



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA - INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA:  
IDENTIFICACIÓN DE INFECCIONES CONGÉNITAS  
A TRAVÉS DE LAS CONCENTRACIONES DE  
IgA, IgM O IgE TOTALES EN SALIVA DE  
NEONATOS

## **T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CLÍNICAS**  
P R E S E N T A:  
**CD. E.E.P. SANDRA PINEDA MARTÍNEZ**

TUTORA:

**DOCTORA MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN**  
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA EXPERIMENTAL, SUBDIRECCIÓN DE MEDICINA  
EXPERIMENTAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, SECRETARÍA DE  
SALUD, MÉXICO. PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD, UNAM.

MÉXICO, D. F. JUNIO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO:**

**PRESIDENTE:** DR. JAVIER PORTILLA ROBERTSON

**SECRETARIA:** DRA. ELBA ROSA LEYVA HUERTA

**VOCAL:** DRA. MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN

**1er. SUPLENTE:** DR. LUIS ALBERTO GAITÁN CEPEDA

**2do. SUPLENTE:** DRA. MARÍA ESTHER IRIGOYEN CAMACHO

SITIO DONDE SE DESARROLLO LA INVESTIGACIÓN:

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA EXPERIMENTAL

**TUTORA:** DRA. MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN

**ALUMNA:** SANDRA PINEDA MARTÍNEZ

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Inmunología Experimental, con la colaboración de los servicios de Neonatología, Infectología, Neurología y los laboratorios de Neurodesarrollo y de Errores Innatos del Metabolismo del Instituto Nacional de Pediatría, así como el servicio de tococirugía del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

El proyecto fue parcialmente financiado por el Fondo FOSISS-CONACyT, Convenio proyecto 69666.

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas sin cuya colaboración este trabajo no hubiese sido posible. A riesgo de omitir a algunos; se los dedico con todo mi cariño a:

Dios

Mi familia y amigos

Tutora Dra. María Dolores Correa Beltrán, Directora de Investigación Instituto Nacional de Pediatría (INPed)

Biólogo José Luis Hernández Islas, LIE INPed

Médico Pediatra infectóloga Blanca Luz Tecuatl Herrada, LIE INPed

EBC Sandra Murrieta, LIE INPed

Bióloga Ana Laura Castañeda, LIE INPed

Bióloga Esther Calderón Segura, LIE INPed

M en C. Claudia Patricia Rico, LIE INPed

M en C. Alejandro Besné, LIE INPed

Medico Liliana Hernández, LIE INPed

Dra. Marcela Vela Amieva, Responsable del Proyecto 002/2008 INPed

Dra. Mercedes Macías, médico adscrito al servicio de Infectología, INPed

Dr. Carlos López-Candiani, Jefe del servicio de Neonatología, INPed

Dra. Gloria Hernández, Médico adscrito al servicio de Neurología, INPed

Dra. Mónica Escobedo, Médico adscrito al servicio de tococirugía, Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Ricardo Figueroa, Médico adscrito al servicio de perinatología, Instituto Nacional de Perinatología.

## Contenido

<b>1. Resumen .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>7</b>
<b>3. Marco teórico.....</b>	<b>7</b>
3.1. Infecciones congénitas.....	7
3.1.1. Agentes etiológicos.....	8
3.1.2. Manifestaciones clínicas .....	9
3.1.3. Diagnóstico.....	10
3.2 Inmunoglobulinas.....	11
3.3 Inmunoglobulinas como biomarcadores de infecciones congénitas .....	13
3.4 Saliva .....	13
<b>4. Planteamiento del problema .....</b>	<b>15</b>
<b>5. Pregunta de investigación .....</b>	<b>16</b>
<b>6. Justificación .....</b>	<b>16</b>
<b>7. Objetivo general .....</b>	<b>16</b>
7.1 Objetivos directos .....	17
7.2 Objetivo indirecto .....	17
<b>8. Metodología.....</b>	<b>17</b>
8.1 Tipo de estudio.....	17
8.2 Población.....	17
8.3 Criterios de selección .....	17
8.4 Estándar de Referencia .....	18
8.5 Tamaño de la muestra.....	18
8.6 Definiciones operacionales .....	19
8.7 Descripción General del Estudio .....	19
8.8 Métodos de recolección de muestras.....	21
8.9 Determinación de concentración de IgM, IgA e IgE .....	21
8.10 Métodos de registro y procesamiento .....	23
<b>9. Consideraciones éticas .....</b>	<b>24</b>
<b>10. Resultados.....</b>	<b>24</b>
<b>11. Discusión .....</b>	<b>36</b>
<b>12. Conclusiones .....</b>	<b>39</b>
<b>13. Referencias.....</b>	<b>40</b>

## 1. Resumen

**Introducción:** Existe evidencia de que la IgM y la IgA en suero de cordón umbilical se elevan cuando existe infección congénita (IC) e inclusive podría ser que aparezca IgE; por otro lado, se desconocen las concentraciones basales de estas inmunoglobulinas (Igs) en saliva de neonatos y si las IC inducen incremento de su concentración. El objetivo de este trabajo fue validar una prueba diagnóstica no invasiva, basada en concentraciones anormalmente altas de IgA, IgM o IgE totales en saliva, para la identificación de IC.

**Métodos:** Nuestra población fueron neonatos nacidos en el Instituto Nacional de Perinatología o el Hospital General Dr. Manuel Gea González y pacientes del Servicio de neonatología del Instituto Nacional de Pediatría, reclutados en el periodo de Julio del 2011 a Julio de 2013. Se realizaron ELISA's de captura, para obtener la concentración de Igs. Se usó un constructo clínico y pruebas de laboratorio específicas, como estándar de referencia para el diagnóstico de IC de siete agentes etiológicos (*T. gondii*, *T. pallidum*, CMV, rubéola, parvovirus B19, VHC y VHB). Se recolectaron muestras pareadas de suero y saliva de 61 neonatos para IgA e IgM y 48 para IgE. Las concentraciones de las Igs no presentaron distribución normal, por lo que se realizaron curvas ROC para establecer puntos de corte. Se calculó el coeficiente de Spearman para determinar la correlación de las concentraciones de Igs entre las muestras de suero y de saliva.

**Resultados:** El punto de corte para IgA fue de 80 µg/mL en suero y de 10 en saliva; para IgM fue de 600 y 1 en suero y saliva respectivamente; y para IgE en suero fue de 1 y en saliva 0.7 µg/mL. Hubo una buena correlación para la IgA entre los dos tipos de muestra ( $r_s = 0.602$   $P < 0.05$ ); mientras que no la hubo para la IgM ni la IgE. Se identificaron ocho casos de IC (seis por *T. gondii* y dos por citomegalovirus). La sensibilidad de la prueba para IgA en suero fue de 75%, La IgA en saliva e IgM en suero fue del 62%, para IgM en saliva e IgE en ambas muestras la sensibilidad fue menor al 50%. Se identificaron casos con alteraciones neurológicas en 12 neonatos (dos de ellos presentaron IC por *T. gondii*).

**Conclusiones:** La cuantificación de IgA en saliva podría ser una alternativa sólo cuando no es posible obtener sangre periférica. Las altas concentraciones de IgA, IgM o IgE, no son necesariamente indicativas de IC y pueden deberse a la exposición del feto y el recién nacido a otros antígenos. La toxoplasmosis surgió como la infección congénita más frecuente.

## 2. Introducción

Los padecimientos infecciosos que afectan al ser humano durante el periodo perinatal, son un problema de Salud Pública, de grandes dimensiones debido a los efectos que producen en las mujeres gestantes, al incrementar la frecuencia de abortos, retrasar el crecimiento intrauterino o provocar partos prematuros; y por las complicaciones derivadas de estos procesos, que van desde productos de bajo peso al nacer, hasta aquellos con afectaciones principalmente neurológicas, oftalmológicas o auditivas; de tal manera que pueden presentar discapacidad de por vida.<sup>1-5</sup>

La madre adquiere la infección por diversas vías *horizontales* y puede transmitirla *verticalmente* al producto en cualquier momento de la gestación, sea por vía transplacentaria, al momento del parto o durante el primer mes de vida del bebé a través de la lactancia.<sup>6,7</sup> La gravedad de las manifestaciones en el recién nacido, va a depender de la dosis y virulencia del agente infeccioso, así como de la susceptibilidad genética y la edad gestacional al momento de la transmisión.<sup>2,3</sup>

Una acción del Sistema Nacional de Salud, es el Programa de Tamiz Neonatal el cual, tiene el objetivo, de evitar la discapacidad en los niños, pues permite detectar oportunamente casos de problemas congénitos subclínicos y mantener un seguimiento cercano; sin embargo, actualmente se limita a un grupo reducido de enfermedades, ninguna de ellas de origen infeccioso.<sup>8,9</sup>

Actualmente, la mejor manera de identificar los casos subclínicos de diversas infecciones congénitas, mediante pruebas de laboratorio, en las que se utilizan muestras de suero o sangre embebida en papel filtro para demostrar la presencia de anticuerpos específicos de clase IgA o IgM.<sup>10-13</sup> Esto implica realizar venopunción y en consecuencia, los riesgos derivados de ésta, como infección o hemorragia, además de provocar dolor. Debido a que la saliva representa una muestra biológica que puede tomarse en forma no invasiva, en este proyecto se planteó utilizar esta muestra para el diagnóstico presuntivo de infección congénita, mediante la identificación de alteraciones en las concentraciones de IgA, IgM o IgE de neonatos, para hacer de ésta una prueba diagnóstica no invasiva.

## 3. Marco teórico

### 3.1. Infecciones congénitas

En México, los datos sobre la prevalencia de las infecciones congénitas son escasos, si bien se cuenta con un cálculo de entre 0.2 y 1.0% global, con base en la frecuencia encontrada en mujeres embarazadas, la tasa de transmisión, la versión ejecutiva de morbilidad de la Dirección General de Epidemiología y trabajos de

investigación sobre la detección de casos de infección por CMV, *Toxoplasma gondii* y *Treponema pallidum*.<sup>14-20</sup>

La determinación de la prevalencia o la incidencia, se dificulta debido a que muchos niños con infección prenatal son asintomáticos al nacimiento y las secuelas de infección pueden aparecer a los pocos meses o incluso después de varios años de vida, cuando la asociación con la infección perinatal es difícil de establecer.<sup>1, 21</sup>

### 3.1.1. Agentes etiológicos

Se ha demostrado que los agentes patógenos, que infectan a la mujer durante el periodo gestacional, pueden ocasionar daño al producto; se mencionan principalmente virus, bacterias o parásitos. En el **cuadro 1** se puede observar un listado de algunos de estos agentes, entre ellos los descritos dentro del grupo TORCH que incluyen a *Toxoplasma gondii*, Otros como *Treponema pallidum*, Rubéola, Citomegalovirus y Herpes simple tipo 1 o 2.<sup>22-25</sup> También existen reportes de otros microorganismos, que pueden transmitirse congénitamente, o ser causa de un cuadro de sepsis neonatal; tal es el caso de los virus de hepatitis B y C, el virus de la inmunodeficiencia humana, el parvovirus B19, la bacteria *Streptococcus agalactiae*, o los parásitos de los géneros *Plasmodium* y *Trypanosoma*.<sup>26-30</sup>

**Cuadro 1.** Agentes patógenos que pueden producir infección congénita

<b>Virus</b>	<b>Bacterias y parásitos</b>
Citomegalovirus	<i>Borrelia burgdorferi</i>
Hepatitis B y C	<i>Listeria monocytogenes</i>
Herpes simple 1 y 2	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Parvovirus B19	<i>Treponema pallidum</i>
Rubéola	<i>Plasmodium sp</i>
Varicela-zóster	<i>Toxoplasma gondii</i>
Virus de Epstein-Barr	<i>Trypanosoma cruzi</i>

Modificado de Correa-Beltrán MD, Castillo-Cruz RA, Figueroa-Damián R, Noyola DE. Infecciones congénitas: TORCH y varicela zóster. Neonatología, Esencia, Arte y Praxis. McGraw Hill México D.F. 2011. pp. 414.

### 3.1.2. Manifestaciones clínicas

El cuadro clínico de las infecciones congénitas, normalmente depende del agente etiológico, así como del momento durante el embarazo en el cual ocurre la transmisión; siendo más severo en los primeros meses y comúnmente silencioso si sucede al final, por lo que la infección no se detecta y sólo se diagnostica de manera retrospectiva, cuando aparecen las primeras manifestaciones de secuelas, como daño visual, sordera o alteraciones neurológicas. A manera de ejemplo, en el **cuadro 2** se muestran los signos comunes y patognomónicos de las infecciones congénitas por TORCH, los cuales son heterogéneos, aunque pueden coincidir entre dos o más agentes.<sup>1,2,22,31</sup>

**Cuadro 2.** Principales manifestaciones clínicas de los cinco agentes etiológicos más frecuentes de infección congénita

Desenlace clínico	Grado de asociación con el agente:				
	Toxoplasmosis	Sífilis	Rubéola	CMV	Herpes
Microencefalopatía	2	0	1	3	1
Meningoencefalitis	2	1	2	1	4
Calcificaciones intracraneales	3	0	0	3	0
Hidrocefalia	3	0	1	1	1
Sordera	1	3(tardía)	4	3	0
Coriorretinitis	4	2	4	2	2
Cataratas	1	0	4	0	1
Microftalmia	1	0	3	0	0
Queratoconjuntivitis	0	1	0	0	3
Glaucoma	0	1	3	0	0
Atrofia óptica	2	1	1	2	0
Petequias - Púrpura	1	2	3	4	2
Erupción vesicular	0	0	0	1	3
Erupción maculopapular	1	4	0	0	1
Heptoesplenomegalia	3	3	3	3	3
Ictericia	3	3	3	3	3
Lesiones óseas	1	4	3	0	0
Retardo en el crecimiento	2	1	4	4	0
Enfermedad congénita del corazón	0	0	4	0	0
Miocarditis	1	0	2	0	1
Neumonía	1	1	1	3	1

0: presente en raras ocasiones; 1: presente en ocasiones; 2: presente con frecuencia; 3: muy frecuente; 4: Característico.

