ión calcio es esencial para que se lleve a cabo la reacción de precipitación entre el plasma y el carbohidrato C. En el segundo artículo, MacLeod y Avery demostraron que la reacción de precipitación depende tanto de la presencia de iones calcio como de la asociación con lípidos séricos. Estos mismos autores publicaron un tercer artículo, donde demostraron que el suero de conejos inmunizados con PCR reaccionaba fuertemente con el suero humano en fase aguda, mostrando así las propiedades inmunogénicas e inmunológicas de la proteína aislada.

Anderson y Maclyn MacCarty, en 1951, aportaron conocimientos sobre la estructura de la proteína y una secuencia completa de aminoácidos para la PCR humana.

Hurlimann, Thorbecke y Hochwald, identificaron al hígado como el lugar de síntesis de la proteína usando análisis autorradiográficos en cultivos de tejidos con aminoácidos marcados con ^{14}C . En 1951, Harrison Wood encontró que la PCR en concentraciones pequeñas de mcg por ml estimula la migración de leucocitos normales humanos, pero en concentraciones elevadas parece ser tóxico para estas células.

1.2. BIOSISTESIS DE LA PCR

La síntesis de la PCR se lleva a cabo en los hepatocitos y su capacidad no se limita solamente a una subpoblación de células hepáticas, ya que cuando existe un estímulo verdaderamente grande, todos los hepatocitos son capaces de sintetizar esta proteína. Dentro de estas células, el retículo endoplásmico rugoso, liso y el aparato de Golgi, son los sitios de síntesis y excreción de la proteína (27).

En el sistema de inducción de síntesis se encuentran implicados el sistema macrófago-reticuloendotelial, la Interleucina I y la Interleucina 6; algunos componentes activos del complemento y las prostaglandinas también están implicados en el incremento de los niveles de esta proteína (21).

1.3. ESTRUCTURA DE LA PCR

La molécula de la PCR está formada por cinco cadenas polipeptídicas idénticas no glicosiladas, que presentan un enlace disulfuro-intracadena; a su vez, estas subunidades tienen asociaciones no covalentes en una configuración circular con ciclo pentamérico simétrico, pudiendo apilarse para formar decámeros. El peso molecular aproximado de cada subunidad es de 21,000 y el peso de la molécula, tanto en suero como en estado purificado es variable, en un rango de 110,000 a 144,000. La proteína posee uniones calcio-dependientes a terminales-fosfatídicas (8).

Cada subunidad de PCR tiene una secuencia única conteniendo 187 aminoácidos. El grupo amino terminal es el ácido pirrolidincarboxílico y el carboxilo terminal es la prolina;

posee dos residuos medios de cistina, en posiciones 36 y 78, en donde se establece el enlace disulfuro (2).

I.4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

La PCR es un reactante de fase aguda con varias funciones-inmunorreguladoras: se une a C1q, aumenta fagocitosis, inhibe agregación plaquetaria (13, 30), se une al antígeno activador de linfoblastos e inhibe la formación de anticuerpos digeridos contra antígenos T dependientes, se une selectivamente a linfocitos T y modifica algunas de sus funciones (9); suprime la inducción específica de mitógeno y la inducción no específica de antígeno para una respuesta celular proliferativa. En un estudio de inducción mitogénica de síntesis de anticuerpos por células mononucleares de sangre periférica humana, se encontró que la PCR induce un efecto supresor irreversible en la síntesis de anticuerpos por linfocitos estimulados con células mononucleares de sangre periférica; este efecto es independiente de las células supresoras (15).

La PCR activa la vía clásica del complemento tan eficazmente como los anticuerpos IgG y conduce a la fijación de las fracciones C4b y C3b, las cuales pueden mediar la reacción de adherencia-complemento-dependiente, y la fijación del complejo terminal C5b-C9, causando lisis, si la unión es en una superficie celular (31). La proteína, a semejanza de los anticuerpos, puede opsonizar material para fagocitosis e iniciar daño celular y reacciones inflamatorias (19).

M.B. Pepys planteó la hipótesis acerca del papel que juega la PCR en enfermedades no infecciosas, dice que la proteína reconoce la

potencialidad tóxica que poseen algunos constituyentes celulares, tales como lípidos y fosfolípidos, policationes y polianiones, al quedar expuestos en forma anormal cuando existe daño tisular, y se une a ellos para detoxificar y facilitar el aclaramiento (22).

1.5. RELACION DE LA PCR CON ENFERMEDAD Y SIGNIFICADO PATOLOGICO

La PCR incrementa sus concentraciones en suero en asociación con diferentes tipos de inflamación y en respuesta a una variedad de estímulos (20). La magnitud de este incremento varía directamente con la extensión del daño tisular, con el tipo de estímulo-inflamatorio y con el órgano o tejido involucrado en la inflamación. La proteína se encuentra relacionada comúnmente a infección bacteriana, daño tisular isquémico -como en infarto de miocardio o embolia pulmonar- neoplasia maligna -particularmente cuando se asocia con necrosis tisular- daño físico o traumático -como en la fractura de huesos, cirugía o quemaduras- y muchas condiciones clínicas inflamatorias, como lo son fiebre reumática, artritis reumatoide, vasculitis, hepatitis crónica activa o colitis ulcerativa (11).

En relación a las cirugías, si después de cuatro días de haberse realizado existen niveles elevados de PCR, esto puede indicar que existe infección (11)

En el caso de recién nacidos con sospecha de infección, ya sea por su historia o signos clínicos y en quienes se ha iniciado tratamiento con antibiótico, se puede hacer la determinación de PCR 24 horas después del nacimiento. El resultado de esta determinación, junto con el apoyo de otro parámetro, como es el

conteo de neutrófilos inmaduros, ayuda a la vigilancia del paciente y a saber si se trata realmente de una infección y entonces continuar con el tratamiento; o bien, si sucede lo contrario, suspenderlo (26,28).

