

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

El tamizaje neonatal de enfermedades infecciosas constituye una línea de investigación llevada a cabo por la unidad de Inmunopatología de Enfermedades Tropicales del Departamento de Citohistología en conjunto con la Unidad de Inmunodiagnóstico del Laboratorio Microbiológico de Referencia –LAMIR- y esta forma parte de una tendencia creciente de estudios orientados a un diagnóstico temprano de determinadas infecciones, previo a la aparición de síntomas.

En este estudio se realizó la adaptación de un método ELISA a la metodología de tamizaje neonatal de sífilis y Citomegalovirus para lo cual se recolectaron sueros IgM positivos en diferentes laboratorios clínicos de la ciudad de Guatemala. Esta primera parte se realizó en el laboratorio del departamento de citohistología/ LAMIR de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Posteriormente se realizó la recolección de muestras de neonatos en las áreas seleccionadas. Para ello se realizaron capacitaciones para la toma de muestra en los centros de Salud de Cuilapa Santa Rosa, Conguaco Jutiapa, Jalapa, Cooperativa “El Recuerdo” Jalapa y Hospital Nacional de Zacapa.

Se recolectaron un total de 396 muestras en papel filtro correspondientes a neonatos los cuales fueron evaluados en el laboratorio del Departamento de Citohistología/LAMIR de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala en búsqueda de anticuerpos IgM anti *Treponema pallidum* y anti – Citomegalovirus, con el fin de identificar infecciones congénitas por estos agentes infecciosos.

II. RESUMEN

Las infecciones primarias por Citomegalovirus (CMV) son benignas para la mayoría de las personas, sin embargo durante el embarazo, la infección primaria, la reactivación o la reinfección con diferentes tipos virales, pueden causar una infección neonatal sintomática o una infección congénita subclínica, la cual más adelante puede manifestarse con pérdida de la audición o trastornos del aprendizaje (1-4).

La sífilis congénita es el resultado de la transmisión de la infección por vía perinatal al feto de la gestación. La infección se puede transmitir al feto durante cualquier etapa del embarazo pero la probabilidad de una enfermedad clínica aumenta a medida que éste se va desarrollando. Las complicaciones más frecuentes son abortos, mortinatos, partos prematuros y muertes neonatales en aproximadamente 50% de los fetos expuestos y sífilis congénita en el otro 50% (5).

El tamizaje neonatal permite detectar neonatos portadores de alguna patología endocrina, infecciosa o metabólica antes de que la enfermedad se manifieste, dichas patologías pueden ocasionar retraso mental, minusvalías o muerte prematura. En lo que respecta a enfermedades infecciosas como CMV y sífilis se ha planteado la posibilidad del tamizaje serológico durante la gestación, en búsqueda de la aparición de IgM materna como un diagnóstico de infección activa, sin embargo, la utilidad de esta detección es discutible respecto al pronóstico y seguimiento del niño debido a infecciones iniciadas post tamizaje materno. El tamizaje neonatal asegura la detección temprana de determinadas infecciones en el neonato, procurando así mejor pronóstico en el tratamiento.

En este estudio se adaptó un método para la detección de anticuerpos IgM anti- *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) y un método para la detección de anticuerpos IgM anti- Citomegalovirus (CMV) en muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro. Para ello se evaluó 3 eluyentes distintos (amortiguador fosfato salino PBS 0.05M, amortiguador Seroalbúmina y diluyente

del kit), 2 temperaturas (25°C y 36°C), 3 tiempos de elución (1, 18 y 24 hrs.) 2 diferentes pozos de elución (pozos de reacción y pozos planos) y 2 diámetros distintos de muestra (3mm y 6mm).

Para la metodología de detección de anticuerpos anti - *T. pallidum* los mejores resultados fueron obtenidos con el amortiguador fosfato salino PBS 0.05M, 6mm de diámetro de muestra, 36°C y una hora de tiempo para la elución de los anticuerpos. Al evaluar la validez del método se encontró un 100% de sensibilidad relativa y 100% de especificidad relativa. En el caso de la detección de anticuerpos anti- CMV los mejores resultados fueron encontrados cuando se utilizó amortiguador fosfato salino PBS 0.05M, 6mm de diámetro de muestra, una hora de elución pero la temperatura óptima fue a 25°C con rotación constante. La metodología presenta una sensibilidad relativa de 100% y especificidad relativa de 100%.

Con esta metodología adaptada se realizó el tamizaje neonatal en 396 neonatos provenientes de 5 centros de salud y hospitales del interior de la república de Guatemala. No se encontró ninguna muestra positiva para anticuerpos IgM anti-*T. pallidum* ni para anticuerpos anti CMV, por lo que la frecuencia encontrada fue de 0%. Los anticuerpos IgG anti – CMV detectados en las muestras séricas de los recién nacidos les dio protección evitando el desarrollo de la infección intrauterina.

Se concluye que ambos métodos cumplen con las características mínimas de un buen método de tamizaje. Ya que se trata de un estudio piloto es necesario ampliar el universo de la muestra para establecer la frecuencia de *T. pallidum*, y CMV. Es necesario realizar un estudio donde todas las muestras se evalúen por ambos métodos (tamizaje y confirmatorio) para así establecer los valores predictivos positivos y negativos.

III. ANTECEDENTES

A. Citomegalovirus

1. Historia

En 1904 Jesionek y col. describieron por primera vez la presencia de cuerpos intranucleares y alargamiento celular en vísceras de recién nacidos. En 1921 Goodpasture y Talbot introdujeron el término citomegalia y lo compararon al efecto histopatológico causado por la varicela. Posteriormente en 1926, Glahn y Pappenheimer hicieron el primer reporte de células citomegálicas en adultos postulando que se trataba de una patología viral, pero fueron Cole y Kuttner quienes aislaron el virus de las glándulas salivales de cabras. El conocimiento del virus causante de la citomegalia avanzó cuando en 1954 Smith llevó a cabo los primeros cultivos seriados (6).

Durante los primeros años del siglo anterior, el citomegalovirus (CMV) fue reconocido por los cambios citopáticos que producía a nivel intracelular en las glándulas salivares. En 1956 fue aislado por primera vez en tres laboratorios distintos, siendo Weller quien le dio el nombre con el cual se le conoce actualmente. En 1966, se demostró que era el agente causal del síndrome mononucleósico post-transfusional y en la década del 70-80 surgió como una de las principales causas de morbi mortalidad en pacientes inmunosuprimidos por trasplante de órganos, de medula ósea o con SIDA. En 1972 Yeager y col. describieron el primero de dos casos de lactantes de bajo peso al nacer con infección por CMV adquirida por transfusiones sanguíneas. Dos años más tarde, se demostró que 19 de 77 lactantes quienes fueron transfundidos con sangre se infectaron con CMV. A partir de estos primeros hallazgos se demostró que la incidencia de infección por CMV asociada a transfusión sanguínea variaba entre 15- 30% en pacientes sometidos a productos sanguíneos, en particular los que contenían una elevada concentración de leucocitos (6, 7).

2. Etiología

El CMV pertenece a la familia de los virus herpes, que incluye al virus del herpes simple, virus varicela- zoster y virus de Epstein-Barr. El CMV es icosaédrico con diámetro de 180-200 nanómetros, cápside de 162 capsómeros y un ácido desoxirribonucleico (ADN) bicatenario que consiste en una doble hélice que contiene genoma de 1×10^8 daltons. Las partículas virales o cápsides están rodeadas por una envoltura y algunos de sus núcleos (8).