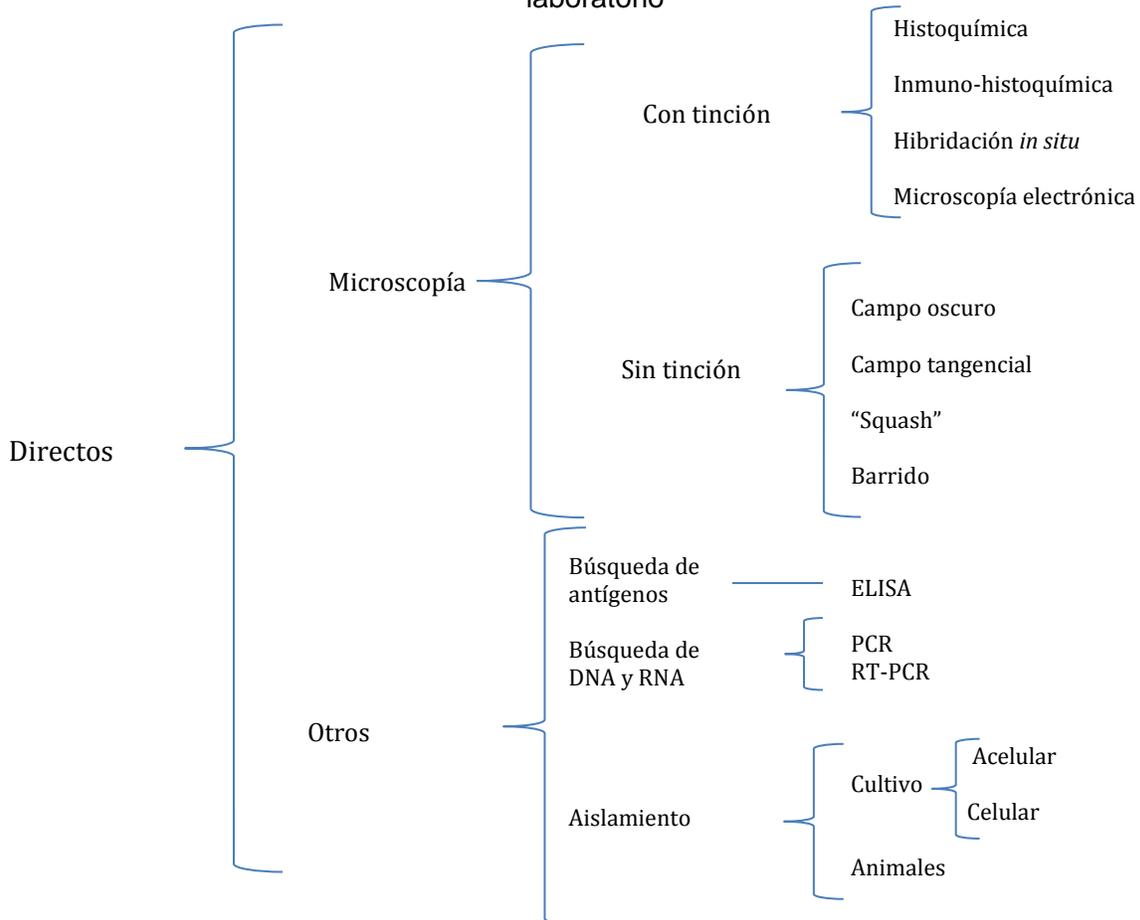
Modificado de Correa-Beltrán MD y cols.

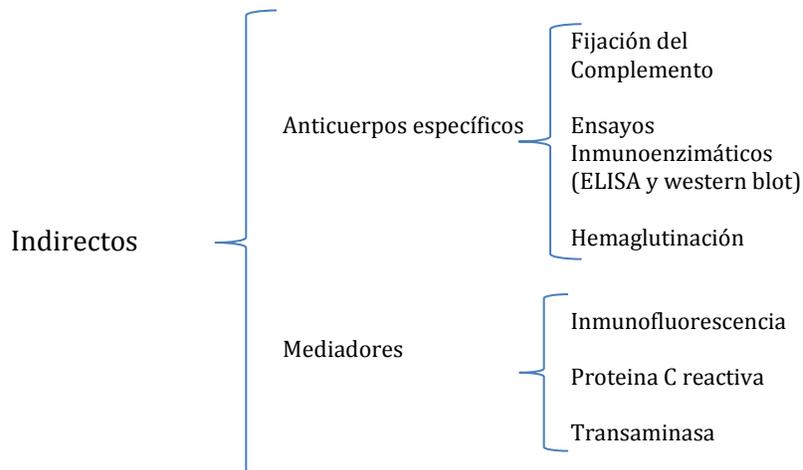
### 3.1.3. Diagnóstico

Si bien las manifestaciones clínicas pueden orientar al diagnóstico de las infecciones congénitas, varios agentes pueden ocasionar signos similares; existen varios patógenos que pueden provocar los problemas descritos en el **cuadro 2**, por ejemplo, el diagnóstico diferencial de todo recién nacido con hepato-esplenomegalia, ictericia y petequias, así como con anemia y trombocitopenia, debe incluir la infección congénita por citomegalovirus, rubéola, sífilis, toxoplasmosis, eritroblastosis fetal, infección por herpes simple, septicemia y enfermedad metabólica; el diagnóstico se complica aún más en las infecciones subclínicas. Por lo anterior, es muy importante que se cuente con la identificación correcta y oportuna del agente etiológico para el tratamiento adecuado de los niños.<sup>3,6,24,32</sup>

Según se hayan reconocido adecuadamente las manifestaciones clínicas que presenten la madre, el feto o el neonato y con el conocimiento de la historia natural de la enfermedad causada por el agente o agentes más probables, los estudios de laboratorio serán de gran apoyo para establecer el diagnóstico; se pueden utilizar métodos directos e indirectos para la identificación del o los agentes causantes de la infección. Los métodos más utilizados se presentan en el **cuadro 3**.<sup>33</sup>

**Cuadro 3.** Métodos directos e indirectos para la identificación de agentes infecciosos en laboratorio





La integración del diagnóstico depende de la presencia de signos y síntomas producidos por el probable agente causal, la experiencia clínica del médico, así como de los resultados de los estudios de laboratorio y de gabinete (tomografías, radiografías, resonancias magnéticas o ultrasonidos); es frecuente la utilización de varios procedimientos ya sean directos o indirectos para diagnosticar si hay peligro de transmisión vertical o para refinar un diagnóstico.

### 3.2 Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son moléculas de la inmunidad humoral y una de sus principales funciones fisiológicas es la defensa contra los microorganismos y las toxinas producidas por los distintos agentes microbianos.<sup>34</sup> La determinación de estas inmunoglobulinas contribuye significativamente al diagnóstico de diversas enfermedades, especialmente las infecciosas. Cuando un ser humano nace, ya cuenta con inmunoglobulinas en sangre; las de clase IgG son el resultado de la mezcla de anticuerpos de la madre transferidos por medio de receptores específicos de la porción Fc de la IgG (FcRn) en las vellosidades coriónicas y aquellos sintetizados por el feto ante antígenos maternos o extraños, que cruzaron la placenta (al formar parte de complejos inmunes IgG materna-antígeno) o ante una infección activa del feto.<sup>35</sup>

En este estudio, las inmunoglobulinas de clase A, M y E fueron de nuestro interés, ya que son exclusivamente el resultado de la respuesta del feto ante un antígeno, pues ninguna de ellas atraviesa la barrera placentaria. En el **cuadro 4** se muestran los valores basales reportados en la literatura para IgA e IgM en recién nacidos, todos menores de un día de edad, en donde se puede observar que existe una amplia variabilidad, atribuible probablemente a diversos factores, como diferencias en los tamaños de muestra, el estado de salud de los pacientes, las zonas geográficas donde se realizaron los estudios (por lo tanto diferentes poblaciones) y el origen de la muestra: cordón umbilical o talón. Es importante mencionar que las técnicas empleadas fueron muy diversas; en algunos estudios utilizaron comerciales y en otras estandarizadas en los laboratorios donde se llevaron a cabo los proyectos. Asimismo, el manejo de las muestras previo a la determinación varió entre un estudio y otro.

**Cuadro 4. Concentraciones de IgA e IgM**

n	Fuente de la muestra	Estado de Salud	IgA (µg/ml)	IgM (µg/ml)	Técnica usada	Manejo de las muestras y otras observaciones	Autor, País, año; referencia
1500	Sangre en Papel filtro	Población abierta	Promedio 2.0	Promedio 29.3	ELISA de captura de antígenos (casera)	Gotas de sangre de cordón sobre papel filtro, se dejó secar, se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento	Hernández-islas/Vela-Amieva et al en preparación; 36
50	Suero de cordón	Aparentemente sanos	Promedio 23.0 Max-min (14-36)	Promedio 130.0 Max-min (63-250)	Nefelometría (comercial)	Suero fraccionado y procesado una hora después	Jolliff, Estados Unidos, 1982; 37
1714	Suero de Talón	Población abierta (14 infectados por CMV o <i>T. gondii</i> )	Promedio 25.0	Promedio 120.0	Inmunodifusión radial y Contraímmunoelectroforesis (caseros)	Suero usado en pocas horas después de ser obtenido IgM: Se tomó el promedio de 1714 casos más bajos de 2029 tamizados. Hubo un grupo de 286 con valores "intermedios" de 200 a 500 ug/mL.	McMurray, Colombia, 1981;11
1500	Suero de cordón	Población abierta	Promedio 32.7	Promedio 94.0	ELISA de captura de antígenos (casera)	Suero fraccionado y congelado hasta la medición	Hernández-islas/Vela-Amieva et al en preparación; 36
600	Suero de cordón	Población abierta (28 infectados por bronconeumonía y sepsis)	Máximo 50.0	Máximo 130.0	Turbidez de una reacción de precipitación (no menciona si es comercial o casera)	Suero fraccionado y congelado hasta la medición	Ferrer, Cuba, 1998; 10
54	Suero de cordón	Población abierta, de bajo nivel socioeconómico, sanos	Promedio 55.0 (SD 58)	Promedio 153.0 (SD 9)	Inmunodifusión radial (comercial)	Suero usado en pocas horas después de ser obtenido	Boersma, Tanzania, 1981; 38
50	Suero de cordón	Hijos de mujeres de alto riesgo, sin infección pre o perinatal	Promedio 88.0 (SD 6.6)	Promedio 181.0 (SD 0.5)	Nefelometría (comercial)	Suero fraccionado y congelado hasta la medición	Soria, México, 2005; 39

### 3.3 Inmunoglobulinas como biomarcadores de infecciones congénitas

Se consideran biomarcadores a las sustancias que se producen o cambian en concentración después de un evento patológico, y con base a los ellos, se puedan desarrollar técnicas sensibles que sirvan como señales de alarma temprana para el diagnóstico.<sup>40</sup> Algunos investigadores han demostrado la utilidad de evaluar las inmunoglobulinas como biomarcadores no transferibles a través de la placenta (IgM, IgA, e IgE) en el suero del cordón umbilical.

Encontrar anticuerpos específicos de clase IgM, IgA o IgE específica en un recién nacido es diagnóstico de infección intrauterina, a menos que al bebé se le hayan transfundido hemo-derivados en los días anteriores a la prueba. Sin embargo, no todos los recién nacidos con infecciones congénitas las producen. Ocasionalmente estas inmunoglobulinas medidas en el recién nacido puede ser falsamente positivas por transfusión materno fetal durante el parto, estas desaparecen a los 10 días; por tanto, en el recién nacido las inmunoglobulinas que persistan confirman la infección neonatal. Si la madre no tiene anticuerpos específicos de clase IgA, IgM o IgE en el momento del parto, no hay duda de que el recién nacido está infectado.<sup>10,11, 30-32, 41-46</sup>

La detección de IgA parece ser más sensible que la de IgM para el diagnóstico de algunas infecciones como la toxoplasmosis, tanto en fetos como en recién nacidos. Cuando los títulos de un recién nacido son positivos a IgA se recomienda repetirle la prueba a los 10 días. Si persisten positivos se confirma la infección neonatal. Determinar anticuerpos IgA e IgM es de gran ayuda para determinar infección, pues juntas aumentan la sensibilidad de los ensayos.<sup>47-51</sup>

Los anticuerpos IgE son detectables en el suero de algunos adultos infectados por *T. gondii*. Las pruebas basadas en estos anticuerpos son poco sensibles, pero muy específicas. Además, los anticuerpos IgE frecuentemente tienen valor pronóstico, por ejemplo en la toxoplasmosis predicen mala evolución clínica.<sup>12, 44</sup>

### 3.4 Saliva

La toma de muestras de sangre a menudo se dificulta, principalmente en niños y puede ser, además, fuente de contaminación para trabajadores de la salud.<sup>52</sup> El estudio de materiales biológicos alternativos a la sangre es objeto de constante búsqueda, principalmente desde el incremento de las medidas de bioseguridad que siguieron a la aparición del SIDA y al aumento de la incidencia de enfermedades transmisibles por jeringas y otros objetos punzocortantes, como las hepatitis B y C, y el propio VIH. Con la intención de obtener muestras por métodos no invasivos, se han ensayado otros materiales biológicos; uno de ellos es la saliva.<sup>53</sup>

Mediante la identificación de biomarcadores asociados con la salud o el estado de la enfermedad y el desarrollo de tecnologías, descifrando el proteoma salival, se puede explorar el potencial diagnóstico de la saliva para enfermedades orales y sistémicas.<sup>54, 55</sup> El análisis de la saliva, ha demostrado ser una herramienta de diagnóstico útil para enfermedades malignas, tales como cáncer de mama o cáncer oral, mediante el empleo de nuevas herramientas de alta sensibilidad para el diagnóstico y la predicción del pronóstico.<sup>56</sup>

Por lo mencionado, concluimos que la saliva constituye una muestra biológica que no requiere el uso de técnicas invasivas para su obtención y su composición puede reflejar acontecimientos patológicos de manifestación sistémica. Existen diversos artículos en los cuales se ha demostrado la presencia de IgG, IgA, IgM o IgE totales o específicas en saliva en individuos sanos o como biomarcadores de una respuesta a un problema clínico.<sup>57-59</sup> Esta muestra también se ha empleado para buscar anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, Hepatitis B y C, Rubeola y otras patologías infecciosas.<sup>52, 60-62</sup>

Proveniente de las glándulas salivales que desembocan en la cavidad bucal, la saliva juega un papel importante en la salud; mediante sus enzimas -lisozima y lactoperoxidasa- interrumpe la integridad de las paredes microbianas.<sup>63</sup> El anticuerpo principal del fluido salival es la inmunoglobulina A. Las moléculas de IgA son sintetizadas por las células plasmáticas asociadas a las glándulas salivales. Esta inmunoglobulina dimérica se une por medio de su cadena J a un receptor, para originar una forma polimérica que se une a las células del epitelio de la membrana glandular. Es transportada a través de las células epiteliales en una vacuola endocítica y entra en el ducto de la glándula salival por su superficie luminal con ayuda de un componente secretor.<sup>53, 63-65</sup> Acompañando a la IgA se presentan también la IgG y la IgM las cuales inhiben la adherencia de los microorganismos a la mucosa, neutralizándolos.<sup>66</sup>

Los valores de concentración de IgA en infantes reportados en la literatura, se presentan en el **cuadro 5**, en donde podemos observar que los estudios cuentan con diferentes tamaños de muestra; las concentraciones se obtuvieron mediante diferentes técnicas, aunque predomina la inmunodifusión radial; se reportan valores a diferentes edades. En general, los resultados reportados presentaron una distribución no normal y el rango encontrado entre los valores mínimos y máximos fue muy amplio; cabe mencionar que se realizó conversión a µg/mL para poder realizar comparaciones. Se puede observar una variación marcada entre los valores reportados en el continente Europeo; específicamente en Alemania las concentraciones son altas en comparación con lo reportado en Sudamérica. En el mismo cuadro (excluyendo los estudios alemanes) podemos observar que los valores de las concentraciones aumentan conforme aumenta la edad.