La PCR se eleva en corioamnionitis histopatológica y ofrece significativas ventajas de diagnóstico sobre la amniocentesis en el manejo de pacientes con ruptura prematura de membrana. En bebés con infección adquirida en el útero, dentro de las 12 a 25 horas previas al momento del parto, se presenta un incremento inmediato en los niveles de PCR al momento del nacimiento (10, 23).

1.6. METODOS DE DETERMINACION DE LA PCR

Por muchos años se pensó que la PCR no estaba presente en el suero de individuos sanos; sin embargo, con el desarrollo de nuevos métodos más sensibles se encontró en forma normal.

Para detectar elevaciones significativas arriba de lo normal, los métodos que más comúnmente se han usado, son precipitación capilar y aglutinación en látex.

A través de los años se han desarrollado nuevas técnicas cuantitativas más sensibles como: electroinmunoensayo, inmunodifusión radial, nefelometría, radioinmunoensayo e inmunoturbidimetría, las cuales se han aplicado a la determinación de PCR (25).

a) Precipitación en capilar.

En un principio, esta técnica se utilizó para la determinación de PCR, aunque actualmente se considera lenta y de baja sensibilidad

b) *Aglutinación en látex.*

Las reacciones de aglutinación con antígenos solubles se llevan a cabo mediante el recubrimiento o acoplamiento del antígeno o del anticuerpo específico a un soporte corpuscular, como eritrocitos y partículas de látex. El látex es una suspensión de partículas esféricas de un polímero de poliestireno, que se utilizan como portadoras pasivas de polisacáridos y proteínas antigénicas solubles (7).

En la determinación de PCR, estas partículas se encuentran revestidas por anticuerpos específicos para esta proteína, y su encuentro con la PCR da lugar a la reacción de aglutinación. Esta prueba detecta hasta 10 microgramos de proteína por ml. Puede presentar reacción no específica causada por usar plasma y no suero, o bien, por suero lipémico (25, 32).

c) *Inmunolectroforesis.*

En esta técnica se identifica a las proteínas plasmáticas en base a sus propiedades electroforéticas y antigénicas. Primero se separan los componentes del suero por electroforesis y posteriormente se hacen reaccionar con sus anticuerpos correspondientes por inmunodifusión. Esta técnica se puede llevar a cabo en forma cualitativa, semicuantitativa y cuantitativa. En la determinación de PCR se utilizan anticuerpos específicos anti-PCR (25, 32).

d) *Radioinmunoensayo.*

Es una técnica que se basa en la reacción competitiva por los sitios de unión al anticuerpo específico, entre PCR marcada con un radioisótopo (125) y PCR no marcada. Al alcanzar el

equilibrio, la radioactividad producida se mide por centelleo en un contador gamma. Se requiere además, una preparación de la proteína para construir la curva estándar, y un sistema para separar la fracción ligada al anticuerpo de la fracción que no lo está. De la cantidad de antígeno marcado fijado a diversas concentraciones, puede construirse una curva que permita el cálculo de cualquier concentración desconocida de antígeno.

Este método puede detectar cantidades muy pequeñas, tales como 3 nanogramos de proteína por ml (32).

e) Nefelometría e Inmunoturbidimetría.

Estos métodos se basan en el fenómeno de que la luz, al pasar a través de un medio con partículas dispersas con un índice de refracción diferente al del medio, atenúa su intensidad por dispersión. En la turbidimetría, se mide la intensidad de la luz transmitida, es decir, la no dispersada por los complejos antígeno-anticuerpo. La nefelometría mide la turbidez de una solución de partículas que se forman por la reacción antígeno-anticuerpo, midiendo la luz dispersa en ángulo recto respecto al haz incidente sobre la celda de reacción (aunque no siempre es de esta manera la medición de la luz dispersa).

La intensidad de dispersión de luz es afectada por la concentración y el peso molecular del soluto y por la longitud de onda de la luz incidente.

En la nefelometría se pueden detectar concentraciones de PCR entre 10 - 100 microgramos por ml.

La inmunoturbidimetría es un método simple que no requiere de equipo costoso, además de ser rápido y sensible, ya que puede

detectar cantidades pequeñas de PCR, hasta de 1 microgramo por ml. Constituyendo esto ventajas frente a los otros métodos para cuantificar PCR (12, 32).

1.7. INFECCION INTRAUTERINA.

Se define como el establecimiento e invasión al feto en el útero, por agentes patógenos que atraviesan las barreras de defensa materna y del ambiente amniótico.

En general, el ser humano inicia su vida sin la menor capacidad para competir con agentes agresores y va desarrollando sus mecanismos de defensa progresivamente. En los primeros días de la vida intrauterina, contacto de un microorganismo con el embrión produce una lucha absolutamente desventajosa para éste, cuyas consecuencias son una enfermedad infecciosa seria con manifestaciones tan graves como malformaciones o muerte. Al paso de los meses, los efectos de un encuentro similar son diferentes: el producto cuenta ya con estructuras anatómicas y elementos funcionales que le permiten contrarrestar la acción dañina y limitarla a sus reales dimensiones patológicas y procesos inflamatorios.

1.7.1. Etiologías

Las infecciones en el niño durante el período fetal son provocadas por una variedad de bacterias, virus, hongos y parásitos. Los microorganismos coliformes y Staphylococcus aureus son la causa más frecuente de infecciones graves. E. coli es el agente etiológico más frecuente de la neumonía, septicemia, meningitis y diarrea del recién nacido. Otras bacterias patógenas relativamente frecuentes son el enterococo,

Klebsiella, Pseudomonas, Proteus y Salmonella. Listeria, monocytogenes y los estreptococos beta hemolíticos del grupo B (Streptococcus agalactiae) también causan daño al recién nacido (4, 14).