Se ha aislado de distintos fluidos orgánicos y células: orina, heces, saliva, semen, secreción del cuello uterino, leche materna y linfocitos (9).

3. Patogenia e inmunidad

a. Patogenia

La infección por el CMV se produce por tres vías diferentes: infección primaria, reactivación de una cepa latente y re-infección por una cepa externa. Solo una pequeña parte de estas infecciones es sintomática. La aparición de síntomas está determinada, principalmente por la situación inmunitaria del hospedador (1).

La infección se contrae por vía respiratoria, produciendo un cuadro clínico tipo mononucleósico, caracterizado por fiebre y adenopatías, Aunque la mayoría de las veces la primoinfección puede ser asintomática; la infección pasa luego en una fase de latencia, pudiendo presentar episodios de reactivación, los cuales son más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos (5).

Al penetrar al organismo, el CMV infecta a los linfocitos y leucocitos y se disemina por todo el cuerpo en el interior de estas células, las cuales pueden infectarse por partículas virales libres o a través del contacto con otras células (8).

El CMV al infectar las células produce un agrandamiento en ellas de hasta cuatro veces su tamaño normal (citomegalia), además de inclusiones intranucleares, llamadas inclusiones de Cowdry A, rodeadas de un halo intranuclear que les da la característica de "ojo de búho", a lo que se debe su nombre (7).

Esta enfermedad tiene la particularidad de dañar múltiples órganos y principalmente al sistema nervioso central (SNC) en los recién nacidos. Como consecuencia de esto afecta el neurodesarrollo y es causa de una elevada mortalidad que puede llegar a ser de 20 -30% (10).

b. Inmunidad

Como respuesta a la infección primaria se producen anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA que por sí mismos no confieren protección frente al CMV. Es la respuesta celular mediada por linfocitos citocidas naturales (NK) y sobre todo por los linfocitos T citotóxicos (LTC) los que consiguen el control de la infección primaria, de esta manera el CMV queda en estado de latencia permanente en células circulantes. Los anticuerpos IgM son detectables de 7 a 12 días después de la infección inicial y por lo general persisten por 3 a 4 meses. Los anticuerpos IgG aparecen al mismo tiempo, alcanzando su máximo 2 a 3 meses después de la infección y persisten por muchos años, a menudo de por vida (5, 11).

4. Citomegalovirus Congénito

Las infecciones primarias por CMV son benignas para la mayoría de las personas. Durante el embarazo, la infección primaria, la reactivación o la reinfección con diferentes tipos virales, pueden causar una infección neonatal sintomática o una infección congénita subclínica, que más tarde puede manifestarse con pérdida de la audición o trastornos del aprendizaje (1 - 4).

Cuando la infección intrauterina ocurre durante los primeros 6 meses de embarazo hay una infección primaria, siendo el peligro de infección prenatal del 30 – 40%, con un riesgo de 10 – 15% de anomalías durante el embarazo. Si ocurriera una reactivación del virus durante este período, el riesgo de infección fetal es menor, 0.2 al 1.8%, pero sigue siendo significativo teniendo una baja mortalidad por el efecto protector de los anticuerpos maternos. Es importante mencionar que durante el período de lactancia también existe un riesgo de transmisión de la infección, especialmente en los recién nacidos prematuros. La transmisión de la infección por medio de estas diferentes maneras representan factores de riesgo para el desarrollo postnatal del niño (1, 2).

El momento de la infección parece determinar el grado de afección; las lesiones más graves suelen encontrarse en infecciones previas a las 20 semanas de gestación, no obstante es más frecuente antes del tercer trimestre. En pacientes seropositivos, el riesgo de reactivación se produce por compromiso de la inmunidad celular, lo que se puede observar en pacientes inmunocomprometidas tales como pacientes con VIH positivo, oncológicas, o en tratamiento con inmunosupresores (2, 12).

a. Manifestaciones clínicas

De los recién nacidos infectados el 90% son asintomáticos, de los cuales solo un 15% presentará algún grado de déficit neurológico a largo plazo. El 10% restante de los infectados son sintomáticos y presentan la enfermedad por una inclusión citomegálica, la cual es consecuencia de una replicación viral en los órganos vitales fetales, aunque remite espontáneamente, induce daños que pueden persistir y ocasionar secuelas graves a largo plazo, las cuales se caracterizan por restricción del crecimiento fetal (RCF), microcefalia, ictericia, trombocitopenia, hepatoesplenomegalia, sordera, coriorretinitis, neumonitis, púrpura y lesiones de tipo blueberry muffin. Histológicamente demuestran eritropoyesis dérmica (hematopoyesis extramedular), la hidrocefalia y las calcificaciones intracraneales son signos de mal pronóstico. Un tercio de los

recién nacidos infectados pertenecientes a este grupo fallece y casi dos tercios de estos presentan secuelas neurológicas importantes. Cabe mencionar que la primoinfección tiene mayor riesgo de infección congénita sintomática y como se menciona anteriormente, tiene una mayor tasa de transmisión vertical, entonces este grupo se convierte en el grupo con mayor morbimortalidad neonatal (1, 13, 14).

5. Diagnóstico

a. Diagnóstico clínico

Desde el punto de vista neurológico, la enfermedad por citomegalovirus humano (CMVH), se caracteriza por las siguientes manifestaciones: microcefalia, hipoacusia, trastornos motores, retardo mental y convulsiones. La infección congénita no siempre es reconocida por los médicos, los cuales son los primeros en tener contacto con los pacientes, sobre todo porque las manifestaciones pueden variar según la edad en la que los niños son vistos por primera vez (10).

El hecho de que la embarazada haya presentado durante la gestación una amenaza de aborto o bien un síndrome parecido a mononucleosis, o que al nacer el neonato sea prematuro o de bajo peso, con microcefalia, ictericia, hepatoesplenomegalia o sepsis sin microorganismo aislado pueden ser datos orientadores para pensar en el diagnóstico de infección congénita por CMVH. Por todo esto el diagnóstico suele ser difícil y el abordaje multidisciplinario se defiende con frecuencia (10).

b. Diagnóstico de laboratorio

La infección por CMV se da con mayor frecuencia de manera asintomática por lo que el laboratorio cumple una función esencial en la confirmación de la infección congénita por CMV en el recién nacido. El diagnóstico de una primoinfección materna se realiza mediante la presencia en sangre de anticuerpos IgM o IgG anti-citomegalovirus (1).

Actualmente el diagnóstico por CMV congénito se realiza a través de la detección de virus en la orina o saliva de los neonatos dentro de las dos primeras semanas de vida, ya que la excreción posterior a estos días podría ser secundaria a una infección postnatal (15).

Este se lleva a cabo sembrando las muestras de orina y saliva en monocapas de fibroblastos crecidas en cubreobjetos (shell -viales), procediendo, posteriormente, a la fijación y tinción mediante anticuerpos monoclonales específicos para detectar el antígeno de CMV (16).