Los valores de la IgM y la IgE no se han reportado para estas edades.

**Cuadro 5.** Concentraciones IgA totales en saliva

N	Edad (días)	Concentración de IgA (µg/mL)	Técnica	Autor, País, año; referencia
28	1	190.2	Inmunodifusión radial	Seidel, Alemania, 2000; 67
63	1	175.4	Inmunodifusión radial	Seidel, Alemania, 2001; 68
35	2-10	216.4	Inmunodifusión radial	Seidel, Alemania, 2000; 67
15	0-15	9.7	Inmunodifusión radial	Tomasello, Chile, 1981; 69
343	1-15	13.0	ELISA de captura	Besné, México, 2012; comunicación personal; 70
7	16 -30	32.9	Inmunodifusión radial	Tomasello, Chile, 1981; 69
18	1-30	30.0	Nefelometría ARRAY 360	Chacón, Venezuela;2004; 71
10	42	61.7	Bio-Rad Kit de proteínas	Stephens, Londres,1986; 72
6	0-84	50.0	ELISA de captura	Weemaes, Islandia; 2003, 73
17	0-730	253.1	Inmunodifusión radial	Tapia, Chile, 1998; 74

#### 4. Planteamiento del problema

Se sabe que existen niveles basales de IgA e IgM totales en sangre de cordón umbilical en neonatos sanos y que estos niveles se alteran cuando existe infección congénita o sepsis neonatal, e inclusive podría ser que aparezca IgE en estos casos.

Se desconocen las concentraciones basales de IgM, IgA e IgE totales en saliva de neonatos mexicanos. Tampoco se sabe si las infecciones congénitas inducen un incremento en estas concentraciones.

Por lo anterior, planteamos el uso de una técnica no invasiva, para la detección de infecciones congénitas, en la cual esperamos encontrar concentraciones altas de IgA, IgM o IgE.

## 5. Pregunta de investigación

¿Cuál será la validez diagnóstica de una prueba no invasiva, basada en la identificación de concentraciones anormalmente altas de IgA, IgM o IgE total en saliva, para la identificación de infecciones congénitas en neonatos?

## 6. Justificación

Las infecciones congénitas son problemas de salud en todo el mundo, aunque su frecuencia varía en diferentes regiones, debido a aspectos climáticos, hábitos sexuales, higiénicos o alimentarios. El costo social y económico de estas infecciones es significativo, pues ocasionan mortalidad o discapacidad de por vida.

Con base en la información que tenemos como antecedente, sabemos que la identificación de **casos subclínicos** de infección congénita al nacimiento se realiza a través de tamizaje con pruebas de laboratorio, para demostrar la presencia de anticuerpos de clases IgM o IgA específicos para cada agente etiológico; sin embargo, en algunos países sólo tamizan aquellas con tasas altas de incidencia, debido al costo de detección de los casos. La determinación de concentraciones anormalmente altas de IgA, M o E totales e incluso las tres inmunoglobulinas, puede ser empleadas como biomarcadores de infección congénita, lo que abre la posibilidad de contar con una prueba multiespectro, y sólo emplear pruebas específicas con los casos sospechosos; la etiología puede ser demostrada posteriormente, lo que reduciría los costos e incrementaría la gama de agentes infecciosos a valorar.

Debido a que la saliva es una muestra que puede tomarse sin puncionar ni lastimar, sería deseable utilizarla en lugar del suero; es necesario primero determinar las concentraciones de estas inmunoglobulinas totales en la saliva de neonatos, así como la correlación entre ambas muestras, tanto en pacientes sanos como en infectados, para finalmente plantear su uso en el diagnóstico presuntivo de infección congénita, y así hacer de ésta una prueba diagnóstica no invasiva.

## 7. Objetivo general

Validar una prueba diagnóstica no invasiva, basada en concentraciones anormalmente altas de IgA, IgM o IgE totales en saliva, para la identificación de infecciones congénitas en neonatos.

## **7.1 Objetivos directos**

1. Determinar los valores basales de las concentraciones de IgA, IgM e IgE totales en saliva de neonatos.
2. Determinar la correlación entre las concentraciones de IgM, IgA e IgE totales en saliva y en suero de neonatos.

## **7.2 Objetivo indirecto**

1. Determinar los cambios de las concentraciones de la IgM, IgA y IgE a lo largo del primer mes de vida.

## **8. Metodología**

### **8.1 Tipo de estudio**

Validación de una prueba diagnóstica

### **8.2 Población**

Neonatos nacidos en el Instituto Nacional de Perinatología o en el Hospital General Dr. Manuel Gea González, o pacientes atendidos en el Servicio de Neonatología del Instituto Nacional de Pediatría.

### **8.3 Criterios de selección**

#### Criterios de inclusión

- ✓ Neonatos reclutados en el periodo de Julio del 2011 a Julio del 2013.
- ✓ Madres que viven en el sur del área metropolitana.
- ✓ Que contaran con la carta de consentimiento informado, firmada por padre, madre o tutor.
- ✓ Que contaran con ambas muestras (sangre y saliva).

### Criterios de exclusión

- ✓ Neonatos con síndromes o anomalías congénitas atribuibles a enfermedades de origen no infeccioso
- ✓ Neonatos que hayan sido transfundidos con hemo-derivados en los días anteriores a la prueba.

### **8.4 Estándar de Referencia**

Se usó como estándar de referencia del diagnóstico de infección congénita, el constructo formado por el examen clínico infectológico, oftalmológico, auditivo, neurológico y las pruebas serológicas de laboratorio, específicas para 7 agentes etiológicos (la mayoría fueron comerciales):

1. Citomegalovirus: IgM e IgG (Bioemerix, Coulter y Bio-Rad) y PCR en tiempo real (Applied Biosystems)
2. *Toxoplasma gondii*: IgM (Bioemerix y Bio-Rad), Avidéz IgG (Casera), Western blot IgM e IgG (Casero) y PCR en tiempo real (Applied Biosystems)
3. *Treponema pallidum*: ELISA (Bio-Rad)
4. Rubéola: IgM, IgG (Bioemerix y Bio-Rad)
5. Parvovirus B19: IgM, IgG (Novalisa)
6. VHB: Ag superficie, Ag E y Ag Core (Bio-Rad)
7. VHC: anticuerpos IgG contra VHC (Hepanostic)

### **8.5 Tamaño de la muestra**

Debido a que se trata de un estudio de prueba diagnóstica, el tamaño de muestra se estimaría con base en la sensibilidad esperada (ya que esta es una prueba de tamizaje); sin embargo no existen reportes previos en saliva; por lo que se decidió hacer el estudio con muestreo por conveniencia, de los casos en que se obtuvieron muestras pareadas en el periodo de reclutamiento. Los neonatos incluidos en la presente tesis fueron aquellos que tenían biomarcadores positivos en muestra de sangre embebida en papel filtro y sus controles negativos, que fueron citados para toma de segunda muestra de sangre y -para fines de esta tesis- de saliva.

## 8.6 Definiciones operacionales

Se consideró:

Caso confirmado de infección congénita. Al neonato con resultado positivo a alguna de las pruebas confirmatorias y/o en exámenes clínicos específicos.

Caso sospechoso de infección congénita. Al Neonato con resultado positivo a alguno de los biomarcadores sin manifestaciones clínicas.

Caso dudoso. Neonato con sintomatología de enfermedad infecciosa de la cual no se determina el agente etiológico.

Sano. Neonato sano, sin infección por algunos de los agentes etiológicos, demostrado clínicamente y por pruebas de laboratorio.

Verdadero positivo. Muestra con resultado positivo a alguno de los biomarcadores inespecíficos, y que sea confirmado por las pruebas confirmatorias o en exámenes clínicos específicos.

Verdadero negativo. Muestra con resultado negativo a los biomarcadores y negativo a todas las pruebas serológicas etiológicas y en los exámenes clínicos.

Falso positivo. Muestra con resultado positivo a alguno de los biomarcadores, pero negativo en todas las pruebas confirmatorias y en los exámenes clínicos.

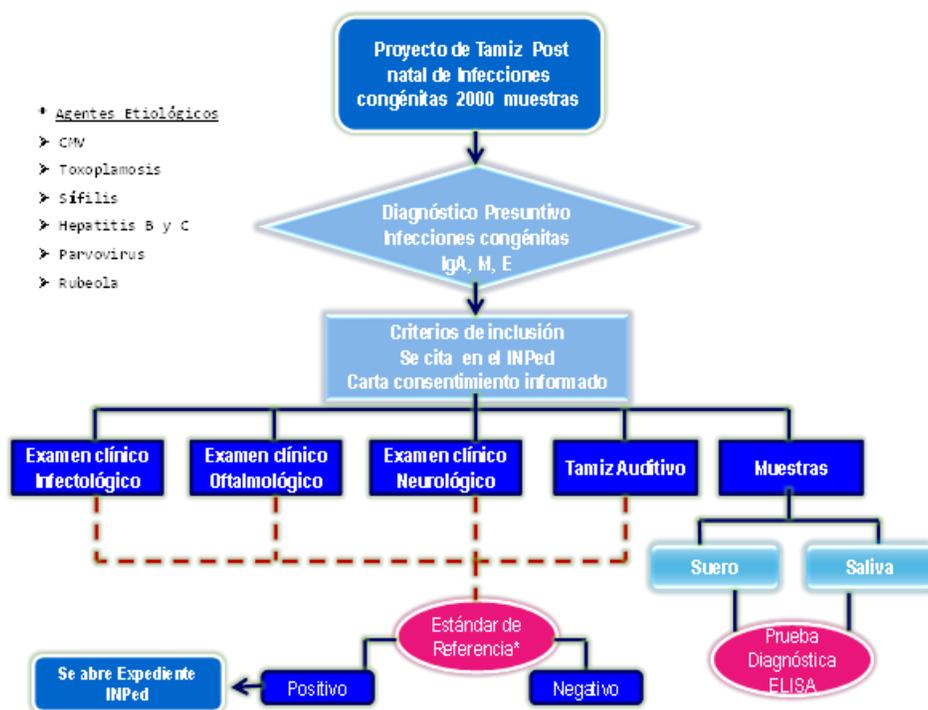
Falso negativo. Muestra con resultado negativo en los biomarcadores, pero positivo en las pruebas confirmatorias o en los exámenes clínicos.

## 8.7 Descripción General del Estudio

Este estudio se anidó en el proyecto multicéntrico denominado “Tamiz pre y postnatal de infecciones congénitas en el valle de México” del Instituto Nacional de Pediatría, en el cual se están tamizando alrededor de 2000 muestras de sangre de cordón umbilical embebida en papel filtro, de partos ocurridos en el Instituto Nacional de Perinatología o el Hospital General Doctor Manuel Gea González. También se contó con pacientes del servicio de Neonatología del Instituto Nacional de Pediatría.

En la **figura 1** se presenta el flujograma que resume la estrategia general del estudio. Se localizó por vía telefónica al familiar o tutor del recién nacido que haya

resultado con niveles anormales de alguna de las Inmunoglobulinas o niveles normales, del proyecto antes mencionado. Se les hizo una invitación para continuar en el estudio en la segunda fase, que consistió en realizar valoración clínica y de laboratorio al recién nacido, para confirmar la infección congénita o bien descartarla y en el caso de los pacientes aparentemente sanos confirmar el diagnóstico, es decir, confirmar que estuvieran libres de enfermedad. A los pacientes cuyos padres o tutores aceptaron continuar en el estudio se les citó en el laboratorio de errores innatos del metabolismo, ubicado en el noveno piso de la torre de investigación del INPed; en este sitio se les dio la información necesaria tanto verbal como escrita, se les leyó, y se les explicó y dio a firmar la carta de consentimiento informado.



**Figura 1.** Diagrama de flujo general del proyecto

En dicha cita se realizó a) examen clínico general llevado a cabo por una infectóloga pediatra; b) valoración oftalmológica por el oftalmólogo estandarizado del servicio de Oftalmología, mediante dilatación de las pupilas y exploración de fondo de ojo; y c) tamiz auditivo, realizado en el Servicio de Audiología. Si durante la exploración física, el neonato presentó datos clínicos de hipotonía o hipertonia en alguna de las extremidades o movimientos anormales referidos por la madre, padre o tutor, fue valorado en el Servicio de Neurología por el médico adscrito que participó en este estudio. La confirmación diagnóstica de infección congénita se llevó a cabo mediante la integración del constructo con pruebas serológicas específicas para cada agente etiológico: Citomegalovirus, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, Rubéola, Parvovirus B19, y

Virus de Hepatitis B y C. A los pacientes que fueron diagnosticados con infección congénita se les brindó tratamiento específico o seguimiento, de acuerdo a lo estipulado según la etiología; y se les dio seguimiento en los servicios de Infectología, Oftalmología, Audiología o Neurología.

### **8.8 Métodos de recolección de muestras**

Se indicó a la madre del neonato, que debería acudir a la cita con al menos dos horas de ayuno (esto con el fin de que no sean las inmunoglobulinas tipo IgA provenientes de la leche materna las que se cuantifiquen). Se tomó la muestra de sangre venosa para la realización de pruebas confirmatorias: una fracción de ésta, se usó para cuantificar IgA, IgM e IgE totales, para poder establecer la correlación entre los valores en suero y saliva. Mediante una punción del brazo del neonato se obtuvieron 3mL de sangre por goteo en un tubo de plástico; dicha acción fue realizada por la médica pediatra calificada. La saliva se recolectó por aspiración, entre el rodete inferior y la mucosa de la mejilla, con una pipeta de plástico previamente esterilizada, hasta obtener al menos 100  $\mu$ L; a continuación se depositó en un microtubo que contenía inhibidores de proteasas. Las muestras se mantuvieron en frío si se procesaban ese mismo día; de no ser el caso, la saliva se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  y el suero a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ambas muestras fueron rotuladas con el número de folio y las iniciales de la madre.