El neumococo, los estreptococos beta hemolíticos del grupo A y H. influenzae son causa poco frecuente de infección en las primeras semanas de vida.

Treponema pallidum es el microorganismo causante de la sífilis congénita, que se contrae a partir de la madre, en quien la infección suele ser latente.

Dentro de los agentes virales, los que más trascendencia tienen para el feto son el virus de la rubéola, Herpes simple (generalmente tipo 2, aunque ocasionalmente la infección es producida por el virus tipo 1), Coxsackie y el virus de la inclusión citomegálica (5, 29).

La toxoplasmosis congénita es causada por un parásito intracelular: Toxoplasma gondii.

En el caso de infecciones causadas por hongos, especialmente por Candida, pueden ocasionar una micosis al recién nacido al pasar por el canal del parto.

1.7.2. Patogenia

A. Factores predisponentes.

a) Factores inmunológicos.

Los mecanismos de defensa del recién nacido se encuentran muy pobres para enfrentar cualquier situación adversa. La respuesta celular después de las primeras 24 horas de vida se limita a un número reducido de una población ineficiente de leucocitos. Estos

tienen defectos en su respuesta a estímulos quimiotácticos. Los leucocitos polimorfonucleares presentan fagocitosis defectuosa y una capacidad bactericida reducida; además, tienen problemas de opsonización y deficiencia de algunos componentes del complemento. Por lo tanto, las deficiencias en quimiotaxis, combinadas con defectos de opsonización, fagocitosis y muerte intracelular, permiten el establecimiento, invasión rápida, multiplicación y diseminación bacteriana. Por otra parte, los neonatos tienen una limitada respuesta humoral caracterizada inicialmente por producción de anticuerpos IgM (29).

b) Factores maternos.

La raza, el nivel socioeconómico, el estado de salud y la flora vaginal en el momento del nacimiento, son factores importantes en la incidencia de infecciones en neonatos.

Una elevada frecuencia de infección en recién nacidos se encuentra asociada con varios factores como: ruptura prematura de membrana, sobre todo si tiene más de 24 horas, amnionitis materna y labor prematura y prolongada. También la colonización materna con algunos agentes infecciosos puede predisponer a infección en el recién nacido. (4)

B. Vías de diseminación.

La infección intrauterina puede ser el resultado de dos vías de diseminación, la hematógena y la ascendente.

La infección adquirida por vía hematógena inicialmente involucra la placenta, produciendo la típica lesión de villitis. Cabe señalar que a ese nivel, las células Hofbauer sirven como defensa inicial antimicrobiana.

a) *Vía hematógica.*

Esta vía es responsable de la mayoría de las infecciones prenatales, pero es poco significativa en las adquiridas durante el periodo prenatal. Los microorganismos son acarreados al espacio intervilloso de la placenta a través de la circulación materna y penetran a la circulación fetal.

La respuesta inmune fetal puede ser efectiva para limitar la infección a la placenta. Con frecuencia, la diseminación hacia el feto ocurre por la intervención del sistema sanguíneo fetal o por extensión desde la placenta a la membrana fetal con infección consecuente del fluido amniótico. En ciertas infecciones puede presentarse intervillositis y ruptura de microabscesos dentro de la circulación fetal (4,29).

b) *Vía ascendente.*

La infección ascendente por microorganismos presentes en la vagina o cérvix puede ocurrir a través de la membrana fetal intacta o comprometida, produciendo la típica lesión de corioamnionitis y el síndrome de infección del fluido amniótico. La actividad antimicrobiana de éste último sirve como la primera línea de defensa fetal.

En prematuridad, ruptura prematura de membrana, fiebre intraparto y sepsis perinatal, es frecuente la inflamación aguda de la membrana, lo cual es un importante factor de riesgo para corioamnionitis aguda. La histopatología de corioamnionitis muestra migración de leucocitos fetales y maternos a través de la cavidad amniótica, lo cual sugiere infección transcervical del fluido amniótico más que una infección primaria dentro de la

membrana fetal (4,29).

I.7.3. Manifestaciones clínicas.

Las infecciones graves que se observan más a menudo en los recién nacidos son: neumonía, septicemia, diarrea, meningitis y peritonitis. De éstas, las que se presentan con mayor frecuencia son neumonía y septicemia.

La neumonía, septicemia y enteritis estafilocócicas pueden aparecer en el recién nacido sin manifestaciones previas, pero de ordinario van precedidas de infecciones cutáneas que pueden consistir en pequeñas pústulas o furúnculos o en furúnculos mayores, celulitis, impétigo ampollar y onfalitis. La osteomielitis y la meningitis constituyen complicaciones frecuentes de la septicemia (5,33).

La meningitis provocada por Listeria monocytogenes produce infección por vía transplacentaria y el feto muere por lo general antes del nacimiento. En los que logran sobrevivir, la enfermedad puede manifestarse en el momento del nacimiento, o bien, hasta siete días después. Cuando ocurre inmediatamente después del nacimiento, es frecuente observar una coloración parduzca del líquido amniótico, los principales signos son: dificultad cardiorrespiratoria, diarrea, vómito, anorexia, letargia, petequias, ictericia e inestabilidad vasomotora (5,29).

Streptococcus agalactiae puede provocar una grave septicemia con neumonía, dificultades respiratorias y choque en el momento del nacimiento o en el primer día de vida extraútero.