El método de diagnóstico ideal es el cultivo viral, sin embargo, cada día se utiliza con una mayor frecuencia la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a través de la amplificación del ADN viral, resultando ser un método muy sensible (15).

i. Detección de anticuerpos

La serología es la prueba de referencia diagnóstica. La demostración de seroconversión es el método más fiable para el diagnóstico de una primoinfección y este se basa en la demostración de una seroconversión simultánea o un cambio serológico importante (cuádruplo o mayor) que refuerza la relación causal del virus y el trastorno clínico (16, 17).

Entre los métodos que se aplican para la detección de anticuerpos se pueden mencionar:

-Fijación de complemento: Detecta conjuntamente anticuerpos IgG e IgM, poco sensible y muy laborioso.

-Inmunofluorescencia indirecta: Es más sensible que la fijación de complemento, permite la detección individualizada de distintos tipos de anticuerpos, pero genera falsos positivos por la presencia de receptores Fc, inducidos por el CMV, en células infectadas que sirven de sustrato unigénico de la reacción.

-Aglutinación con partículas de látex sensibilizadas con antígeno de CMV: permite la detección de IgG e IgM. Es sensible, específica, sencilla y de rápida ejecución.

-Métodos inmunoenzimáticos: Método muy sensibles, en general son específicos y permiten cuantificar y determinar de forma individual los niveles de diferentes de isotipos de anticuerpos (18, 19).

La detección serológica de IgM específica para CMV es útil para identificar infecciones recientes y esto puede ser demostrado durante la fase aguda de la infección primaria de CMV. La aparición rápida de anticuerpos específicos, fijadores de complemento durante la enfermedad apoya el diagnóstico. Títulos de anticuerpos de fijación de complemento mayor que 1:8 en el lactante con unos 6 meses de edad indica una infección activa, mas que una transferencia pasiva de anticuerpo materno. También se demuestra la presencia de macroglobulinas específicas del CMV en lactantes infectados congénitamente, usando un método de inmunofluorescencia indirecta (15).

ii. Detección del virus

Los métodos de detección de antígenos proporcionan una detección rápida, específica y fiable de antígenos virales en casi cualquier líquido corporal obtenido del paciente (16).

-Citometría de flujo: Técnica de gran utilidad para un diagnóstico rápido y para el monitoreo del tratamiento de las personas con la enfermedad (8).

-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Técnica que detecta y amplifica el material genético del virus. La PCR ha sido útil para el diagnóstico clínico desde mediados de 1980, esta prueba ha impedido la recurrencia de la enfermedad, ya que ha permitido el diagnóstico temprano y monitoreo de la eficacia de la droga anti-CMV (8).

-El uso de anticuerpos monoclonales de los antígenos iniciales de CMV unidos a preparados de antiglobulina, inoculados, marcados, aplicados en ampollitas cubiertas y centrifugadas, puede permitir la detección rápida y específica del virus (15).

6. Tratamiento

El tratamiento de la infección ocasionada por este virus es un problema complejo, ya que por el momento, no existe un tratamiento eficaz, que no produzca efectos secundarios y se pueda administrar a las mujeres embarazadas. Según Vaulloup-Fellous, el cual realizó una revisión bibliográfica del virus publicada en el año 2008, se están llevando a cabo algunos ensayos clínicos, los cuales evalúan la eficacia virológica de Valaciclovir y que recientemente unos autores han publicado un estudio preliminar, según el cual la inyección de inmunoglobulinas sería eficaz en la prevención y tratamiento de la infección fetal por el virus (13, 19).

Estudios recientes han encontrado tres compuestos antivíricos que poseen una actividad eficaz frente al CMV, los cuales son: el ganciclovir, foscarnet y cidoforir, siendo el ganciclovir el más utilizado. Los tres compuestos inhiben la síntesis del ADN del CMV actuando sobre la ADN polimerasa viral. El ganciclovir trifosfatado es un inhibidor competitivo del substrato natural de la ADN polimerasa del CMV y se incorpora al ADN viral. El foscarnet, al contrario, es un inhibidor no competitivo y reversible de la ADN polimerasa del CMV que no requiere activación intracelular para desarrollar su efecto antiviral y que no se incorpora a la cadena de ADN viral. Por último, es cidoforir, al igual que el ganciclovir, debe ser fosforilado para ser activo, es un inhibidor competitivo de la ADN polimerasa del CMV y se incorpora al ADN vírico. La diferencia con el ganciclovir, es que la fosforilación de éste se realiza exclusivamente por enzimas celulares, mientras que en la fosforilación del cidoforir es realizada primariamente por una enzima vírica (20, 21).

Estos antivíricos no pueden administrarse a mujeres embarazadas por producir efectos teratógenos, por lo cual no se recomiendan durante el embarazo (20, 21).

Cuando se diagnostica con certeza una primoinfección materna por CMV, el feto debe ser objeto de vigilancia ecográfica (1, 13).

Los recién nacidos infectados por CMV congénita sintomática pueden ser tratados con Ganciclovir intravenoso. El tratamiento tiene probabilidad de preservar la audición normal o disminuir la hipoacusia secuelar. La toxicidad de este medicamento es frecuente y puede manifestarse como un neutropenia severa lo que requiere la interrupción del tratamiento o reducción de la dosis (22).

7. Prevención y control

Las principales vías de prevención para contagio de CMV son la sexual, trasplantes de tejidos y la transfusión de sangre. El semen representa un vector fundamental para la diseminación sexual del virus durante contactos tanto heterosexuales como homosexuales, por lo que es de suma importancia el uso de preservativo. El CMV se transmite de una persona a otra por medio de la saliva, secreciones vaginales, sangre, heces fecales y la leche materna. Se puede controlar la transmisión de CMV al lavarse las manos después del contacto con estos fluidos y evitar el contacto oral con saliva u objetos cubiertos con saliva (5).

Los recién nacidos necesitan protección contra las enfermedades citomegálicas y la inmunización materna puede permitir esta protección, ya que los recién nacidos que adquieren el CMV, ya sea por vía posnatal o transplacentaria, están protegidos contra la enfermedad si su madre adquirió anticuerpos antes del embarazo. Las medidas preventivas que deben tenerse en cuenta para el control de esta afección son: lavado de manos después de manipular pañales del recién nacido (23, 24).

8. Epidemiología

En el año 1968 la prevalencia de anticuerpos contra este virus era baja en Europa, Australia y algunas partes de Norte América, pero significativamente alta en países subdesarrollados del continente africano, suroeste de Asia y Latinoamérica. Se aproximaba que más del 50% de los adultos de 18 a 25 años tenían anticuerpos contra el CMV y más del 80% de las personas de más de 35 años presentan anticuerpos contra el virus (25).

En un estudio realizado en Madrid, España, en el año 2001, se determinó que la seroprevalencia global de pacientes estudiados que presentaron IgG positivo para CMV fue del 62.8%, obteniendo un 66.7% en paciente femeninos y un 58.4% en pacientes masculinos (26).

En 1985, Stagno y Whitley estimaron el porcentaje materno de adquirir tanto la infección primaria como la recurrente así como también el riesgo de transmisión intrauterina al feto dividiendo a las mujeres en dos grupos: nivel socioeconómico alto y bajo. En ambos grupos, la transmisión al feto ocurre en 40% de los casos, con el 10-15% de recién nacidos con síntomas y 85% de ellos con enfermedad congénita (27).