### **8.9 Determinación de concentración de IgM, IgA e IgE**

Nuestro instrumento de medición fue el inmunoensayo enzimático (ELISA) de captura de antígenos, siendo en este caso la IgA, la IgM o la IgE los antígenos (estandarizado previamente en el laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría); se trata de pruebas cuantitativas. El método consiste en la unión de anticuerpos de cabra contra la inmunoglobulina a analizar (por medio de cargas) se utilizaron inmuno-placas NUNC MaxiSorb de 96 pozos de fondo plano; posterior a la sensibilización de los pozos se colocó la muestra; la interacción antígeno-anticuerpo fue puesta en evidencia con un conjugado anticuerpo anti IgM, anti IgA o anti IgE respectivamente, acoplado a la enzima peroxidasa, la cual catalizó una reacción de óxido-reducción que permite que un cromógeno incoloro e inerte se oxide dando un producto colorido como puede observarse en la **figura 2**. Las ventajas de este método son que no requiere un laboratorio sofisticado y que es una prueba rápida y simple.



**Figura 2.** Fundamento y ejemplo de una placa de ELISA con pozos positivos (color fuerte) y negativos (incolores)

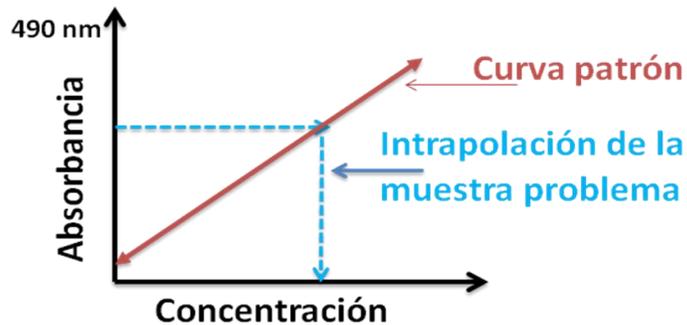
A continuación se presentan las condiciones del ensayo utilizadas para las muestras de suero y saliva, para la cuantificación de las concentraciones de IgA, IgM e IgE totales por ELISA de captura:

1. Se sensibilizan los pozos con 100µL de los anticuerpos de captura, a una concentración de anti-IgA de 2µg/mL, de anti-IgM de 0.125µg/mL o anti-IgE de 3µg/mL, en amortiguador de boratos 0.01M, pH 8.0. Se cubren las placas con plástico adherente y se dejan incubando a 4°C toda la noche.
2. Al otro día, se tira el excedente y se lava 3 veces con 200µL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 7.2 (PBS) añadido con Tween 20 al 0.5% (PBS-T) durante 5 minutos cada lavado, y 2 veces con PBS, cinco minutos cada lavado; se tira el excedente.
3. Posterior al lavado, se bloquea la placa con 200 µL/pozo de albumina al 1% diluida en PBS-T; se deja incubando a 37°C durante 30 minutos, y se tira el excedente;
4. Se lava la placa como se menciona en el paso número 3.
5. Para medir la concentración de las inmunoglobulinas, se hace una curva estándar o de referencia de las mismas, diluyéndolas en PBS a una concentración de 0 a 0.5µg/ml para IgA e IgM en 8 pozos (0.000, 0.007, 0.015, 0.031, 0.062, 0.125, 0.250 y 0.500) y a concentraciones de 0 a 0.25µg/ml (0.000, 0.008, 0.016, 0.031, 0.063, 0.125 y 0.250) para el caso de la IgE.
6. Se hacen las diluciones doble seriadas de las muestras de saliva en PBS-Tween 20, iniciando con 1:50 en caso de la IgA, y en 1:5 en los casos de la IgM y la IgE; y para las muestras de suero IgA 1:160, IgM 1:500 e IgE 1:40 se dejan incubando a 37°C durante 2 horas.
7. Se tira el excedente y se lava la placa como se menciona en el paso número 3.
8. Se hace una dilución de los conjugados con peroxidasa en PBS-T, de 1:4000 para el conjugado anti-IgA humana, de 1:2000 para el conjugado anti-IgM humana y de 1:1000 del conjugado anti-IgE humana. Se ponen 100 µL/pozo en la placa, se dejan incubando a 37°C durante 2 horas.

9. Se tira el excedente y se lava la placa como se menciona en el paso número 3.
10. Se prepara la solución de cromógeno sustrato: 5 ml de citrato de sodio + 5 ml de ácido cítrico + 4  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno +  $\frac{1}{2}$  tableta de OPD (orto-fenilen-diamina) por placa. Se colocan 100  $\mu$ L/pozo y se deja en la oscuridad por un máximo de 30 min, revisando constantemente para parar la reacción en cuanto comience a virar el color. La reacción se detiene colocando 50  $\mu$ L/pozo de solución de ácido sulfúrico 0.1N
11. Se colocan las placas se en un lector de ELISA a una longitud de onda de 490 nm para obtener lecturas medidas en absorbancias.

Estos ensayos fueron realizados por un profesional con amplia experiencia.

Una vez obtenidas las lecturas de las absorbancias, se grafican los valores que corresponden a la curva estándar o patrón, utilizando la fórmula de la recta  $y = mx + b$ , despejándola de la siguiente manera:  $x = (y - b) / m$ ; donde:  $x =$  concentración de IgA, IgM o IgE según sea el caso,  $y =$  valor de absorbancia; por regresión lineal se obtienen la  $m =$  pendiente, la  $b =$  ordenada al origen. Posteriormente para obtener la concentración de cada inmunoglobulina en cada muestra, se intrapola el valor de absorbancia ( $y$ ) en la curva patrón como se muestra en la **figura 3**. El valor de  $x$  obtenido se multiplica por el factor de dilución de la muestra, lo que permite reportar la concentración en  $\mu$ g/ml.



**Figura 3.** Patrón de referencia teórico para cuantificación de las inmunoglobulinas

### 8.10 Métodos de registro y procesamiento

El grupo de colaboración del estudio, que incluye a los expertos que procesaron las muestras, los médicos que realizaron las valoraciones clínicas, así como quienes recolectaron y analizaron las muestras, estuvieron cegados en cuanto al diagnóstico presuntivo de estado de salud del neonato. La responsable principal del estudio conoció los resultados, ya que es quien se encargó de analizarlos para establecer el diagnóstico final con prontitud y así proporcionar manejo clínico a los casos que así lo requirieron.

La información fue recabada en formatos diseñados especialmente para su análisis; posteriormente fue vaciada en una base de datos creada en Excel, se analizó la

distribución de las concentraciones con el programa estadístico Stata v.12. Posteriormente la información fue analizada en el paquete SPSS v.21; se realizaron curvas ROC para establecer el punto de corte, se hicieron cálculos de correlación de la concentración de cada inmunoglobulina entre las muestras de suero y saliva, mediante el coeficiente de correlación de Spearman ( $r_s$ ) y finalmente se evaluó la capacidad de la prueba mediante los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo así como las razones de verosimilitud positiva y negativa, con un intervalo de confianza del 95%. Se determinó como significativa una  $P < 0.05$ .

## 9. Consideraciones éticas

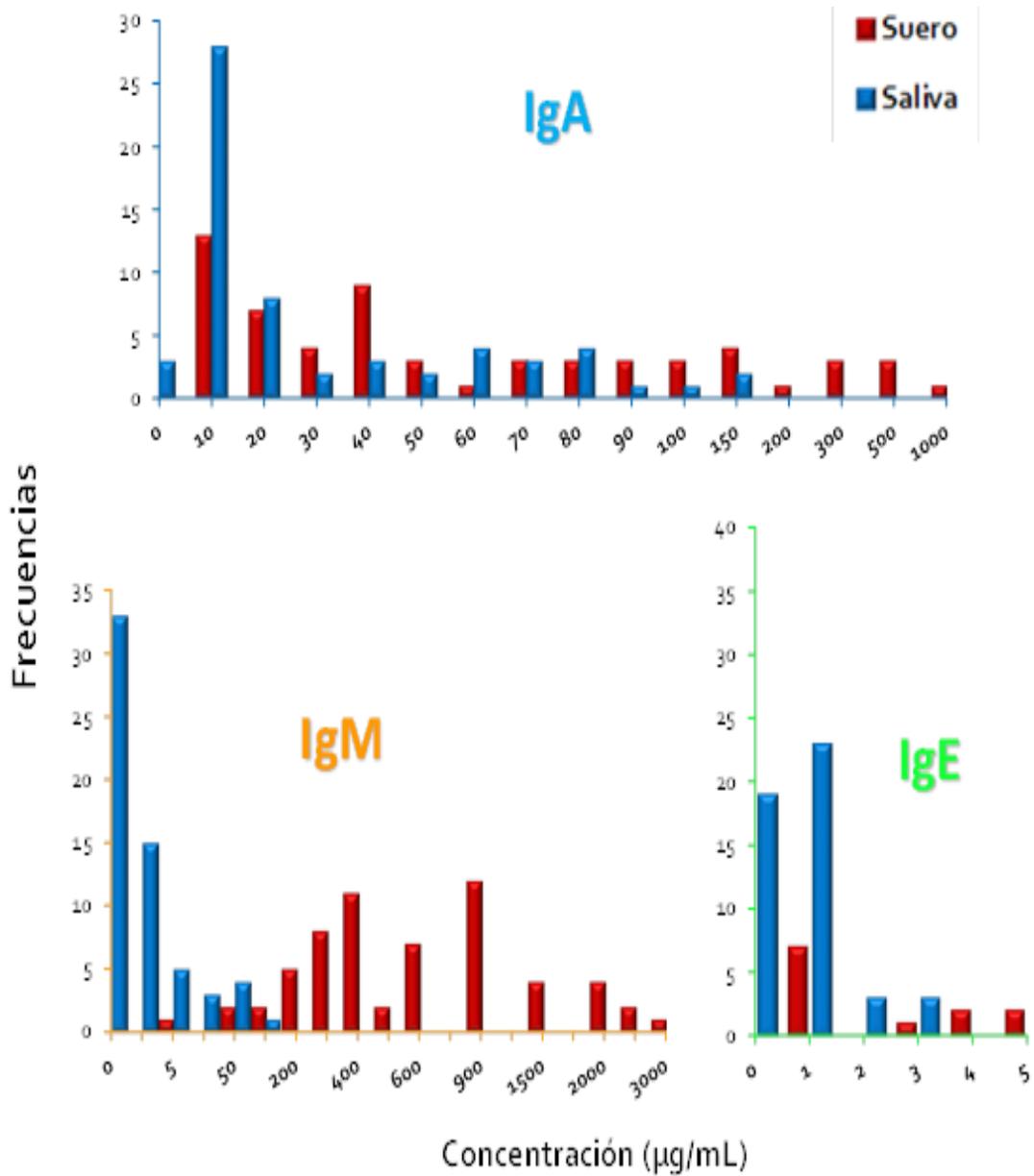
Este estudio fue diseñado de conformidad con los principios de Helsinki, la Ley General de Salud y a los principios armonización y buenas prácticas clínicas. Está aprobado por los Comités de Investigación y Ética del INP, con número de registro 002/2008. Se trata de un estudio observacional, sin embargo, los casos confirmados fueron manejados médicamente de acuerdo a los estándares nacionales y del propio INP. De acuerdo con el artículo 17 de la Ley General de Salud, en materia de investigación para la salud, esta investigación se clasifica dentro de las de riesgo mínimo.

## 10. Resultados

Se reclutaron 66 niños, de los cuales se obtuvieron muestras pareadas de suero y saliva; cinco de estas muestras se excluyeron del análisis, debido a que tenían una edad mayor a 30 días; de las 61 restantes, el 91.8% correspondieron a cincuenta y seis neonatos que procedían del Hospital General Dr. Manuel Gea González; dos pacientes (3.3%) del Instituto Nacional de Pediatría y tres (4.9%) del Instituto Nacional de Perinatología Dr. Isidro Espinosa de los Reyes (INPer). Treinta y cinco de los neonatos (57.4%) fueron de sexo masculino y veintiséis (42.6%) de sexo femenino.

Se determinaron las concentraciones de las inmunoglobulinas, medidas en unidades de  $\mu\text{g/mL}$ , mediante el ELISA de captura; hasta ese momento nos manteníamos cegados al resultado del constructo (estándar de referencia); con los resultados se elaboraron los gráficos de frecuencia de concentración para ambas muestras (**figura 4**). En el caso de la IgE el tamaño de muestra fue de 48 debido a que la cantidad de suero o saliva fueron insuficientes para su procesamiento.

El análisis de la distribución de concentración de las inmunoglobulinas con la prueba estadística de Shapiro-Wilks resultó en una distribución no normal ( $P= 0.00000$ ; cuadro 6).