En la sífilis congénita precoz, el niño puede parecer normal durante las primeras semanas o meses de vida. En un principio

aparecen síntomas generales como fiebre, anemia, intranquilidad, no hay aumento de peso, sin ninguna de las lesiones características de piel o mucosas, aunque en algunas ocasiones se producen erupciones locales. Las erupciones cutáneas pueden ser escasas o difusas, son rojizas y maculopapulosas, ocasionalmente pueden ser ampollares o circundadas y afectan las palmas de las manos y plantas de los pies. Puede presentarse una seudoparálisis característica (parálisis de Parrot) en uno ó varios miembros debida a alteraciones óseas de osteocondritis y periostitis sífilítica (5, 29, 33).

En el síndrome de la rubeola congénita los defectos permanentes más frecuentes son las cataratas, anomalías cardíacas, sordera y mutismo secundario, microcefalia y deficiencia mental. En las infecciones generalizadas intensas, la manifestación que se observa con mayor frecuencia en el nacimiento es el retraso en el crecimiento, especialmente en el peso, son frecuentes los defectos del esqueleto.

La varicela congénita puede manifestarse al nacer o aparecer a los pocos días en niños cuyas madres tienen una infección activa; en cambio, las infecciones adquiridas después del nacimiento en niños pequeños suelen ser leves.

La enfermedad de inclusión citomegálica congénita se adquiere por vía transplacentaria. Las manifestaciones más frecuentes son hepatomegalia, esplenomegalia, ictericia, anemia, trombocitopenia, púrpura y calcificaciones cerebrales.

El virus Coxsackie del grupo B puede originar una alteración infecciosa intrauterina generalizada, a veces mortal, o una neonatal. Puede causar encefalitis y miocarditis en el recién

nacido. El niño suele enfermar bruscamente, la mayor parte de las veces dentro de los primeros 10 días de vida, y ocasionalmente después de un breve episodio de diarrea y anorexia. Después se presenta taquicardia, disnea y cianosis, y son manifestaciones típicas la letargia, palidez grisácea y ligera ictericia. La temperatura está aumentada o descendida. El corazón, hígado y, a veces el bazo, están aumentados de tamaño.

En la toxoplasmosis congénita, las infecciones sufridas por el feto son el resultado de la adquisición materna de la infección por Toxoplasma gondii durante el embarazo. El feto infectado puede nacer muerto, ser prematuro o bien, a término, y manifestarse la enfermedad ya sea en el nacimiento o al cabo de algunos días. Los signos característicos de la toxoplasmosis incluyen: malestar, fiebre, erupción maculopapulosa, linfadenopatía, hepato y esplenomegalia, ictericia, hidrocefalia, microcefalia, microoftalmía y convulsiones (4, 5, 29, 33).

1.7.4. Signos clínicos.

a) De la madre.

En el período de parto pueden presentarse ciertos signos clínicos que indican la existencia de una infección intrauterina, tales como: fiebre (antes y/o durante el parto), leucorrea fétida e infección del tracto urinario.

Otros signos que se asocian con infección perinatal son: ruptura prematura de membrana, cérvix incompetente y parto prematuro inevitable (4, 33).

b) Del recién nacido.

-Insuficiencia respiratoria; apnea, cianosis, taquipnea, quejidos

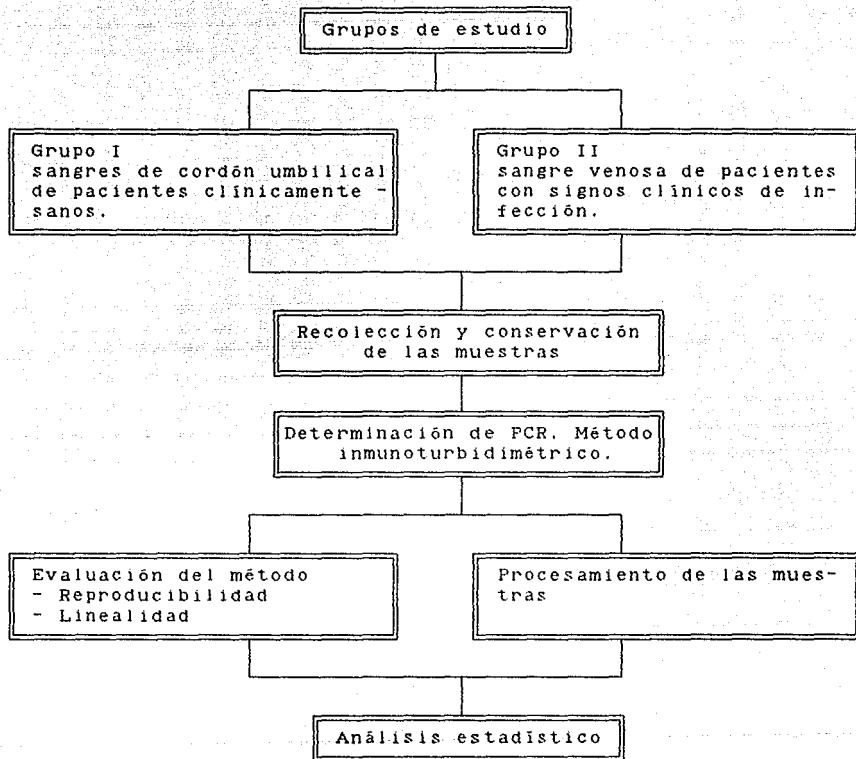
respiratorios, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda por membranas hialinas dañadas.

- Choque o caída repentina de los niveles de pH.*
- Acidosis metabólica.*
- Inestabilidad de la temperatura corporal.*
- Diarrea, distensión abdominal, vómito, anorexia.*
- Letargia.*
- Onfalitis.*
- Convulsiones.*
- Hepatomegalia.*
- Petequias o púrpura.*
- Irritabilidad general.*
- Ictericia.*

Las manifestaciones de la infección fetal dependen en gran medida de la edad gestacional en que se adquirió, produciéndose: aborto, prematurez, obito, enfermedad congénita e infección postnatal persistente (29, 33).