En Guatemala se han llevado a cabo estudios sobre la frecuencia de la infección por CMV, Ramírez refiere en su tesis que el primer trabajo se realizó en 1965, donde se describieron los primeros 6 casos de enfermedad citomegálica en niños que fallecieron (21).

En el año de 1973, Beargie y Trent encontraron una prevalencia de 1.5%, en una población de recién nacidos sépticos en el Hospital Roosevelt de Guatemala (20).

En 1982, en un estudio llevado a cabo por Recinos durante los meses de enero a mayo en el Hospital General San Juan de Dios, se determinó que de 84 casos de neonatos el 2% eran positivos para CMV IgM y 2.69% para IgG.

Además se obtuvieron datos de 210 mujeres adultas, de las cuales 5% fue positivo para IgM y 25% para IgG (20).

En 1986, Ramírez reportó que en 48 embarazadas que acudieron al hospital General San Juan de Dios se encontró una prevalencia del 64.5% a CMV. En el año 1995, Torselli concluyó que existe una alta prevalencia de infección por CMV, ya que en 100 mujeres del servicio de post-parto inmediato del hospital Roosevelt, encontró que el 97% eran portadoras de anticuerpos IgG contra CMV (21, 28).

En el año 2003, Juárez concluye que de 373 donadores que asistieron al Banco de Sangre del hospital General San Juan de Dios, 264 fueron positivos para IgG anti-CMV y 81 fueron positivos para IgM anti-CMV. En el año 2006, Lucero reportó que 98% de mujeres que acudieron a su control prenatal en el hospital Roosevelt eran seropositivas para CMV IgG (8, 29).

B. Sífilis

1. Historia

El origen de *Treponema pallidum* es incierto, la enfermedad no apareció en forma prominente en Europa hasta el siglo XVI. El primer indicio de la enfermedad se encontró en una momia del renacimiento al identificar las estructuras de *T. pallidum* por medio de inmunofluorescencia y microscopio electrónico. Se cree que Colón y sus marineros llevaron la enfermedad al regresar al nuevo mundo (30, 31).

A lo largo de la historia, muchos personajes, como Beethoven, Donizetti, Schubert, Schumann, Van Gogh y Hitler, han padecido de sífilis. Las implicaciones sociales de la enfermedad han llevado a ocultar el diagnóstico y a achacar a otras causas los síntomas neurológicos propios de la afección en sus etapas avanzadas (32).

El mercurio y el arsénico fueron dos de los medicamentos más utilizados y también temidos en los siglos XVII y XVIII, debido a las complicaciones que producían. Aunque August Von Wassermann en el año de 1906, inventó la primera prueba de sangre para detectar la sífilis, no se contó con un tratamiento eficaz hasta 1943, cuando la penicilina, descubierta en 1928 por el bacteriólogo británico Alexander Fleming, se utilizó por vez primera con buenos resultados para tratar la enfermedad (32).

La sífilis dio lugar también a una de las polémicas más grandes de toda la historia, con la publicación del Tuskegee study of untreated syphilis in the Negro male, conocido en español por "estudio de Tuskegee". En 1932, el Servicio de Sanidad de los Estados Unidos, con el propósito de observar la evolución natural de la sífilis y documentar el curso de la enfermedad en todos sus estadios, emprendió en Alabama un estudio que inicialmente debía durar seis meses, pero que sorprendentemente se extendió por más de 40 años. A pesar de que durante su curso se comprobó la eficacia de la penicilina para tratar la sífilis, las personas

estudiadas no recibieron ningún tratamiento, conducta que resulta médica y éticamente reprobable (32).

2. Etiología

Treponema pallidum, agente etiológico de la sífilis, es una bacteria del orden Spirochetales móvil de forma helicoidal que mide de 0.1 a 3 µm de diámetro por 5 a 120 µm de longitud. Posee flagelos encerrados dentro de la membrana externa de múltiples capas denominada vaina externa. Está impulsada por rotación a través de un medio líquido y mantiene su motilidad en líquidos altamente viscosos (32).

La sífilis es una enfermedad infecciosa exclusiva del humano. Es de transmisión sexual, sanguínea y perinatal, se desarrolla desde etapas agudas asintomáticas o sintomáticas hasta infecciones crónicas causantes de graves secuelas y discapacidades si no es detectada y tratada adecuadamente (31).

3. Patogenia e inmunidad

a. Patogenia

La sífilis es una enfermedad sistémica desde el inicio de la infección. Sin embargo, las primeras lesiones se presentan en el sitio de inoculación primaria, *T. pallidum* se introduce en el cuerpo a través de una mucosa, un corte o una abrasión en la piel. Se necesitan tan solo 57 microorganismos para infectar al 50% de los pacientes que tienen contacto sexual con personas infectadas. Poco después de la inoculación las espiroquetas se diseminan por todo el cuerpo, donde pueden causar la enfermedad. El período de incubación varía de 3 a 90 días, con una media de 3 semanas (31).

El curso de la enfermedad se clasifica en:

i. Sífilis Primaria.

Esta fase se caracteriza por el desarrollo de la lesión primaria en el sitio de inoculación. La reacción inflamatoria crea una lesión ulcerosa, denominada chancro. La base contiene espiroquetas que pueden observarse por medio del microscopio de campo oscuro o inmunofluorescencia después del raspado de la lesión (30).

El chancro ocurre en el sitio de la inoculación. En ocasiones la sífilis puede presentarse sin úlcera visible, los ganglios linfáticos regionales están aumentados de tamaño, pero son indoloros y firmes. El chancro dura de 3 a 6 semanas (30).

ii. Sífilis secundaria

En esta etapa los microorganismos son más numerosos. Esta fase comienza 2 a 8 semanas después de la aparición del chancro y dura pocos días o meses. Las manifestaciones de esta etapa son variadas pero por lo general incluyen una combinación de síntomas sistémicos (malestar, fiebre, anorexia, cefalea, faringitis, etc.), hipertrofia generalizada de ganglios linfáticos y varias lesiones mucocutáneas. La presentación más notable es la aparición de una erupción diseminada, que puede ser macular o pustular pero no vesicular. La erupción característica en sífilis involucra las palmas de las manos y las plantas de los pies. El diagnóstico de laboratorio de la sífilis secundaria por lo general puede establecerse con facilidad por medio de técnicas serológicas (31, 32).

iii. Sífilis terciaria o recurrente

Las lesiones sífilicas primarias y secundarias una vez resueltas por medio de un tratamiento adecuado pueden experimentar una recurrencia, dando lugar a las lesiones de la sífilis terciaria. Este hecho se da en casi un tercio de las personas infectadas por sífilis primaria o secundaria. Estas lesiones suelen ser

más escasas que las iniciales y al igual que las típicas de la sífilis primaria o secundaria, son contagiosas para las parejas sexuales. En esta etapa se afectan el corazón, las articulaciones, el cerebro, el sistema nervioso y casi cualquier parte del cuerpo (30, 32- 34).

iv. Sífilis latente

La sífilis latente es la etapa en la que no existen signos clínicos de sífilis. Se inicia luego de resolverse la etapa primaria a secundaria pudiendo durar toda la vida. En este estadio, el diagnóstico se realiza únicamente por los antecedentes (lesiones de sífilis primaria a secundaria, exposición a la sífilis o alumbramiento de un lactante afectado de sífilis congénita), la falta de signos de sífilis y la presencia de anticuerpos antitreponémicos (30, 31, 33).

b. Inmunidad

El huésped responde a la infección produciendo múltiples anticuerpos y en algunos casos pueden formarse complejos inmunitarios circulantes. En ocasiones se ha identificado un síndrome nefrítico. La biopsia renal en estos casos ha mostrado glomerulonefritis membranosa, caracterizada por depósitos focales de IgG y fracción del complemento C3 y anticuerpo treponémico en la membrana basal subepitelial (20, 34, 35).