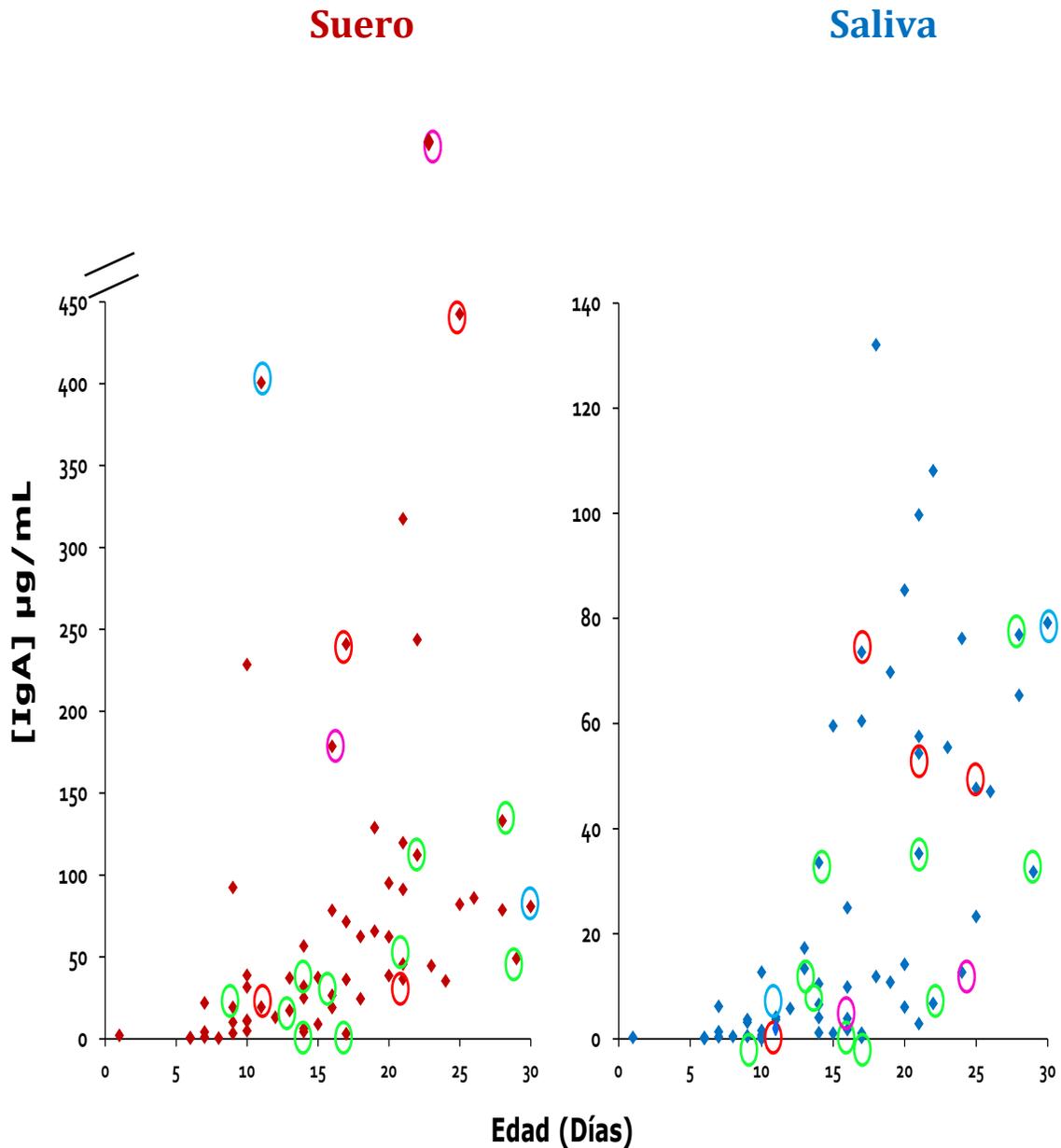
**Figura 4.** Distribución de frecuencias de concentraciones de IgA (n=61), IgM (n=61) e IgE (n=48)

**Cuadro 6.** Distribución de las concentraciones de las inmunoglobulinas con la prueba de Shapiro-Wilks.

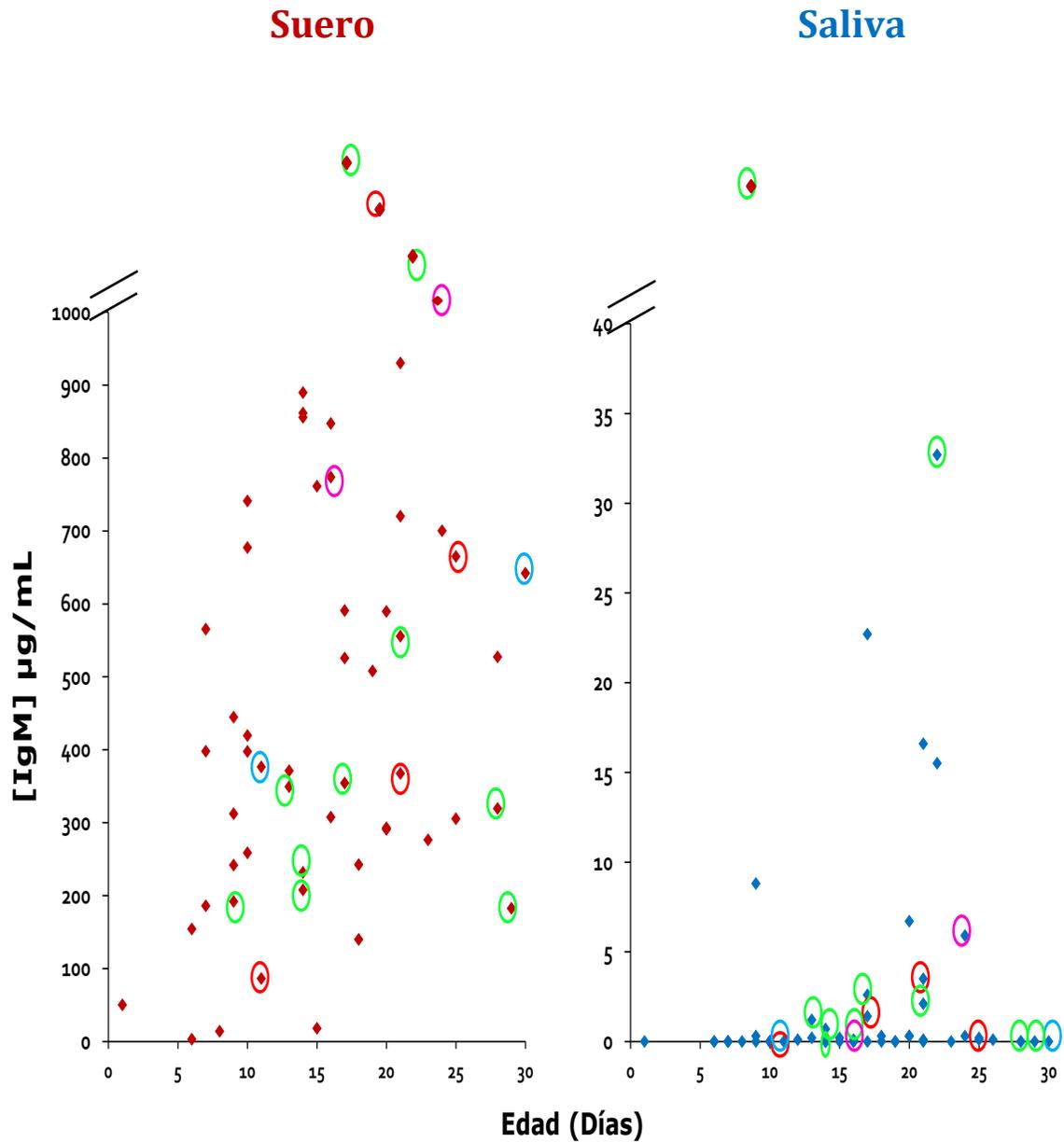
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
IgA_Suero	61	0.57690	23.305	6.793	0.00000
IgA_Saliva	61	0.77398	12.450	5.441	0.00000
IgM_Suero	61	0.80873	10.536	5.080	0.00000
IgM_Saliva	61	0.36702	34.866	7.662	0.00000
IgE_Suero	48	0.63155	16.781	6.000	0.00000
IgE_Saliva	48	0.76275	10.805	5.064	0.00000

Posteriormente se realizaron gráficos de dispersión de las concentraciones con respecto a la edad; en este momento ya se conocían los resultados del estándar de referencia. Existieron seis casos de infección congénita por *Toxoplasma gondii* y dos por citomegalovirus, y 12 casos con alteraciones neurológicas (retraso psicomotor leve y moderado); dos de estos pacientes eran casos de toxoplasmosis, los cuales se muestran en la **figura 5**.

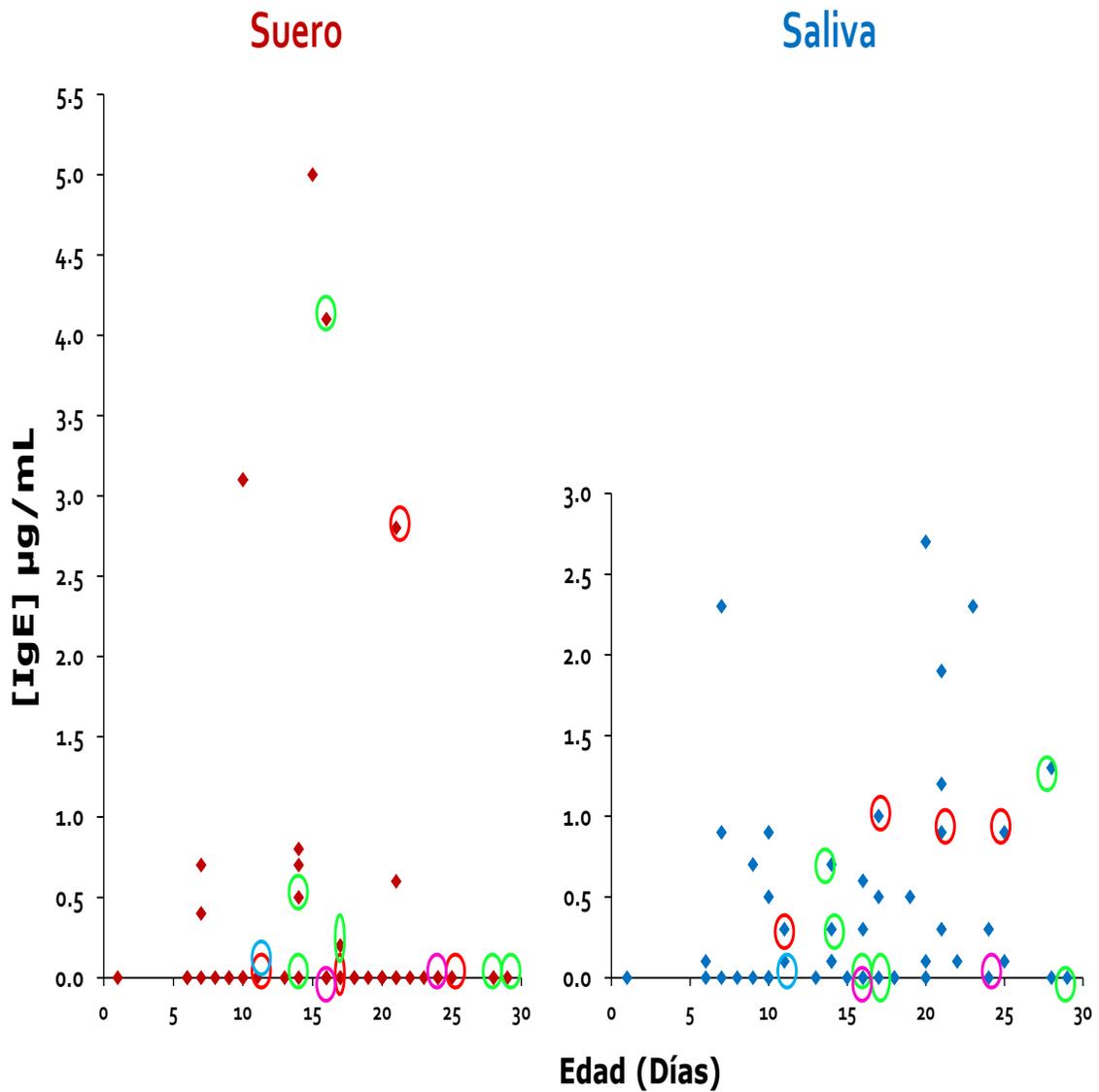
Hubo un aumento significativo de la IgA en suero y saliva a partir de los 10 días de edad. Nótese la diferencia de escalas entre las gráficas de ambas muestras. La concentración de IgM en el suero también aumenta en relación con la edad, no sucede lo mismo en saliva (**figura 6**). Para la IgE, no se encontró cambio significativo con respecto a la edad (**figura 7**).



**Figura 5.** Relación entre la concentración de IgA en suero y saliva con respecto a la edad. Los círculos representan los casos con infección congénita, toxoplasmosis en rojo y citomegalovirus en azul; en verde se marcan casos con problemas neurológicos y los círculos de color rosa representan pacientes con infección congénita por *Toxoplasma gondii* y retraso neurológico. El punto que sobresale en la gráfica de suero corresponde a una muestra con 859 µg/mL.



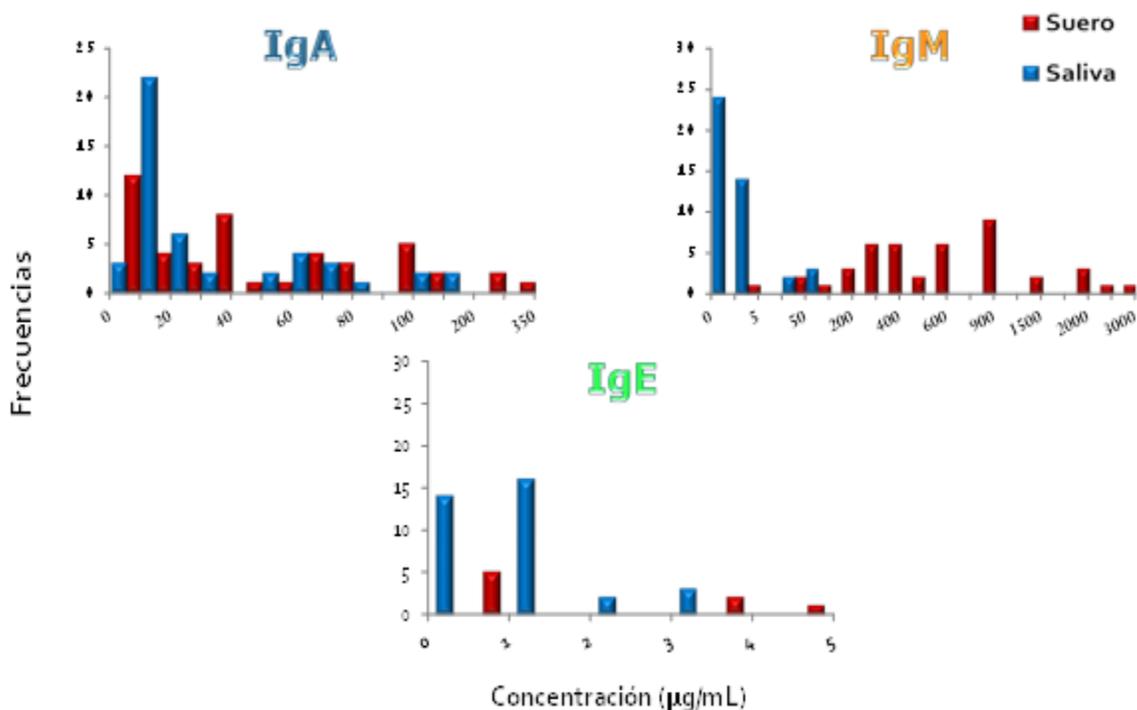
**Figura 6.** Relación entre la concentración de IgM en el suero y saliva y la edad de los neonatos. Los círculos representan los casos con infección congénita, toxoplasmosis en rojo y citomegalovirus en azul; en verde se marcan casos con problemas neurológicos y los círculos de color rosa representan pacientes con infección congénita por *Toxoplasma gondii* y retraso neurológico. Nótese la gran diferencia en las escalas del eje de las ordenadas entre ambas muestras. Los puntos que sobresalen en las gráficas de suero corresponden a muestras con valores de 2158.8, 1717.2, 1122.9 y 1044.8 µg/mL respectivamente y en saliva el punto más alto corresponde a 80.5µg/mL



**Figura 7.** Relación entre la concentración de IgE en el suero y saliva y la edad de los neonatos. Los círculos representan los casos con infección congénita, toxoplasmosis en rojo y citomegalovirus en azul; en verde se marcan casos con problemas neurológicos y los círculos de color rosa representan pacientes con infección congénita por *T. gondii* y retraso neurológico.