II. Parte experimental.

2.1. Diagrama de bloques



2.2. Grupos de estudio.

Se determinó PCR a 56 muestras de sangre de recién nacidos integrados en dos grupos. El grupo I se formó por 32 muestras de sangre de cordón umbilical obtenidas al momento del parto cumpliendo con los siguientes criterios de inclusión: 1) Ser bebés a término, 2) haber nacido mediante parto normal, 3) ser

hijos de madres sin ninguna complicación obstétrica durante el embarazo y al momento del parto, 4) madres sin enfermedad interrecurrente como lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide, las cuales elevan las concentraciones de PCR y 5) no presentar complicaciones en la primera semana de vida extraútero. El grupo II se integró con 24 muestras de recién nacidos, quienes se encontraban dentro de la primera semana de vida y cumplían con estos criterios de inclusión: 1) presentar signos clínicos de infección y 2) madres con complicaciones de tipo infeccioso durante el embarazo y/o durante el parto.

2.3. Toma y conservación de las muestras.

Para la obtención de las muestras de cordón umbilical, únicamente se ejerció presión sobre éste, recolectando la sangre en tubos de 16 X 150 mm estériles con tapón de rosca, dentro de la sala de partos.

En el segundo grupo se recolectaron las muestras de sangre por punción venosa en jeringas de 3 ml con agujas número 22, y se depositaron en tubos de 16 X 100 mm.

En ambos casos las muestras se dejaron coagular, separándose posteriormente el suero por centrifugación. Se fraccionaron en dos alícuotas cada uno de los sueros, manteniéndolas a 10°C hasta el momento de su uso.

2.4. Determinación de la PCR por el método Inmunoturbidimétrico.

Básicamente se hace reaccionar al antígeno (PCR presente en la muestra) con el anticuerpo (suero anti-PCR) y los complejos formados estabilizados con polietilenglicol se leen turbidimétricamente en el analizador centrífugo RA-1000 de

TECHNICON a una longitud de onda de 340 nm.

2.4.1. Construcción de la curva estándar de PCR.

Se realiza una curva de calibración con 6 estándares de concentraciones conocidas de PCR, y cualquier valor desconocido de PCR se calcula automáticamente por la lectura de la absorbancia. Los estándares se obtienen por dilución del calibrador, de una concentración original de 20 mg/dl, de la siguiente manera:

NIVELES DE CONCENTRACION DE P C R (mg / dl)	VOLUMEN DEL CALIBRADOR DE P C R (mcl)	VOLUMEN DE DILUYENTE DEL CALIBRADOR DE P C R (mcl)
0.0	0	200
1.0	10	190
2.5	25	175
5.0	50	150
10.0	100	100
20.0	200	0

2.4.2 Procesamiento de las muestras.

Tanto para los estándares de la curva de calibración como para las muestras cuyas concentraciones de PCR se desconocen, se procede de la siguiente manera: El analizador prepara automáticamente una dilución 1:15 de cada muestra depositando 25 microlitros de ésta y 345 microlitros de diluyente (que contiene polietilenglicol como estabilizador de la reacción que se lleva a cabo entre el antígeno y el anticuerpo) en la celda de reacción, seguido de un período de incubación de 4 minutos, enseguida se

depositan 30 microlitros de suero anti-PCR, se permite que transcurran 5 minutos más de incubación y entonces, se mide la absorbancia residual debida a la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Las concentraciones de PCR se calculan automáticamente por medio de las lecturas de absorbancia de la curva estándar.

2.5. Evaluación del método.

Se evaluó la reproducibilidad con 11 unidades interensayo a diferentes concentraciones. Se hicieron 22 alícuotas de cada uno de los estándares primarios de concentraciones conocidas (2, 4, 8, 16 mg/dl), 11 de las cuales se congelaron, para el análisis interensayo, hasta el momento de su uso. Las 11 restantes se estudiaron por duplicado en un mismo día para la evaluación intraensayo.

Para estudiar la linealidad del método, se utilizan estándares primarios de concentraciones conocidas y crecientes, determinando por duplicado la concentración de PCR a cada uno de ellos.

2.6. Análisis estadístico.

Se aplicó la T de Student para muestras independientes, utilizando como medida de tendencia central la media aritmética, y como medida de dispersión la desviación estándar (34).

III. Resultados.

Todos los integrantes del grupo control (N=32) fueron bebés a término nacidos mediante parto normal, de 2.5 a 3.0 Kg de peso. En todos ellos se obtuvo APGAR comprendido entre 9-10. Además se mantuvieron en observación en el transcurso de la primera semana de vida y su comportamiento fue totalmente normal.

En cuanto al grupo en estudio (N=24), se dividió en 4 subgrupos:

A) 10 presentaron meningoencefalitis y

B) 6 septicemia durante la primera semana de vida.

C) 5 provenían de madres con infección uterina al momento del parto y

D) los 3 restantes de madres que tuvieron infección uterina durante el embarazo.

3.1 Determinación de PCR.

Los resultados obtenidos durante la parte experimental de este trabajo se muestran a continuación.

La concentración de PCR determinada por el método inmunoturbidimétrico para cada uno de los individuos se encuentra expuesta en las siguientes tablas:

PACIENTE	CONCENTRACION PCR	PACIENTE	CONCENTRACION PCR
1	0.10	17	0.25
2	0.09	18	0.12
3	0.05	19	0.07
4	0.09	20	0.09
5	0.07	21	0.08
6	0.07	22	0.09
7	0.11	23	0.07
8	0.10	24	0.02
9	0.08	25	0.05
10	0.10	26	0.08
11	0.08	27	0.06
12	0.10	28	0.10
13	0.10	29	0.11
14	0.03	30	0.19
15	0.08	31	0.26
16	0.07	32	0.19

Tabla 1. Valores individuales de la concentración de PCR en el grupo control de recién nacidos sanos.