4. Sífilis Congénita

La sífilis congénita es el resultado de la transmisión de la infección por vía perinatal al feto de la gestación. Este puede ocurrir in útero por paso transplacentario o durante el paso a través del canal del parto, transmitida verticalmente por una madre infectada y que no ha sido tratada adecuadamente (36).

Como reflejo de la población en general, la sífilis congénita se incrementó en forma estable desde 1983. La infección transplacentaria es más probable que ocurra durante los estadios primarios o secundarios de la sífilis ya que tiene en dichos períodos una especial selectividad por la placenta, de tal manera que la espiroqueta se fija en el tejido corial, produciendo lesiones de placentitis luética, que permite su paso al feto colonizando sus órganos, especialmente el hígado. Durante las etapas primaria y secundaria, virtualmente 100% de los fetos se infectarán, determinando abortos, mortinatos, partos prematuros y muertes neonatales en aproximadamente 50% de los fetos expuestos y sífilis congénita en el otro 50% (37, 38).

El riesgo de infección en el feto es de un 80% en la etapa latente precoz y disminuye gradualmente a menos del 50% después de más de un año de la infección materna. La infección se puede transmitir al feto durante cualquier etapa del embarazo pero la probabilidad de una enfermedad clínica aumenta a medida que éste se va desarrollando, ya que las manifestaciones de sífilis congénita se relacionan al daño tisular ocasionado por la respuesta inflamatoria del organismo, desarrollándose en el feto sólo después de las 16 semanas de gestación. Aproximadamente un 60% de los recién nacidos infectados nacen asintomáticos, apareciendo las primeras manifestaciones clínicas dentro de las primeras semanas a meses de vida si ellos no reciben tratamiento (36, 39).

La infección sífilítica del feto produce, dependiendo de su severidad: aborto tardío espontáneo (20 - 40%), mortinato (20 - 25%), parto pretérmino (15 - 55%) con infección congénita, recién nacido vivo a término con infección congénita (40 - 70%) (39).

En algunas áreas de los Estados Unidos la sífilis congénita es la causa más común de hidropesía no inmune, una enfermedad de la placenta que causa la muerte fetal. De aquellos que sobreviven, la mitad son asintomáticos y el resto tiene las lesiones de la sífilis secundaria, sin lesiones primarias detectables porque no tienen una vía de ingreso única (39).

a. Manifestaciones clínicas

La sífilis presenta manifestaciones precoces (o tempranas) y manifestaciones tardías. Entre las manifestaciones tempranas se encuentran la meningitis y la hidrocefalia, que pueden dejar secuelas como convulsiones, sordera, retardo en el desarrollo mental o retardo psicomotriz, ya sea leve o severo. Las manifestaciones tardías son las más evidentes y se presentan en la infancia y adolescencia, estas se presentan de dos formas: la no parenquimatosa o intersticial y la forma parenquimatosa (36).

La forma no parenquimatosa está dada por las meningitis y la neurosífilis vascular. En la meningitis el daño puede ser severo manifestándose por cefalea, fiebre, convulsiones, estupor y parálisis de nervios craneanos con signos meníngeos de Kernig y Brudzinski. En la neurosífilis vascular se comprometen los vasos sanguíneos del sistema nervioso con graves consecuencias como la trombosis arterial. Los síntomas y signos generalmente están focalizados y por lo tanto puede ser evidente la hemiplejía, afasia, disartria o disfagia. En otras oportunidades son más sutiles y puede iniciar por cambios de conducta, cefalea, confusión o convulsiones (36).

En la forma parenquimatosa el tejido nervioso está comprometido en forma directa. A nivel cerebral el daño es principalmente de los lóbulos frontales y se presenta de manera progresiva. Se manifiesta inicialmente por cambios de conducta, demencia, alteraciones emocionales, juicio inapropiado. El componente motor se ve progresivamente afectado por temblor, ataxia, hipertonia e hiperreflexia hasta la cuadriparesia y cuadriplejía (36).

El compromiso de los órganos de los sentidos es a nivel ocular y neurosensorial auditivo. Las lesiones oculares van desde la queratitis hasta retinitis con atrofia óptica. En la etapa precoz se encuentra queratitis intersticial o coroiditis. La respuesta terapéutica está relacionada con la precocidad diagnóstica y la posibilidad de prevenir estigmas y secuelas como la ceguera. En la etapa

tardía las manifestaciones son amplias y variadas. La forma más común es la retinitis sífilítica, usualmente es bilateral y puede hacerse explícita cuando ha sido posible curar la queratitis intersticial (36).

El compromiso auditivo puede llevar hasta la sordera uni o bilateral como producto de las lesiones del sistema nervioso, ya sea por el compromiso meníngeo o por las lesiones centrales parenquimatosas, o por ambas (36).

Las alteraciones tempranas de la sífilis a nivel óseo están dadas por la osteocondritis, la periostitis y la osteomielitis diafisaria. El compromiso articular en las etapas tempranas es raro. Lo que puede evidenciarse es el compromiso de las bursas extraarticulares las cuales están llenas de líquido, y les da una apariencia voluminosa sin que exista daño articular (36).

Cuando no se realiza una adecuada intervención terapéutica, la enfermedad continúa su curso dejando una este la de secuelas y estigmas muy difíciles de corregir, lo que es válido para todos los sistemas afectados. Las alteraciones tardías se evidencian después de la edad preescolar, entre los 5 y los 14 años de edad (36, 42).

5. Diagnóstico.

a. Estudios en campo oscuro: El único medio específico e inmediato para el diagnóstico de la sífilis consiste en la identificación positiva del *T. pallidum* mediante microscopía de campo oscuro, con el uso de muestras procedentes de un individuo infectado. Los estudios en campo oscuro son especialmente útiles durante la sífilis primaria, la secundaria, en las recaídas infecciosas y en la sífilis congénita temprana, pues el enfermo presenta lesiones húmedas, por ejemplo, chancros, condilomas o placas mucosas que tienen número elevado de treponemas (30, 43).

b. Métodos de anticuerpos fluorescentes: Para la detección de *T. pallidum* en los tejidos, en los líquidos oculares, en el líquido cefalorraquídeo (LCR), en las secreciones traqueobronquiales o en los exudados procedentes de las lesiones cutáneas o mucosas, se han empleado métodos directos o indirectos con anticuerpos fluorescentes (30, 43).

c. Pruebas serológicas: Para el diagnóstico serológico de la sífilis se utilizan tanto pruebas treponémicas como no treponémicas. Estas pruebas se diferencian en los antígenos utilizados y en el tipo de anticuerpo que se determina (30, 43).