Una vez realizados los gráficos anteriores, y conociendo los casos con infección y los casos con alteración neurológica; se excluyeron del siguiente análisis, para determinar si se obtenían distribuciones “normales”.

Con una n de 43 neonatos y sus muestras pareadas de suero y saliva para IgA e IgM y 35 neonatos con sus respectivas muestras para IgE se obtuvo nuevamente la distribución de frecuencias de las concentraciones, pensando que una vez excluidos a los neonatos “enfermos” encontraríamos una distribución normal ver (figura 8) pero nuevamente se observa heterogeneidad en la distribución para las tres inmunoglobulinas.



**Figura 8.** Gráfico de distribución de frecuencias de las concentraciones de IgA, IgM e IgE en muestras de suero y saliva.

Con el fin de determinar si la ausencia de distribución normal en las concentraciones, se debía a cambios por la edad; se calcularon promedios por semana de vida en los pacientes sanos.

Se categorizó la variable de edad en días por **edad en semanas**. Cuando se analizaron los resultados categorizados, se observan los cambios mostrados en el **cuadro 7**. En el caso de la IgA los valores se incrementan en ambas muestras. La IgM estuvo virtualmente ausente en las muestras de saliva y tuvo un aumento abrupto en la tercera semana, para después disminuir; en suero, los valores se incrementan conforme a las semanas. La IgE presentó cambios erráticos en ambas muestras. Al analizar los

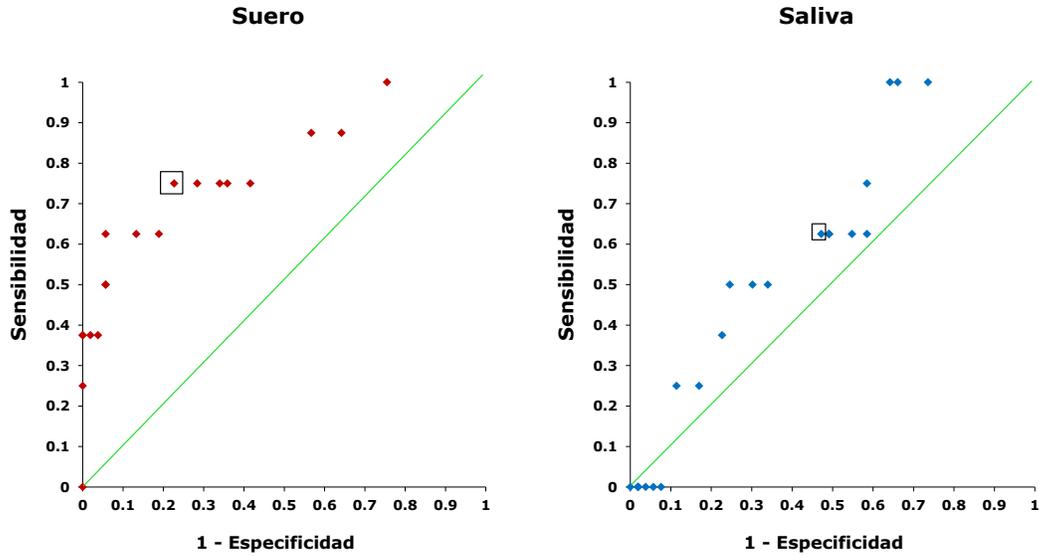
resultados con una desviación estándar, observamos que estas son muy amplias y en algunos casos superan el promedio. Debemos considerar que los tamaños de muestra para cada grupo son pequeños y existe variabilidad entre ellos.

**Cuadro 7.** Promedios de concentración de las inmunoglobulinas ( $\mu\text{g/mL}$ )

SEMANAS	IgA				IgM				IgE			
	Suero		Saliva		Suero		Saliva		Suero		Saliva	
	Prom.	DE	Prom.	DE	Prom.	DE	Prom.	DE	Prom.	DE	Prom.	DE
<b>Primera</b> (1-7 días) <b>n=6</b>	5.0	8.4	1.4	2.4	226.2	215.4	0.0	0.0	0.2	0.3	0.6	0.9
<b>Segunda</b> (8-15 días) <b>n=17</b>	36.2	54.9	7.2	14.4	686.4	684.5	0.6	2.1	1.1	1.7	0.2	0.3
<b>Tercera</b> (16-23 días) <b>n=15</b>	96.9	82.2	46.2	44.1	759.8	585.6	4.2	7.6	0.0	0.2	0.6	0.8
<b>Cuarta</b> (24-30 días) <b>n=5</b>	65.3	23.6	53.4	20.1	778.6	749.9	0.1	0.1	0.0	0.0	0.7	1.1

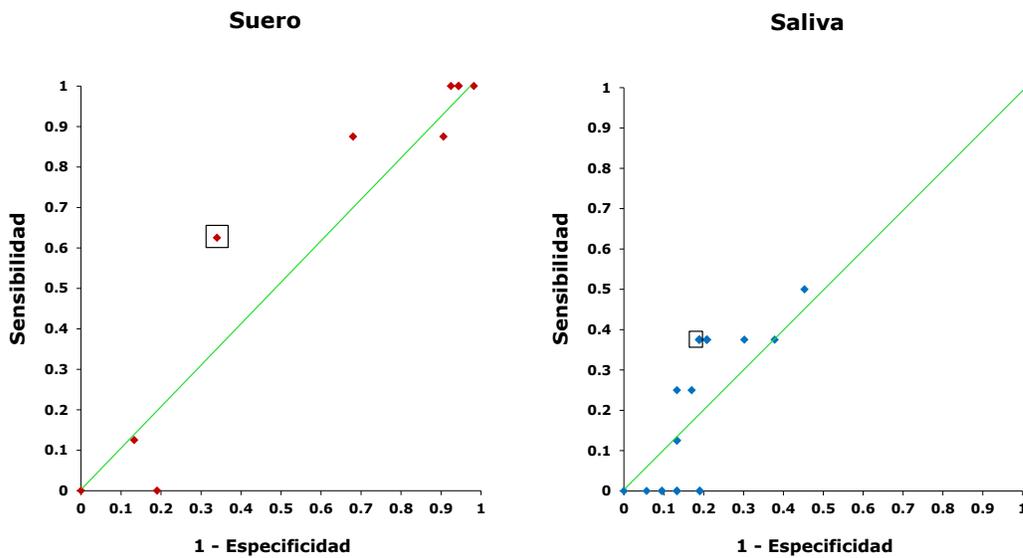
Debido a que las concentraciones no se distribuyeron de manera normal, se usaron curvas ROC para determinar el punto de corte para cada inmunoglobulina.

Según las coordenadas de la curva (**figura 9**), se considera una prueba positiva para IgA en suero a la concentración mayor o igual a  $80 \mu\text{g/mL}$  (sensibilidad de 0.75 y especificidad de 0.77); con un área bajo de la curva de 0.818 con significancia de 0.004 e intervalos de confianza al 95% de 0.647 a 0.990. Para saliva, las concentraciones mayores o iguales a  $10 \mu\text{g/mL}$  dieron la mayor sensibilidad (0.63) y la mayor especificidad (0.53); con un área bajo de la curva de 0.644 con significancia de 0.192 e intervalos de confianza al 95% de 0.471 a 0.817.



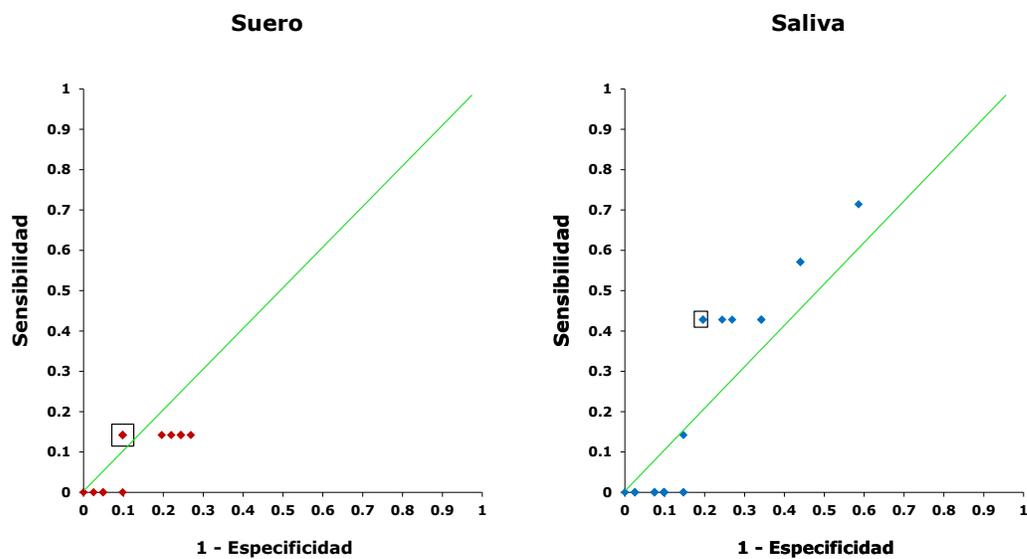
**Figura 9.** Curvas ROC de la IgA para suero y saliva, el cuadro representa el punto de corte.

El punto de corte para la IgM, y de acuerdo a las coordenadas de la curva ROC (figura 10), se considera una prueba positiva en suero, a una concentración mayor o igual a 600  $\mu\text{g/mL}$  (sensibilidad de 0.63 y especificidad de 0.66); con un área bajo de la curva de 0.599 con significancia de 0.370 e intervalos de confianza al 95% de 0.402 a 0.796. Para saliva se consideraron positivas las concentraciones mayores o iguales a 1  $\mu\text{g/mL}$  - sensibilidad de 0.38 y especificidad de 0.81-, con un área bajo de la curva de 0.531 con significancia de 0.781 e intervalos de confianza al 95% 0.312 a 0.749.



**Figura 10.** Curvas ROC de la IgM para suero y saliva, el cuadro representa el punto de corte.

Para la IgE, el punto de corte, de acuerdo a las coordenadas de la curva ROC (figura 11), fue mayor o igual a  $1\mu\text{g/mL}$  (sensibilidad de 0.14 y especificidad de 0.90); con un área bajo de la curva de 0.443 con significancia de 0.630 e intervalos de confianza al 95% de 0.219 a 0.666. Para saliva la concentración mayor o igual a  $0.7\mu\text{g/mL}$  se consideró positiva (sensibilidad de 0.43 y especificidad de 0.80); con un área bajo de la curva de 0.575 con significancia de 0.530 e intervalos de confianza al 95% 0.350 a 0.709.



**Figura 11.** Curvas ROC de la IgE para suero y saliva

Los parámetros de validez para la IgA, en suero y saliva, IgM en suero y saliva así como IgE en ambas muestras se presentan en los cuadros 8 al 13.

**Cuadro 8.** Parámetros de validez para el ELISA de captura punto de corte 80 µg/mL.

IgA	Estándar de Referencia (Constructo)		ELISA Suero IgA			
			Parámetros	Fórmula	Valor	I.C (95%)
Prueba diagnóstica (Suero)	+	-	Sensibilidad	6/6+2	0.75	38.74 – 100.00
	+	6	Especificidad	41/41+12	0.77	65.15 – 89.57
	-	12	Valor predictivo positivo	6/6+12	0.33	8.78 – 57.89
	-	2	Valor predictivo negativo	41/41+2	0.95	87.89 – 100.00
			Cociente de probabilidad positivo	$0.75/(1 - 0.77)$	3.26	1.75 - 6.27
			Cociente de probabilidad negativo	$(1 - 0.75)/0.77$	0.32	0.10 – 1.08
			Precisión o Exactitud	47/61	0.77	65.88 – 88.42

**Cuadro 9.** Parámetros de validez para el ELISA de captura punto de corte 10 µg/mL.

IgA	Estándar de Referencia (Constructo)		ELISA Saliva IgA			
			Parámetros	Fórmula	Valor	I.C (95%)
Prueba diagnóstica (Saliva)	+	-	Sensibilidad	5/5+3	0.62	22.70 - 100.00
	+	5	Especificidad	28/28+25	0.52	38.45 - 67.21
	-	25	Valor predictivo positivo	5/5+25	0.16	1.66 - 31.67
	-	3	Valor predictivo negativo	28/28+3	0.90	78.30 - 100.00
			Cociente de probabilidad positivo	$0.62/(1 - 0.52)$	1.29	0.72 - 2.43
			Cociente de probabilidad negativo	$(1 - 0.62)/0.52$	0.73	0.28 - 1.80
			Precisión o Exactitud	33/61	0.54	40.77 - 67.42

**Cuadro 10.** Parámetros de validez para el ELISA de captura punto de corte 600 µg/mL.

IgM	Estándar de Referencia (Constructo)		ELISA Suero IgM			
			Parámetros	Fórmula	Valor	I.C (95%)
Prueba diagnóstica (Suero)	+	-	Sensibilidad	5/5+3	0.62	22.70 - 100.00
	+	5	Especificidad	35/35+18	0.66	52.34 - 79.73
	-	18	Valor predictivo positivo	5/5+18	0.21	2.71 - 40.77
	-	3	Valor predictivo negativo	35/35+3	0.92	82.22 - 100.00
			Cociente de probabilidad positivo	$0.62/(1 - 0.66)$	1.84	0.96 - 3.54
			Cociente de probabilidad negativo	$(1 - 0.62)/0.66$	0.57	0.23 - 1.42
			Precisión o Exactitud	40/61	0.65	52.83 - 78.32

**Cuadro 11.** Parámetros de validez para el ELISA de captura punto de corte 1 µg/mL.

IgM	Estándar de Referencia (Constructo)		ELISA Saliva IgM			
			Parámetros	Fórmula	Valor	I.C (95%)
Prueba diagnóstica (Saliva)	+	-	Sensibilidad	3/3+5	0.37	0.00 - 77.30
	+	3	Especificidad	43/43+10	0.81	69.66 - 92.61
	-	5	Valor predictivo positivo	3/3+10	0.23	0.00 - 49.83
	-	43	Valor predictivo negativo	43/43+5	0.89	79.90 - 99.27
			Cociente de probabilidad positivo	$0.37 / (1 - 0.81)$	1.94	0.69 - 5.71
			Cociente de probabilidad negativo	$(1 - 0.37) / 0.81$	0.77	0.44 - 1.34
			Precisión o Exactitud	46/61	0.75	63.78 - 87.04

**Cuadro 12.** Parámetros de validez para el ELISA de captura punto de corte 1 µg/mL.

IgE	Estándar de Referencia (Constructo)		ELISA Suero IgE			
			Parámetros	Fórmula	Valor	I.C (95%)
Prueba diagnóstica (Suero)	+	-	Sensibilidad	1/1+6	0.14	0.00 - 47.35
	+	1	Especificidad	37/37+4	0.90	79.94 - 100.00
	-	6	Valor predictivo positivo	1/1+4	0.2	0.00 - 65.06
	-	37	Valor predictivo negativo	37/37+6	0.86	74.53 - 97.57
			Cociente de probabilidad positivo	$0.14 / (1 - 0.90)$	1.4	0.19 - 11.26
			Cociente de probabilidad negativo	$(1 - 0.14) / 0.90$	0.95	0.69 - 1.31
			Precisión o Exactitud	38/48	0.79	66.64 - 91.70

**Cuadro 13.** Parámetros de validez para el ELISA de captura punto de corte 0.7 µg/mL.

IgE	Estándar de Referencia (Constructo)		ELISA Saliva IgE			
			Parámetros	Fórmula	Valor	I.C (95%)
Prueba diagnóstica (Saliva)	+	-	Sensibilidad	3/3+4	0.42	0.00 - 86.66
	+	3	Especificidad	33/33+8	0.80	67.14 - 93.84
	-	4	Valor predictivo positivo	3/3+8	0.27	0.00 - 58.14
	-	33	Valor predictivo negativo	33/33+4	0.89	77.83 - 100.00
			Cociente de probabilidad positivo	$0.42 / (1 - 0.80)$	2.1	0.76 - 6.32
			Cociente de probabilidad negativo	$(1 - 0.42) / 0.80$	0.72	0.37 - 1.37
			Precisión o Exactitud	36/48	0.75	61.71 - 88.29

La correlación para la IgA entre las muestras de suero y saliva fue  $r_s = 0.602$ ,  $P = 0.000$ , por lo tanto tenemos evidencia a favor de que si existe correlación, con un valor de  $Rho = 0.60$ , que indica buena correlación. Para la IgM, la  $r_s = 0.196$ ,  $P = 0.129$ , por lo tanto no existe correlación entre ambas muestras, con un valor de  $Rho = 0.19$ . Para la IgE, la  $r_s = 0.045$ ,  $P = 0.762$ , por lo tanto no existe correlación entre ambas muestras, con un valor de  $Rho = 0.04$ .