Las tablas 2, 3, 4 y 5 corresponden a los subgrupos del grupo II en estudio.

PACIENTE	CONCENTRACION PCR
1	6.50
2	5.48
3	5.62
4	3.99
5	8.00
6	15.79
7	11.89
8	7.53
9	3.63
10	2.41

Tabla 2. Valores de concentración de PCR en el subgrupo "A". Recién nacidos que presentaron meningoencefalitis.

PACIENTE	CONCENTRACION PCR
1	2.71
2	8.05
3	4.39
4	3.64
5	9.25
6	11.74

Tabla 3. Valores de concentración de PCR en el subgrupo "B"
Recién nacidos que presentaron septicemia durante la primera semana de vida.

PACIENTE	CONCENTRACION PCR
1	3.43
2	4.30
3	1.15
4	7.34
5	2.83

Tabla 4. Valores de concentración de PCR en el subgrupo "C"
Recién nacidos provenientes de madres con infección --
uterina al momento del parto.

PACIENTE	CONCENTRACION PCR
1	1.62
2	4.28
3	2.36

Tabla 5. Valores de concentración de PCR en el subgrupo "D"
Recién nacidos provenientes de madres con infección --
uterina durante el embarazo.

3.2 Evaluación del método.

Reproducibilidad. - Los coeficientes de variación obtenidos en la evaluación intraensayo fueron: 2.10% para la concentración de PCR de 2 mg/dl, 1.58% para 4 mg/dl, 1.54% para 8 mg/dl y 2.44% para 16 mg/dl.

En la evaluación interensayo se obtuvieron los siguientes coefi-

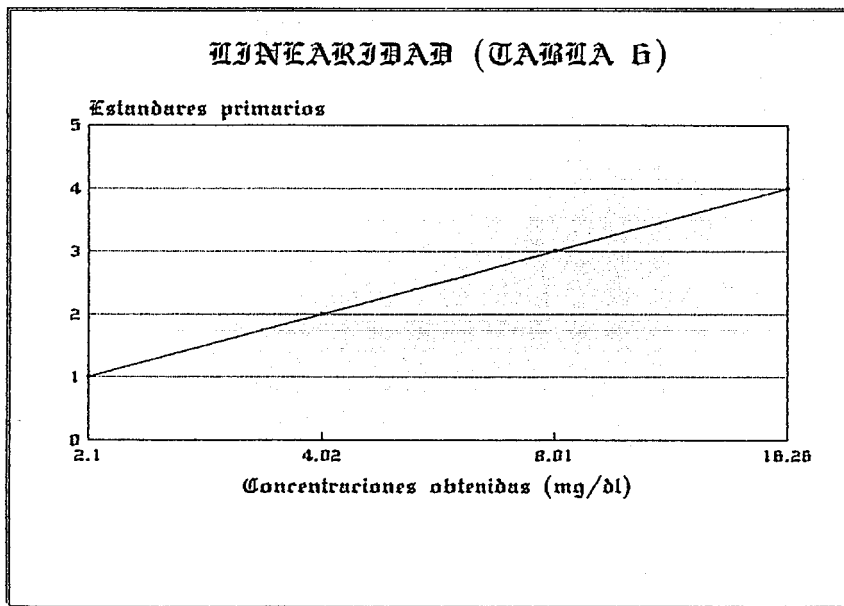
ESTA TESIS DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

cientes de variación: 1.80% correspondiente a la concentración de 2 mg/dl, 2.1% a 4 mg/dl, 1.89% a 8 mg/dl y 2.7% a 16 mg/dl.

Linealidad. - Los valores medios obtenidos en base a los estándares primarios fueron los siguientes.

CONCENTRACION PCR (mg/dl) estándares primarios	CONCENTRACION PCR (mg/dl) obtenidas
2	2.10
4	4.02
8	8.01
16	16.26

Tabla 6.- Linealidad



En la tabla número 7 se expone brevemente el tratamiento estadístico.- La diferencia en la concentración de PCR entre los dos grupos estudiados fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$)

Grupo	N	X	SD	P
I	32	0.098	0.054	< 0.001
II	24	5.75	3.645	

Tabla 7.- Tratamiento estadístico.

IV. Discusión de los resultados.

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína no específica de fase aguda cuyos niveles séricos se elevan en presencia de una variedad de desórdenes inflamatorios. Por lo tanto, la determinación de PCR sólo puede utilizarse como prueba presuntiva de algunas enfermedades, para detectar respuesta inflamatoria en pacientes de alto riesgo, o como un seguimiento a pacientes que se encuentran bajo tratamiento (28).

La determinación de PCR tiene importancia como marcador de infecciones post-quirúrgicas e infecciones ocultas en pacientes de alto riesgo. (28)

Evans y colaboradores (6) estudiaron el uso de la determinación de PCR en infecciones graves, como una ayuda en el manejo de embarazos complicados con ruptura prematura de membrana, por el desafío clínico que existe acerca del beneficio al feto de prolongar el embarazo, contra el incremento al riesgo de infección.

En este estudio se valoró la importancia que tiene la determinación de PCR en recién nacidos infectados. Analizando los resultados que se obtuvieron podemos darnos cuenta que las concentraciones de PCR para los grupos en estudio son notable y estadísticamente diferentes, y que ambos grupos poseen características clínicas distintas. Todos los pacientes del grupo control presentaron un comportamiento normal durante la primera semana de vida; en tanto que los pacientes del grupo infectado se involucraron en algún proceso de tipo infeccioso después de su nacimiento, manifestando problemas en la primera semana de vida extrauterina.