I. Pruebas no treponémicas: Determinan anticuerpos reagínicos que se detectan con el antígeno: cardiolipina-lecitina altamente purificado. A pesar de que las pruebas no treponémicas son relativamente específicas, no son exclusivas para la sífilis y por tanto, pueden producirse reacciones falsas positivas. Las pruebas más utilizadas son Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) y las pruebas reaginas rápidas o Rapid Plasma Reagin (RPR) (43).

II. Pruebas treponémicas: En las pruebas treponémicas, el antígeno es el *T. pallidum*. Su finalidad es la de detectar anticuerpos antitreponémicos específicos que generalmente aparecen en infecciones provocadas por treponemas como sífilis, frambesia, sífilis endémica y pinta. Debido a su mayor especificidad, estas pruebas sólo se utilizan para confirmar los datos obtenidos en las pruebas no treponémicas. Por desgracia, son técnicamente complejas y costosas con relación a las no treponémicas. Las pruebas más utilizadas son:

III. Absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS) es la modificación actualmente empleada en la cual los sueros de pruebas son previamente absorbidos para eliminar anticuerpos de grupo, y así la prueba se hace relativamente específica. La FTA-ABS es compleja, lleva tiempo, por ende no se recomienda para estudios amplios, sino para la

confirmación de pruebas no treponémicas positivas y para el diagnóstico de estadíos tardíos de la sífilis en los cuales las pruebas no treponémicas dan resultados falsos negativos. Esta prueba es específica y sensible (43).

IV. Enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA): es una prueba rápida, se compara su sensibilidad con la FTA -ABS y se usan anticuerpos monoclonales de murino contra treponema (anexo No. 1) (43).

V. La especificidad molecular de los anticuerpos hacia los antígenos de *T. pallidum* esta siendo examinada por medio de dos métodos.

- Inmunoblot: Es un método muy sensible que detecta cantidades muy pequeñas de antígeno, el cual consiste en la transferencia de proteínas de membrana sintética, logrando la identificación de antígenos específicos por medio de una reacción cromogénica o luminiscente con anticuerpos mono o policlonales.
- Radioinmunoprecipitación: Consiste en la determinación de anticuerpos por medio de la formación de inmunocomplejos en presencia de proteínas antigénicas marcadas radiactivamente.

El uso de la reacción en cadena de la polimerasa para detectar el genoma del *T. pallidum* y por lo tanto la presencia del microorganismo probablemente también sea útil, especialmente en investigaciones (43).

6. Tratamiento

El tratamiento farmacológico depende inicialmente de la continuidad en la gestación, ya que, solo si la gestación ya terminó pueden ofrecerse terapias diferentes a penicilina (38).

Si la gestación continúa en curso, el tratamiento farmacológico debe hacerse siempre con penicilina, desensibilizando por vía oral en caso de que sea probable la presentación de reacciones de hipersensibilidad (38).

El esquema a elegir depende de la edad gestacional, si es mayor de 34 semanas, debe utilizarse penicilina cristalina endovenosa a 4 millones de UI cada 4 horas durante 10 a 14 días. Si existe amenaza de parto pretérmino se remitirá por alto riesgo. Debe intentarse el diagnóstico del compromiso fetal (38).

Si la edad gestacional es menor de 34 semanas, el esquema se seleccionará según el estadio, así:

- Sífilis de evolución indeterminada, latente tardía, o terciaria excepto neurosífilis: penicilina benzatínica intramuscular en dosis 2.4 millones de UI cada semana por tres veces.

- Sífilis primaria, secundaria, o latente temprana: penicilina benzatínica intramuscular a 2.4 millones de UI una dosis.

- Neurosífilis: penicilina cristalina endovenosa en dosis 4 millones de UI cada 4 horas durante 10 a 14 días (38).

Además como parte de la atención de un caso de sífilis en una mujer gestante se debe garantizar el tratamiento de todos sus contactos sexuales con el fin de evitar la reinfección de la gestante (38).

Todas las mujeres gestantes que han sido diagnosticadas con sífilis deben recibir un tratamiento integral y ser evaluadas para otras enfermedades de transmisión sexual incluyendo una prueba de tamizaje para VIH (38).

Los recién nacido que presenten signo clínicos y datos de laboratorio de sífilis congénita deben de ser tratados con penicilina G cristalina acuosa. Las decisiones del tratamiento deben de hacerse sobre la base de:

- A. Diagnóstico de sífilis materna.
- B. Adecuación del tratamiento de sífilis materna.
- C. Evidencia clínica, de laboratorio o radiografía de sífilis en el recién nacido.
- D. La comparación en el momento del parto de los títulos serológicos no treponémicos maternos y del recién nacido usando la misma prueba de laboratorio.

7. Epidemiología

En la región de América Latina y el Caribe, la sífilis es la infección de transmisión sexual de menor prevalencia entre las ITS clásicas. Es decir, la prevalencia de sífilis marca el límite inferior del espectro de prevalencia de todas las ITS (41).

Según los datos suministrados a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) por los programas nacionales de ITS/VIH/SIDA1 durante el año 2002, la prevalencia estimada de sífilis en embarazadas es de 3,1% en la región latinoamericana y oscila entre 1,00 % en Perú y 6,21 % en Paraguay. Según esos datos, la incidencia de sífilis congénita varía desde 1,40 por 1 000 nacidos vivos en El Salvador, hasta 12 por 1 000 nacidos vivos en Honduras, mientras que en Estados Unidos es de 0,10 casos por 1 000 nacidos vivos (38).

Los datos del 2006 revelan que la prevalencia estimada de sífilis en gestantes en América Latina y el Caribe (ALC) era de 3.1 por cien gestantes evaluadas (0.4 – 6.2). La incidencia de sífilis congénita presentaba un intervalo por encima de 0.5 por 1.000 nacidos vivos (41).

En Guatemala, en el año 1981 se llevó a cabo un estudio en el Hospital Roosevelt sobre sífilis y el embarazo, el cual tenía como objetivo determinar el seguimiento y morbilidad materna y neonatal, para ello se utilizaron las fichas clínicas de 190 mujeres con diagnóstico de sífilis y embarazo. Entre los resultados se determinó que del 75.79% de pacientes tratadas solamente un 6.85% de la población total era tratada adecuadamente; Un 21.57% de los casos tuvieron un parto prematuro y un 9% terminaron en aborto. De los niños nacidos de estas pacientes, el 5.7% presentaron anomalías congénitas, entre los cuales solo los casos de hidrocefalia pudieron atribuirse a la enfermedad estudiada (43)

En 1987 se publicó un trabajo sobre determinación de anticuerpos contra *T. pallidum* en una muestra de 100 mujeres embarazadas que acudieron a control prenatal en el Hospital Nacional de Cuilapa obteniéndose una prevalencia del 3% (43).

Otro estudio realizado en el 2004 en el Hospital General San Juan de Dios, determinó la prevalencia de Hepatitis B, VIH y sífilis en una población de 358 mujeres embarazadas que acudieron a control prenatal. Las muestras fueron procesadas tanto con pruebas rápidas como con pruebas confirmatorias de diagnóstico para comparar la sensibilidad, especificidad relativa y concordancia de los resultados como información adicional. Los resultados de las prevalencias dieron 0.0% para hepatitis B, 2.23% para VIH y 1.1% para sífilis (44).