## 11. Discusión

El cuerpo humano al igual que el de otros animales está dotado de sistemas que le ayudan a mantener la homeostasis; uno de ellos es el Sistema Inmune, el cual reacciona a estímulos internos y externos produciendo mediadores celulares y humorales, como los anticuerpos, que presentan una exquisita especificidad. Es por esto que diversos investigadores han demostrado la utilidad de los anticuerpos de clase IgG, IgA, IgM e incluso IgE en el diagnóstico de diversas enfermedades, incluidas las infecciosas. Si bien se han buscado estas moléculas en diversos fluidos, la muestra más empleada ha sido el suero de la sangre periférica, la cual está prácticamente saturada de albúmina e IgG. La generación de anticuerpos específicos de esta clase en contra de una infección en curso no altera los niveles totales de la misma, pues existen mecanismos que mantienen las concentraciones estables dentro de los vasos.<sup>75</sup> Este fenómeno no es necesariamente igual para las otras tres clases de anticuerpos IgM, IgA e IgE, cuyas concentraciones son mucho más bajas; además, en la sangre de los neonatos, sus niveles son todavía menores no así los de la IgG, que incluso pueden ser un poco mayores que los de su madre.<sup>12</sup> Más aun, los anticuerpos de clase IgM, IgA e IgE no atraviesan la placenta, por lo que los cambios en estas inmunoglobulinas son debidos a síntesis activa por parte del feto. Cabe resaltar que se han observado niveles totales de IgM e IgA significativamente más altos en neonatos con infección perinatal que en aquellos que no están infectados.<sup>10,</sup>

11

Para algunas infecciones congénitas como la toxoplasmosis, se ha empleado la muestra de tamiz neonatal (sangre embebida en papel filtro) para diagnosticar precozmente a los neonatos infectados, mediante la determinación de anticuerpos anti-*T. gondii* de clase IgM.<sup>76</sup> Sin embargo, existen dos problemas: la búsqueda de cada agente etiológico en todos los recién nacidos resulta de baja efectividad en relación al costo; por otro lado, la muestra de cordón umbilical puede estar contaminada con sangre materna y dar falsos positivos.<sup>18</sup> Para muchos otros padecimientos se ha demostrado que es mucho mejor la sangre del talón, pero ésta implica una pequeña lesión al neonato. Por ello, en este trabajo se exploró la posibilidad de medir un aumento significativo de las concentraciones totales de las inmunoglobulinas de clase IgA, IgM e IgE sobre los niveles

basales en los neonatos, con el fin de realizar una prueba de tamiz de cualquier infección congénita, confirmando por medio de estudios específicos de etiología a quienes resulten sospechosos o positivos; al mismo tiempo se determinó la utilidad de la saliva como alternativa al suero para estos fines, ya que su obtención es hoy un procedimiento aceptado por los padres, pues no representa peligro para el pequeño, lo que convierte a esta muestra en material biológico adecuado para la detección de anticuerpos, principalmente cuando la obtención de sangre no es posible o se obtiene muy poca. La utilización de esta muestra para la detección de infecciones congénitas no había sido evaluada para el grupo de edad en estudio. Por todo lo anterior, era necesario establecer los niveles basales en niños de 1 a 30 días de edad y la relación entre las concentraciones de las Igs en esta muestra con las del suero. En cuanto a la población de estudio, cabe mencionar que se disminuyó sesgo al abarcar todo el espectro de las infecciones; es decir, se estudiaron pacientes sanos, así como casos subclínicos y aquellos con signos clínicos.

Un aspecto que resultó distinto a lo que nosotros esperábamos, es que, debido a que la IgA es secretora, era de suponer, que las concentraciones de esta en saliva tendrían una distribución normal; sin embargo, esto no fue así. A pesar de lo anterior, la concentración promedio para IgA en saliva, de los pacientes sanos (25.4  $\mu\text{g/mL}$ ) fue de un nivel similar que aquel de otras poblaciones: 30.0 y 32.9  $\mu\text{g/mL}$ , para neonatos sanos de la población venezolana y chilenos, respectivamente (cuadro 6). Más aun, al revisar la literatura constatamos que el fenómeno de desviaciones estándar mayores que el promedio, no se presenta sólo en nuestros resultados, sino también en las mediciones de las referencias antes mencionadas, por lo que en general no parece haber distribuciones normales.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado una gran variabilidad de concentraciones basales de IgM e IgA en suero de cordón umbilical y sólo hay un estudio en el que analizaron los valores basales en bebés de un mes, que también fueron distintos a los encontrados en los niños de la cuarta semana de vida en esta tesis. Las diferencias encontradas pueden deberse a las distintas técnicas empleadas, a diversidad genética entre distintas razas humanas, o al tiempo transcurrido entre esos estudios y el actual, pues ha habido cambios ambientales importantes en las últimas décadas, lo que puede haber alterado la exposición de las mujeres gestantes a distintos antígenos.

La discrepancia entre los resultados también puede deberse a que las poblaciones no son comparables. La concentración promedio de IgA en suero para un mes de edad de acuerdo a lo reportado por Jolliff, es casi del doble (130  $\mu\text{g/mL}$ ) del encontrado en este estudio para bebés de la cuarta semana de edad (65.3  $\pm$  23.6  $\mu\text{g/mL}$ ), aunque en el artículo solo menciona que la muestra fue seleccionada aleatoriamente y no especifica si los pacientes eran sanos. En el caso de la IgM en suero la diferencia es al revés: Jolliff et al reportan 450  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que el promedio de concentración de esta inmunoglobulina para la cuarta semana de vida de los niños sanos estudiados aquí fue de 778.6  $\mu\text{g/mL}$ .

De acuerdo a lo que esperábamos, hubo buena correlación entre el suero y la saliva en cuanto a la concentración de IgA, pero no la hubo en las concentraciones de la IgM o la IgE. La primera estuvo virtualmente ausente en la saliva de los neonatos y la segunda en ambas muestras. Cabe resaltar, que las concentraciones de IgM en saliva en este grupo de edad no se han reportado en la literatura, y que no hay valores de referencia para IgE en neonatos en ninguna de las dos muestras, pero era de suponer que sería raro encontrarla, pues aun en adultos está ausente en suero o su concentración es muy baja.<sup>12</sup>

En la literatura, las infecciones congénitas por citomegalovirus y sífilis son las de mayor prevalencia; sin embargo, en nuestros resultados, la infección congénita de mayor frecuencia fue la toxoplasmosis (6/61), seguida por citomegalovirus con dos casos. No se encontraron neonatos infectados por algún otro de los cinco agentes etiológicos incluidos en el estudio. Lo anterior sugiere que *Toxoplasma gondii* es el agente más frecuente en México. Al respecto, recientemente se reportó que la prevalencia de *T. gondii* aumentó por lo menos 8% entre 1987 y 2000.<sup>77</sup>

Para fines de diagnóstico, definitivamente la inmunoglobulina E tanto en muestras de saliva como en suero, así como la IgM en saliva no resultan útiles para detectar casos infectados. La IgA en suero con la mejor sensibilidad, resulta ser más prometedora, además tuvo menor número de falsos positivos, seguida por la IgM en suero con resultados similares en cuanto a la sensibilidad a la IgA en saliva.

Con estos datos, nos preguntamos, ¿Por qué hay tantos falsos positivos? puede ser que otros factores que no necesariamente sean infecciosos, provoquen un aumento en las concentraciones de las inmunoglobulinas, sabiendo de antemano que las inmunoglobulinas que estamos estudiando son propias del neonato, encontramos posibles respuestas, tales como: factores genéticos, abuso de sustancias por parte de la madre, estado nutricional, higiene o inmunizaciones.<sup>26</sup> Por otro lado, los resultados de la investigación de los colombianos, sugieren que la estimulación antigénica en útero, sin que se trate necesariamente de una infección, quizás sea más frecuente entre las poblaciones pobres.<sup>11</sup> Los trabajos en donde realizan análisis en busca de niveles anormales de IgM e IgA en suero de cordón umbilical en relación con infección congénita o sepsis neonatal, son de Ferrer y McMurray quienes obtuvieron un alto número de falsos positivos, por lo que se ha propuesto que existen otros factores que intervienen en la síntesis de estas inmunoglobulinas por el feto además de las infecciones.<sup>10, 11</sup> El síndrome de hiper IgM ocasiona niveles altos de esta inmunoglobulina en neonatos, sin embargo la prevalencia de esta enfermedad es muy baja en México.<sup>78</sup>

Posteriormente, al nacer, el neonato pasa de un medio estéril dentro del útero de la madre, a otro lleno de antígenos, incluidos microorganismos de la flora normal que colonizan y proliferan en él; las vacunas como BCG y tétanos, son fuentes adicionales de antígenos. Más aun se ha demostrado que la alimentación con fórmula, durante los primeros días de lactancia, expone al neonato a sustancias inmunogénicas y por lo tanto se crean anticuerpos.<sup>71</sup> Cabe mencionar que hicimos una comparación entre niños

alimentados exclusivamente al seno materno, fórmula y combinación de ambas, sin encontrar diferencias entre los grupos.

A pesar de lo anterior nuestros resultados sugieren que la medición de la IgA en el suero y saliva de los recién nacidos, así como la medición de IgM en suero, pueden ser útiles para casos con sospecha clínica, dado los valores predictivos positivos encontrados en este grupo con una prevalencia relativamente alta de casos infectados.

Un aspecto de mayor importancia es el aumento significativo de los niveles, sobre todo de IgA, a lo largo del primer mes de vida y en particular entre la primera y la segunda semana; por lo que es muy importante aumentar el tamaño de muestra para definir puntos de corte ajustados por semana de vida, lo que posiblemente redundaría en cambios en los parámetros diagnósticos.

## **12. Conclusiones**

- Las concentraciones en la IgA en ambas muestras y de IgM en suero se incrementan a lo largo del primer mes de vida, si bien se observa un aumento brusco entre la primera y la segunda semanas en ambos casos.
- La IgA fue la única Ig para la cual existió correlación significativa entre las concentraciones en suero y saliva.
- La cuantificación de IgA en saliva podría ser una alternativa sólo cuando no es posible obtener sangre periférica.
- Las altas concentraciones de IgA, IgM o IgE, no son necesariamente indicativas de infección congénita y pueden deberse a la exposición del feto y el recién nacido a otros antígenos.
- La toxoplasmosis surgió como la infección congénita más frecuente.

## 13. Referencias

- 1) Haggerty L., TORCH: a literature review and implications for practice. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 1985;14:124-9.
- 2) Behrman R.E., Kliegman R.M., Jenson H.B. *Nelson Tratado de Pediatría.* 17ª ed., Mc Graw Hill. 2006;519-69.
- 3) González S.N., Torales T.A.N., Gómez B.D. *Infectología Clínica Pediátrica.* 7ª ed., Mc Graw Hill. 2004; 39: 525-33.
- 4) Barbi M., Binda S., Caroppo S. Diagnosis of Congenital CMV Infection Via Dried Blood Spots. *Rev. Med. Virol.* 2006;16:385-92.
- 5) Noyola D.E., Jiménez-Capdeville M.E., Demmler-Harrison G.J. Central Nervous System Disorders in Infants with Congenital Cytomegalovirus Infection. *Neurological Research.* 2010;32:278-84.
- 6) Hay W.W., Levin M.J., Sondheimer J.M., Deterding R.R. *Current. Diagnosis & Treatment in Pediatrics.* 18<sup>th</sup> ed. Lange. 2007;36:1120-3.
- 7) Ludwig A., Hengel H. Epidemiological Impact and Disease Burden of Congenital Cytomegalovirus Infection in Europe. *Eurosurveillance.* 2009;14:1-7.
- 8) Vela M., Gamboa S., Loera A., Aguirre B., Pérez G., Velázquez A. Neonatal screening for congenital hypothyroidism in México: Experience, obstacles, and strategies. *J Med Screen.* 1999;6:77-9.
- 9) Barba E.J.R. Tamiz neonatal: Una estrategia en la medicina preventiva. *Rev Mex Patol Clin.* 2004;51:130-44.
- 10) Ferrer-Montoya R., Vázquez-Estrada A.C., Fortún-deSoto T., Ferrándiz-Guerra S. Niveles de inmunoglobulinas IgA e IgM en recién nacidos y correlación con infección congénita. *Rev Cubana Pediatr.* 1998;70:11-6.
- 11) McMurray D.N., De Aly A.C., Rey H. Serum IgM as an indicator of intrauterine Infection in colombian newborns. *Bol Of Sanit Panam* 1981;91:471-83.
- 12) Correa D., Cañedo-Solares I., Ortiz-Alegría L.B., Caballero-Ortega H., Rico-Torres C.P. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol.* 2007;29:651-60.
- 13) Feldman D. M., Timms D., Borgida A. F., Toxoplasmosis, Parvovirus, and Cytomegalovirus in Pregnancy. *Clin Lab Med.* 2010;30:709–20.
- 14) Juárez-Figueroa L.A., Meléndez-Betancourt L.A., Conde-González C.J. Sífilis en mujeres con embarazo a término de Cuernavaca, México. *Rev Invest Clin.* 2001;53:375-7.