Algunos otros estudios apoyan el valor que tiene la PCR en infecciones de recién nacidos. Mahmond y colaboradores (16) compararon la determinación de PCR con otras pruebas de laboratorio (conteo total y diferencial de leucocitos, temperatura materna, latido cardíaco fetal, etc.) encontrando que la PCR es más sensible pero menos específica en la identificación de corioamnionitis clínica.

B. Shine y colaboradores (26), en un estudio sobre la utilidad de la determinación de PCR, encontraron que es un buen indicador de la presencia de infección en el periodo neonatal y que puede reemplazar otras pruebas de laboratorio como prueba presuntiva de infección.

Frederick Van Lente (28) menciona que los niveles de concentración de la PCR se elevan más rápido que otras proteínas de fase aguda, en respuesta a un desorden inflamatorio; 48 a 72 horas después de iniciarse el proceso, aparecen niveles pico de PCR.

Algunos otros autores como Ben Gershóm, Corall y Peltola (3) recomiendan el uso de la determinación de PCR para ayuda, tanto en el diagnóstico de meningitis en neonatos e infantes, como en el seguimiento de la enfermedad.

Los resultados de concentración de PCR para el grupo control se encuentran por debajo de 1 mg/dl. En algunos estudios realizados (1, 6, 17, 24) consideran valores de referencia de PCR hasta de 2 mg/dl. Si se toma en cuenta que los integrantes del grupo control cumplieron con los criterios de inclusión establecidos, se pueden considerar sus valores (0-1 mg/dl) como referencia para el tipo de población estudiada. Cabe hacer notar que para los valores muy cercanos al valor de referencia establecido se necesita el

apoyo de otros datos clínicos para su consideración.

Para la realización de este trabajo experimental se utilizó sangre de cordón umbilical en el caso del grupo control y sangre venosa para el grupo infectado, la razón de esta diferencia fué para no tener que causar un traumatismo a los recién nacidos que no tenían ningún antecedente de estar infectados y, además, porque durante la primera semana de vida no se les realizó ninguna punción sanguínea.

Algunos autores (26) han comprobado que la PCR no cruza la barrera transplacentaria y que, por lo tanto, los niveles maternos son independientes de los del feto, aunado esto a que la circulación de PCR es endógena. Lo anterior puede apoyar el hecho de poder hacer estudios comparativos entre sangre venosa del neonato y sangre de cordón umbilical.

Acerca de la reproducibilidad del método empleado, se encontró que los coeficientes de variación para cada concentración de PCR ensayada, intraensayo e interensayo, son muy cercanos; esto indica que la variabilidad fue semejante. Además, como el coeficiente de variación expresa a la desviación estándar como un porcentaje de la media [$cv=s/x(100)$] (33), sus valores pequeños demuestran que existe poca dispersión entre los resultados obtenidos.

El conocimiento de los estándares primarios como muestras problema, indicaron una linealidad de la técnica de 2 a 16 mg/dl. Se han descrito muchos métodos para llevar a cabo la determinación de PCR, tales como precipitación en fluidos (en tubos y en capilares), precipitación en gel (métodos modificados de Ouchterlony, Oudin, Mancini, electroforesis en gel de agarosa,

electroinmunodifusión), fijación de complemento, aglutinación en látex, anticuerpos fluorescentes, radioinmunoensayo. Los primeros tienen valor académico únicamente, por ser lentos, sofisticados y poco sensibles; otros, como la fijación de complemento y la aglutinación en látex tienen una mayor sensibilidad, sin embargo, la última mencionada es una técnica más sencilla (25). En cuanto a técnicas más sensibles, los anticuerpos fluorescentes no se utilizan para pruebas de rutina, y únicamente se emplean en la detección de PCR en tejidos.

El radioinmunoensayo detecta cantidades muy pequeñas de nanogramos de PCR, sólo que es una técnica sofisticada y costosa. Comparando la técnica inmunoturbidimétrica con otras, se puede uno percatar que tiene una alta sensibilidad, aunque no semejante a los anticuerpos fluorescentes y al radioinmunoensayo, al mismo tiempo que es un método simple y no muy costoso si se adapta a un espectrofotómetro convencional.

CONCLUSIONES.

La técnica inmunoturbidimétrica, utilizada en el presente trabajo, es útil para la determinación de PCR en sangre obtenida de cordón umbilical de recién nacidos.

Con este estudio se demostró que la técnica inmunoturbidimétrica es adecuada para la determinación de la concentración de PCR, la cual tiene valores diferentes entre los dos grupos de estudio, comprobando la utilidad de esta prueba en el diagnóstico de infección intraútero.

La sensibilidad de la técnica es adecuada para apoyar el diagnóstico de infección en los recién nacidos.

Bibliografia.

- 1.- Aimbender E., M.D., Cabatie E.E., M.D., Guzmán D.M., M.D..
Serum C - reactive protein and problems of newborn infants.
J Pediatr. - 101/3/438-440. (1982).
- 2.- Arcon R., Gualaudi G. - Identification of sequences
responsible for acute phase induction of human C-reactive
protein. - *Nucleic Acids Res.* 16/3195-3207. (1988).
- 3.- Ben Gershöm F., Briggeman G.J., Zegher F. - Cerebrospinal
fluid C-reactive protein in meningitis: diagnostic value and
pathophysiology. *Eur J Pediatr.* 145/246-249. (1986).
- 4.- Brunham R. C., Holmes K. K., Eschenbach D..
*APPROACH TO SPECIAL CLINICAL PROBLEMS IN REPRODUCTION AND
PERINATOLOGY.*
2nd edition.
Mac Graw Hill.
San Francisco. (1985).
- 5.- Cloherty J.P., M.D., Stark R.M.D.. -
MANUAL OF NEONATAL CARE.
3rd edition.
Little Brown and Company.
Boston. (1980).
- 6.- Evans M.I., Hajj S.N., Devoe L.D., et al.: C-reactive protein
as a predictor of infection morbidity with premature rupture
of membranes. - *Am J Obstet Gynecol.* - 138/648-652. (1980).