Durante el año 2006 el Centro Nacional de Epidemiología publicó un boletín en el cual incluían una revisión sobre un estudio de sífilis en embarazadas que consultaron las maternidades periféricas del departamento de Guatemala. La muestra constituida por 1522 pacientes en control prenatal, reveló un porcentaje de positividad de la prueba del 0.72%. Es importante resaltar que en este estudio se consideró como positiva toda aquella paciente que resultara reactiva o positiva solamente a la prueba de VDRL (45).

En el mismo año Visión Mundial (Organización No Gubernamental -ONG-) realizó un estudio en el cual determinó la prevalencia de enfermedades sexuales

que son transmitidas en forma vertical en las mujeres embarazadas atendidas en la consulta externa del Hospital Nacional Regional de Escuintla, en el cual se obtuvo una prevalencia de 3.81% de casos de sífilis en una muestra de 367 mujeres embarazadas. En este estudio las pruebas utilizadas para el diagnóstico fueron VDRL como tamizaje y para su confirmación la determinación de anticuerpos IgM contra *T. pallidum* por método ELISA (46).

Estos datos presentan limitaciones, ya que la subnotificación de casos de sífilis materna y sífilis congénita es elevada. En el caso de la incidencia de sífilis congénita, los abortos y los nacidos muertos no se incluyen en casi ningún país, por lo tanto no se conoce la verdadera magnitud del problema (38).

C. Tamizaje neonatal

No todas las enfermedades se manifiestan clínicamente desde que se presentan sus causas. Muchos padecimientos cursan con un período asintomático, mismo que puede durar desde días hasta décadas. En esta etapa prodrómica, el paciente aunque ya tenga muchos o todos los factores etiológicos presentes todavía se encuentra sano. La probabilidad de manifestar los signos y síntomas puede ser muy variable, desde un leve aumento en la susceptibilidad a padecer la enfermedad, pasando por una alta predisposición, hasta llegar a la conjunción necesaria y suficiente de factores etiopatológicos para cruzar el umbral clínico. En los últimos años, las capacidades para determinar ese riesgo e identificar los factores etiológicos han aumentado notablemente para muchas enfermedades, a lo cual se conoce como diagnóstico pre -sintomático (42, 47).

Los programas de tamizaje neonatal detectan en los recién nacidos aparentemente sanos (diagnóstico pre-sintomático) patologías endocrinas, infecciosas o errores del metabolismo, que ocasionan retraso mental, discapacidad física o muerte prematura, antes de que la enfermedad se manifieste y de esta manera prevenir de ser posible, alguna discapacidad física, mental o la muerte. Se realiza con gotas de sangre fresca capilar, usualmente obtenidas del talón cuando los niños tienen entre cuatro y siete días de vida extrauterina. Se colocan de tres a cuatro gotas de esta sangre sobre un papel filtro Schleicher & Schuell® 903 (S&S® 903), conocido como tarjeta de Guthrie se deja secar al medio ambiente. Se obtiene un disco de 3 mm de diámetro de la mancha de sangre, con la muestra lista se procede a llevar a cabo el análisis correspondiente. Los criterios que abarca una prueba de tamizaje son método exacto, patología prevenible, tratamiento accesible, frecuencia elevada en la población (42, 47).

El tamizaje neonatal debe practicarse a todos los recién nacidos con el propósito de identificar y establecer el diagnóstico oportuno de enfermedades graves e irreversibles. Sirve de apoyo en la medicina preventiva y su elaboración debe establecerse con excelente control de calidad para que los resultados expedidos sean confiables. Los métodos analíticos, adaptados al estudio de sangre impregnada en papel filtro, son susceptibles de ser afectados por factores externos que alteran falsamente los resultados. Dichos factores, algunas veces considerados de manera inadecuada, son de gran trascendencia para interpretar los resultados, tales como: tiempo de recolección de la muestra, conservación de las muestras, transfusiones, interferencias analíticas ocasionadas por los fármacos y en el caso de los errores del metabolismo, el régimen dietético. Las muestras de los pacientes que permanecen en tratamiento afectan los resultados (el laboratorio debe conocer el tratamiento que recibe cada individuo). Los fármacos que afectan con mayor frecuencia los estudios de laboratorio son los anticoagulantes, anticonvulsivos, antihipertensivos, antimicrobianos, hipoglucemiantes orales, vitaminas, hormonas y sustancias psicoactivas. Es importante la conservación, el traslado y la distribución de la muestra; las variantes en este proceso son de gran valor en la calidad del ensayo analítico (48).

Para realizar el tamizaje neonatal, adecuado y confiable, no basta con impregnar manchas de sangre en una tarjeta, sino que debe realizarse un procedimiento más complejo. En éste deben reducirse las interferencias clínicas y farmacológicas para proporcionar resultados útiles. La primera consideración al tener un resultado positivo debe ser la repetición de la prueba con una nueva muestra de sangre. En condiciones óptimas, la muestra debe obtenerse entre los días 4 a 7 de vida, y sin administración previa de medicamentos (anticonvulsivantes o transfusiones sanguíneas) que interfieran con el resultado de los ensayos analíticos. El tamizaje neonatal no debe considerarse una prueba aislada de laboratorio, sino enfocarse como un programa de identificación de padecimientos, control de tratamiento y seguimiento de la evolución de los pacientes con la ayuda de un equipo médico multidisciplinario (47).

Entre las innovaciones del tamizaje neonatal destaca el empleo de la espectrometría de masas en tándem, procedimiento que determina con gran precisión el peso y la estructura de átomos y moléculas. Se dice que es “en tándem” cuando se utilizan dos espectrómetros de masa unidos entre sí. El primero dispersa a los diferentes iones moleculares presentes en una mezcla compleja como la sangre; después estos iones son fragmentados y el segundo espectrómetro separa los fragmentos iónicos para su análisis. El resultado es un procedimiento rápido y reproducible. Dada su gran especificidad y sensibilidad, no da resultados falsamente negativos. Otros enfoques que han ampliado la gama de trastornos que se puede descubrir por el tamiz neonatal, usando la misma tarjeta de Guthrie que se emplea para la detección del hipotiroidismo congénito, son la enzimología, la fluorimetría, los ensayos inmuno enzimáticos, el enfoque isoeléctrico y el estudio directo del ADN para búsqueda de mutaciones específicas. Para que la efectividad del tamizaje neonatal sea máxima en la prevención de enfermedades, debe ser realizado durante las primeras dos semanas de vida del neonato (preferentemente entre cuatro y siete días de vida extrauterina); pero si esto no es posible, es todavía útil hasta los dos o tres meses de edad (46, 47).

En lo que respecta a enfermedades infecciosas como CMV y sífilis se ha planteado la posibilidad del tamizaje serológico durante la gestación, comprobándose aparición de IgM materna como diagnóstico de infección activa. La utilidad de la detección precoz de infección materna por CMV es discutible respecto al pronóstico y seguimiento del niño (12).