- 15) Valdespino J.L., Conde-González C.J., Olaiz-Fernández G., Palma-Act O., Sepúlveda J. Prevalencia en México de la infección y el estado de portador de la hepatitis B en adultos. *Salud Pública Mex.* 2007;49:404-11.
- 16) DGE. 2011. Información de morbilidad 2008. Versión ejecutiva. Secretaría de Salud.
- 17) Noyola D.E., Mejía-Elizondo A.R., Canseco L.J., Allende R.C., Hernández A.S., Alba E., Ramírez J.Z. Congenital cytomegalovirus infection in San Luis Potosí, México. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:89-90.
- 18) Vela-Amieva M., Cañedo-Solares I., Gutiérrez-Castrellón P., Pérez-Andrade M., González-Contreras C., Ortiz-Cortés J., Ortega-Velázquez V., Galván-Ramírez M.L., Ruiz-García M., Saltigeral-Simentel P., Ordaz-Favila J.C., Sánchez C., Correa D. Neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in México. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:142-4.
- 19) Hernández-Trejo M., Hernández-Prado B., Uribe-Salas F., Juárez-Figueroa L., Conde-González C.J. Maternal and congenital syphilis in two Mexican hospitals: evaluation of a rapid diagnostic test. *Rev Invest Clin. México.* 2006;2:119-25.
- 20) Conde-González C.J., Valdespino J.L., Juárez-Figueroa L.A., Palma O, Olamendi-Portugal M., Olaiz-Fernández G., Sepúlveda J. Prevalencia de anticuerpos anti-treponémicos y características sociodemográficas en población mexicana adulta en el año 2000. *Salud Pública Mexico.* 2007;49:412-20.
- 21) Cantey J.B., Sánchez P.J. Overview of congenital infections: the prominence of cytomegalovirus. *Infect Disord Drug Targets.* 2011;11:426-31.
- 22) Correa-Beltrán MD, Castillo-Cruz RA, Figueroa-Damián R, Noyola DE. Infecciones congénitas: TORCH y varicela zóster. *Neonatología, Esencia, Arte y Praxis.* McGraw Hill México D.F. 2011. pp. 414-8.
- 23) Games-Eternod J., Solórzano-Santos F. Guía para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas. 1ª. ed México D.F., 1991. Pp. 331.
- 24) Shulman S.T., MacKendrinck W.P., Stamos J.K. Handbook of pediatric infectious diseases and antimicrobial therapy. Mosby-Year Book, Inc. Saint Louis, MO, EUA, 1993. Pp. 434.
- 25) Gomila A., Rivas N., López E.L. Infección congénita por citomegalovirus. *An. Pediatr. (Barc).* 2008;69:311-5.
- 26) Durán L.E., Saénz C.F., Pérez J., López A., Santano M.R., González-Meneses A. Deficiencias: Medidas preventivas durante el período Neonatal. *Vox Paediatrica.* 1999;7:81-90.
- 27) Workowski K., Levine W. Sexually transmitted diseases treatment guidelines *MMWR.* 2002;51:1-79.
- 28) Jong E.P., Haan T.R., Kroes A.C., Beersma M.F., Oepkes D., Walther F.J. Parvovirus B19 infection in pregnancy. *J. Clin. Virol.* 2006;36:1-7.

- 29) Brkic S., Bogavac M.A., Simin N., Hrnjakovic-Cvetkovic I., Milosevic V., Maric D. Unusual high rate of asymptomatic maternal parvovirus B19 infection associated with severe fetal outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24:647-9.
- 30) Abarca K. Vertically transmitted infections in the pregnant woman. *Rev Chil Infect.* 2003;20:41-6.
- 31) Guerina N.G., Hsu H.W., Meissner C., Maguire J.H., Lynfield R., Stechenberg B., Abroms I., Pasternack M.S., Hoff R., Eaton R.B., Grady G.F., and The New England Regional Toxoplasma Working group. Neonatal serologic England Journal of Medicine. 1994;30:1858-63.
- 32) Gutiérrez M.J., Albores A. M.J., Solórzano G. E., Venta S. J.A., Gutiérrez C. M. Infección congénita por citomegalovirus. Pautas para su diagnóstico. *Rev. Mex. de Pediatría.* 1999; 66: 203-8.
- 33) Correa-Beltrán M.D., Figueroa-Damián R. Infecciones Congénitas y Perinatales. Una visión integral. Capítulo 3. Diagnóstico de infecciones congénitas y perinatales por pruebas de laboratorio. Editorial Médica Panamericana. México D.F. 2014. Pp. 17-23.
- 34) Delves J, Roitt IM. The immune system (first of two parts). *N Engl J Med.* 2000;343:37-49.
- 35) Press C., Montoya J.G., Remington J. Use of a single serum sample for diagnosis of acute toxoplasmosis in pregnant women and other adults. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3481-3.
- 36) Hernández J.L., Vela M. et al. En preparación.
- 37) Jolliff C.R., Cost K.M., Stivirins P.C., Grossman P.P., Craig R., Franco S.M., Reference intervals for serum IgG, IgA, IgM, C3, and C4 as determined by rate nephelometr. *Cun. Chem.* 1982;28:126-8.
- 38) Boersma E.R., Serum immunoglobulins IgG, IgM and IgA in maternal cord blood pairs from infants of normal and low birthweights in Tanzania, *Arch. Dis. Childhood,* 1981;56:31-5.
- 39) Soria-Villa R., Reyna-Figueroa J., Lara-Sánchez J., Cérbulo-Vázquez A., Ortiz-Ibarra F.J. Evaluación de los valores de inmunoglobulinas y de complemento en una población de recién nacidos sanos mexicanos, *Revista de enfermedades infecciosas en Pediatría. Medigraphic Artemisa.* 2005;73:8-12.
- 40) Garrigues P., Barth H., Walker C., Narbonne J.F. Biomarkers; A Practical Approach. Elsevier Science. 2001. Pp. 550.
- 41) Murph J.R., Souza I.E., Dawson J.D., Benson P., Petheram S.J., Pfab D., Gregg A., O'Neill M.E., Zimmerman B., Bale J.F. Epidemiology of congenital cytomegalovirus infection: maternal risk factors and molecular analysis of cytomegalovirus strains. *Am J Epidemiol.* 1998;147:940-7.
- 42) Reynolds D.W., Stagno S., Stubbs K.G., Dahle A.J., Livingston M.M., Saxon S.S. Alford C.A. Inapparent congenital cytomegalovirus infection with elevated cord IgM

- leves. Casual relation with auditory and mental deficiency. N Engl J. Med 1974;6:291-6.
- 43) Gotoff S.P., Gadzala C., Ying R.L., Wendell P.W. Relationship of neonatal IgM values to congenital abnormalities and mental retardation. J Pediatr. 1971;78:102.
- 44) Rosso F., Agudelo A., Isaza A., Montoya J.G. Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo Colomb Med. 2007;38:316-37.
- 45) Pinon J.M., Dumon H., Chemla C., Franck J., Petersen E., Lebech M. Strategy for diagnosis of congenital infections. Evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. J Clin Microbiol. 2001;39:2267-71.
- 46) Montoya J.G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. J Infect Dis. 2002;185:73-82.
- 47) Remington J.S, McLeod R., Thulliez P., Desmots G. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2006;947-1092.
- 48) Decoster A., Slizewicz B., Simon J., Bazin C., Darcy F., Vittu G., Boulanger C., Champeau Y., Demory J.L., Duhamel M., Capron A. Platelia-Toxo IgA, a New Kit for Early Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis by Detection of Anti-P30 Immunoglobulin A Antibodies. Journal of Clinical Microbiology. 1991;29:2291-5
- 49) Decoster A., Gontier P., Dehecq E., Demory L., Duhamel M. Detection of Anti-Toxoplasma Immunoglobulin A Antibodies by Platelia-Toxo IgA Directed against P30 and by IMx Toxo IgA for Diagnosis of Acquired and Congenital Toxoplasmosis. Journal of Clinical Microbiology. 1995;33:2206–8
- 50) Bessieres M.H., Roques C., Berrebi A., Barre V., Cazaux M., Seguela J.P. IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. J Clin Pathol. 1992;45:605-8.
- 51) Pinon J.M., Chemla C., Villena I., Foudrinier F., Aubert D., Puygauthier - Toubas D., Leroux B., Dupouy D., Quereux C., Talmud M., Trenque T., Potron G., Pluot M., Remy G., Bonhomme A. Early Neonatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Value of Comparative Enzyme-Linked Immunofiltration Assay Immunological Profiles and Anti-*Toxoplasma gondii* Immunoglobulin M (IgM) or IgA Immunocapture and Implications for Postnatal Therapeutic Strategie. Journal of Clinical Microbiology. 1996; 34:579–83.
- 52) Moretti E., Basso B., Gil P., Vaca B., Josefina J., Yasenzanero P., Detección de anticuerpos para chagas y toxoplasmosis en trasudado mucoso oral. Acta Bioquím Clín Latinoam 2004;38:159-63.
- 53) Llena C. The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11:449-55.
- 54) Wong D.T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. J Am Dent Assoc. 2006;137:313-21.

- 55) Segal A. and Wong D.T. Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. *Eur J Dent Educ.* 2008;12:22–9.
- 56) Nagler R.M. Review Saliva as a tool for oral cancer diagnosis and prognosis *Oral Oncology* 45 (2009) 1006–1010
- 57) Matos N., Katsurayama M., Hironmichi F., Olivera L., Paredes E., d'Avila M., Dos-Santos C. Psychological stress and its influence on salivary flow rate. Total protein concentration and IgA, IgG and IgM titers. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17:396-404.
- 58) Smith D., Joshipura K., Kent R., Taubman M.A, Effect of age on Immunoglobulin content and volume of human labial gland saliva. *J Dent Res.* 1992;71:1891-4.
- 59) Jafarzadeh A., Sadeghi M., Karam G.A., Vazirinejad R. Salivary IgA and IgE levels in healthy subjects: relation to age and gender. *Braz Oral Res.* 2010;24:21-7.
- 60) Loyola A.M., Durighetto Jr. A.F., Silva D.A.O., Mineo J.R. Anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulins A and G in human saliva and serum. *J Oral Pathol Med.* 1997;26:187-91.
- 61) Nokes D.J., Enquesselassie F., Nigatu W., Vyse A.J., Cohen B.J., Brown D.W., et al. Has oral fluid the potential to replace serum for the evaluation of population immunity levels? A study of measles, rubella and hepatitis B in rural Ethiopia. *Bull World Health Organ.* 2001;79:588-95.
- 62) Zmuda J.F., Wagoneer B., Liotta L., Whiteley G. Recognition of multiple classes of hepatitis C antibodies increases detection sensitivity in oral fluid. *Clin Diagn Lab Immuno.* 2001;8:1267-70.
- 63) Casariego Z. J. Inmunología de la mucosa oral: Revisión Av. *Odontoestomatol.* 2012; 28;5: 239-48.
- 64) Walter D.M., Oral mucosa Immunology. An overview. *Ann Acad Med Singapore* 2004;33:278-305.
- 65) Corthesy B., Spertini F. Secretory Immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol Chem* 1999;380:125-62.
- 66) Tristram G, Parslow MD. Inmunoglobulinas y sus genes. *Inmunología Básica y Clínica.* 9a ed. México: El Manual Moderno; 1998. Pp. 787-818.
- 67) Seidel M.B., Schulze B., Kiess W., Vogtmann C., Borte M. Determination of Secretory IgA and Albumin in Saliva of Newborn Infants. *Germany Biol Neonate* 2000;78:186–90.
- 68) Seidel M.B., Schubert S., Schulze B., Borte M. Secretory IgA, free secretory component saliva of newborns infants. *Germany Early Human Development.* 2001; 62:159–64.
- 69) Tomasello E., Arevalo L., Fuenzalida M.E., Torres E. Estudio de niveles de inmunoglobulina A secretora en secreción salival de niños sanos. *Rev. chil. Pediatr.* 1981;52:227-32.

- 70) Besné A. Comunicación personal. Laboratorio de Inmunología Experimental. Instituto Nacional de Pediatría. México, 2012.
- 71) Chacón M.R., Flores M.E., Rodríguez D., Valles L., Petrola C., Torres A., Pacheco M., Castro L. Niveles de inmunoglobulina A secretora en saliva en una población sana del Estado de Carabobo Venezuela. *Salus online*.2004;8:8-16.
- 72) Stephens S, Development of secretory immunity in breast fed and bottle fed infants, *Archives of Disease in Childhood*, 1986;61:263-9.
- 73) Weemaes C., Klasen I., Goertz J., Beldhuis-Valkis M., Olafsson O., Haraldsson A. Development of Immunoglobulin A in Infancy and Childhood. *Scandinavian Journal of Immunology* 2003;58:642–8.
- 74) Tapia C., Quiroga T. Valores de referencia de inmunoglobulina A secretora (IgAs) en saliva de niño sano. *Rev. Chil. Pediatr.* 1998;69;72-6.
- 75) Giragossian C., Clark T., Piché-Nicholas N., Bowman C.J. Neonatal Fc receptor and its role in the absorption, distribution, metabolism and excretion of immunoglobulin G-based biotherapeutics. *Current Drug Metabolism*. 2013;14: 764-90.
- 76) Gilbert R.E., Thalib L., Tan H.K., Paul M., Wallon M., Petersen E. European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis. Screening for congenital toxoplasmosis: accuracy of immunoglobulin M and immunoglobulin A tests after birth. *J Med Screen*. 2007;14:8-13.
- 77) Caballero-Ortega H., Uribe-Salas F.J., Conde-Glez C.J., Cedillo-Pelaez C., Vargas-Villavicencio J.A., Luna-Pastén H., Cañedo-Solares I., Ortiz-Alegría L.B., Correa D. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans Roy Soc trop Med Hyg*. 2012; 106: 653-9.
- 78) García-Cruz M.L, Camacho R., Ortega-Martell J.A., Berron-Pérez R., Espinosa-Rosales F., Hernández-Bautista V., Rojas-Garrido A. Registro de inmunodeficiencias primarias en pacientes mexicanos en una institución de tercer nivel: experiencia de 30 años. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. 2002;11:48-66.