- 7.- Funderberg H.H., Stites D. P., Stobo J.D., Wells J. V.,
 INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA.
 4a edicion.
 El manual moderno.
 México, D.F. (1983).
- 8.- Gotschlich E. C..- C-reactive protein.- A historical
 Overview.- structure of human CRP.- *Ann Ny Acad Sci.* 557/9-
18. (1989).
- 9.- Hansen B., Gewurz H..- Further studies of the binding of C-
 reactive protein (CRP) to human lymphocytes: development of a
 radioassay and requirement for a multivalent binding
 specificity, *Fed Proc.* 39/945-948. - (1980).
- 10.- Hawrylyshyn P., Bernstein P., Milligan J. E., Soldin S.,
 Pollard A., Chir B., Papsin F. R..- Premature rupture of
 membranes: the role of C-reactive protein in the prediction
 of chorioamnionitis. *Ann J Obstet Gynecol.* 147/240-242.
 (1983)
- 11.- Kaplan M. H..- C-reactive protein: Retation to disease and
 pathological significance.- *Ann N. Y. Sci.* 389/419-422.
 (1982).
- 12.- Kapmeyer W. Grenner G., Becker W..- The nephelometric
 determination of C-reactive protein, antiestreptolysin O
 and rheumatoid factors by latex agglutination tests. *Clin*
Chem. 29/1189-1191. (1983).
- 13.- Kilpatrick J. M., Virella G..- Inhibition of platelet
 activating factor by rabbit C-reactive protein.
Clin Immunopathol. 37/276-279. (1985).

- 14.- Klaus J., Fanardff F..
 CARE OF THE HIGH-RISK NEONATE.
 2nd edition.
 W. B. Saunders Company.
 Philadelphia. (1980).
- 15.- Li J. J., Mc Adam K. P., Bausserman L. L.- The regulation
 role fo acute phase reactants on human immune responses. *Ann
 N. Y. Acad Sci.* 389/456. (1989).
- 16.- Mahmond A. I., Zinamau M. J., Lowensohn R. I., Moawad A.
 H.- significance of C-reactive protein levels in women with
 premature rupture of membranes. *Ann J Obstet Gynecol.*
151/15: 541-544. (1985).
- 17.- Mathers N. J., Pohlandt f.- Diagnostic audit of C-reactive
 protein in neonatal infection. *Eur J pediatr.* 146/147-151.
 (1987).
- 18.- Mc Carty Macllyn.- Historical perspective on C-reactive
 protein. *Ann N. Y. Sci.* 389: 1-10. (1982).
- 19.- Mold C., Du Clos T. W., Nakayama S., Gewurz H.- C-reactive
 protein reactivity with complement and effects on
 phagocytosis. *Ann N. Y. Acad Sci.* 389: 235-249. (1982).
- 20.- Morley J. J., Kushner I.- Serum C-reactive protein levels
 in disease. *Ann N. Y. Acad Sci.* 389: 406-417. (1982).
- 21.- Moshage H. J., Roelof H. M., Felt J. F., Hazenberg B. P. C.,
 Leeumen M. A., Limburg P. C., Harden L. A.- The effect of
 interleukin-1, interleukin 6 and it's interrelationship of

- serum amyloid A and C-reactive protein in primary cultures of adult human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Comm.* 155/1: 112-117. (1988).
- 22.- Pepys M. B. - C-reactive protein fifty years on. *Lancet.* 21: 653-657. (1981).
- 23.- Romen Y., M. D., Artal R., M. D. - C-reactive protein as a predictor for choriamnionitis in cases of premature rupture of the membrans. *Ann J Obstet Gynecol.* 150: 546-550. (1984).
- 24.- Romen Y., M. D., Artal R., M. D. - C-reactive protein in pregnancy and in the post-partum period. *Ann J obstet-Gynecol.* 151/3: 380-383. (1985).
- 25.- Rose N.R., Friedman H.
- MANUAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY.
- 2nd edition.
- American Society for Microbiology.
- Washington, D. C. (1980).
- 26.- Shine B., Gould J., Campbell C., Hindocha P., Wilmont R. P., Wood C. B. S. - Serum C-reactive protein in normal and infected neonates. *Clin Chim Acta.* 148 : 97-103. (1985).
- 27.- Tucci A., Goldberg G., Whitehead A. S., Kay R. M., Woods D. E., Colten H. R. - Biosynthesis and postsynthetic processing of human C-reactive protein. *J. Immunol* 131: 2416-2419. (1983).
- 28.- Van Leute F. - The diagnostic utility of C-reactive protein. *Hum pathol.* 13/12 : 1061-1063. (1982).

29. - Vaughan V. C., Mc Kay R. J., Nelson W. E..

TRATADO DE PEDIATRIA.

7a edicion.

Litio Ediciones Olimpica, S. A.

México, D. F. (1981).

30. - Vigo C. - Effect of C-reactive protein on platelet activating factor induced platelet aggregation and membrane stabilization. *J. Biol Chem.* 260 : 3418-3422. (1985).

31. - Volanakis J. E., Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann N. Y. Acad Sci.* 389 : 235-249. (1982).

32. - Wadsworth Ch., Wadsworth E. - Efficacy of látex agglutination and quantification methods for determination of C-reactive protein (CRP) in pediatric sera. *Clin Chim Acta.* 138 : 309-318. (1984).

33. - Youmans G. F., Paterson P. Y., Sommers H. M..

MANUAL DE INFECTOLOGIA.

2a edicion.

Nueva editorial interamericana, S.A. de C.V.

México, D. F. (1982).

34. - Wayne W. Daniel. - Bioestadística. 1a edicion. Editorial Limusa. México, D. F. (1985).