En un estudio realizado por Camargo y cols. en Brasil, estimaron la prevalencia de enfermedades infecciosas congénitas mediante una muestra de sangre del recién nacido recolectada en papel filtro (S&S[®] 903) el día 3 y 20 de vida, determinando anticuerpos IgM contra *Toxoplasma gondii* y citomegalovirus, así como anticuerpos IgG contra el virus de la rubéola y *T. cruzi* por métodos

ELISA séricos adaptados para su uso con muestras de sangre seca en papel filtro. Un total de 195 recién nacidos fueron diagnosticados con toxoplasmosis congénita, 16 con citomegalovirus y 11 con rubéola congénita. Un recién nacido se confirmó para la enfermedad de Chagas y 21 madres fueron positivas para la presencia de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en suero, en ambos casos por inmunofluorescencia indirecta. Estos resultados sugieren que las enfermedades infecciosas deben ser consideradas para su inclusión en futuros programas de tamizaje neonatal de enfermedades metabólicas (47).

IV. JUSTIFICACIÓN

El tamizaje neonatal es un estudio con fines preventivos que tiene como objetivo principal detectar y tratar enfermedades latentes, antes de la aparición de los síntomas y cuyas consecuencias pueden ser graves e irreversibles. En Guatemala, a partir de 1991 se estableció el programa de tamizaje neonatal en el Hospital General San Juan de Dios para el diagnóstico del hipotiroidismo congénito en recién nacidos, cobertura que fue ampliada para el diagnóstico de otras patologías metabólicas, entre ellas fenilcetonuria, galactosemia e hiperplasia adrenal congénita.

Las infecciones congénitas son una causa importante de mortalidad y morbilidad en el feto y en el neonato. Pueden producirse en cualquier momento a lo largo de la gestación y su gravedad varía en función de la virulencia del agente, la susceptibilidad y de la edad gestacional del feto, así como de la vía de la infección.

Un estudio realizado en el 2004 en el Hospital General San Juan de Dios determinó la prevalencia de sífilis en una población de 358 mujeres embarazadas que acudieron a control prenatal, los resultados muestran una prevalencia de 1.1%. Los datos del 2007 revelan que la prevalencia estimada de sífilis en gestantes en América Latina y el Caribe era de 3.1% (41, 44).

El Citomegalovirus se encuentra en la saliva, el semen y las secreciones cérvicouterinas aún en ausencia de síntomas. Hasta 15% de las mujeres gestantes secretan el virus y 1% de los recién nacidos tienen CMV en su orina. Estudios realizados en 2004 en mujeres embarazadas que acudieron al hospital Roosevelt evidenciaron una frecuencia de anticuerpos IgG para CMV del 98% e IgM del 7.6% (7).

Sin embargo, los altos porcentajes de frecuencia obtenidos en la evaluación de los agentes TORCH en la población no exime el traspaso vertical, ya que la infección puede ser adquirida por la madre en etapas posteriores a la evaluación. Es por ello que se considera necesario la evaluación de infecciones congénitas a los neonatos entre ellas sífilis y Citomegalovirus, para detectar a tiempo a los recién nacidos infectados y prevenir así la aparición de secuelas posteriores.

En Latinoamérica son pocos los países que llevan a cabo el tamizaje neonatal para enfermedades infecciosas de forma rutinaria, por lo que actualmente no existen en el mercado los reactivos comerciales adecuados para dicha metodología, motivo por el cual previo a realizar estos estudios en pacientes, se deben realizar adaptaciones de métodos convencionales que permitan la oportuna detección de estas patologías.

Cabe mencionar que para realizar un ELISA convencional se precisa al menos de 1 cc de sangre, la cual se debe obtener por medio de métodos invasivos en los neonatos, dificultando el procedimiento desde la obtención de la muestra por las implicaciones inherentes a esta, además del manejo y traslado de la muestra al laboratorio para su análisis. Por ello se considera oportuno adaptar un método serológico a la metodología en papel filtro, ya que este requiere únicamente una gota de sangre, la cual puede ser obtenida del talón de los neonatos mediante los métodos básicos de tamizaje neonatal.

V. OBJETIVOS

A. Objetivos Generales

1. Adaptar un ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos IgM anti Citomegalovirus y anti *Treponema pallidum* a la metodología de tamizaje neonatal en papel filtro.
2. Evaluar la utilidad del tamizaje neonatal como método de detección temprana de enfermedades congénitas de tipo infeccioso como sífilis y CMV.

B. Objetivos específicos

1. Identificar el eluyente que permita una mejor extracción de anticuerpos IgM anti-Citomegalovirus y anti-*Treponema pallidum* del papel filtro y que proporcione mejores resultados.
2. Definir el tiempo de incubación con el que se obtienen mejores resultados para la identificación de anticuerpos IgM anti - Citomegalovirus y anti- *Treponema pallidum*.
3. Determinar el diámetro de muestra que proporcione mejores resultados para la identificación de anticuerpos IgM anti - Citomegalovirus y anti- *Treponema pallidum*.
4. Establecer la frecuencia de sífilis congénita y citomegalovirus en los neonatos nacidos en Hospitales Nacionales y Centros de Salud de los departamentos de Zacapa, Jutiapa, Santa Rosa y Jalapa.

VI. HIPÓTESIS

El presente trabajo no cuenta con hipótesis ya que es un estudio estrictamente descriptivo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de Trabajo

Neonatos nacidos en Hospitales Nacionales y Centros de Salud de los departamentos de Zacapa, Jutiapa, Santa Rosa y Jalapa.

B. Muestra

396 neonatos nacidos en Hospitales Nacionales y Centros de Salud de los departamentos de Zacapa, Jutiapa, Santa Rosa y Jalapa.

C. Recursos Humanos

- Investigadores:

Br. Victor Manuel Salguero Quinto

Br. Gabriela Penados Richter

Br. José Adolfo Rodas Guerra

- Asesores:

Licda. Karla Lange de Kiesling

Q.B. MSc. Vivian Matta de García

D. Recursos Institucionales

- Unidad de Inmunodiagnóstico, Laboratorio Microbiológico de Referencia –LAMIR-, Departamento de Citohistología.

- Unidad de Inmunopatología de Enfermedades tropicales.
- Hospitales Nacionales y Centros de Salud de los departamentos de Zacapa, Jutiapa, Santa Rosa y Jalapa.

E. Recursos Físicos

1. Reactivos

- Kit para la detección de anticuerpos IgM anti - Citomegalovirus marca Calbiotheck ®.
- Kit para la detección de anticuerpos IgM anti - *T. pallidum* marca Calbiotheck ®.
- Amortiguador fosfato salino PBS 0.05M a pH 7.2. (Anexo 2)
- Seroalbúmina bovina 0.5%

2. Equipos

- Pipetas Automáticas de volumen variable (10 -100 µl y 100-1000 µl)
- Pipeta multicanal (50-250 µl)
- Lector de ELISA
- Refrigeradora
- Rotador de placas
- Incubadora de temperatura ambiente
- Potenciómetro
- Centrifugadora
- Vortex
- Perforadores de 3 y 6 milímetros.

3. Materiales

- Puntas de pipetas desechables (10-200 μ l y 100-1000 μ l)
- Tubos de ensayo para la recolección de muestras
- Agujas 25 x 5/8"
- Papel filtro Schleicher & Schuell 903 (S&S 903) ®
- Guantes de látex
- Papel mayordomo
- Algodón
- Alcohol
- Sistema Vacutainer ® (agujas, camisas)
- Tubos
- Lancetas desechables
- Beaker
- Liga de hule
- Fichas de recolección de datos
- Cartas de consentimiento
- Encuestas para pacientes con resultado positivo
- Marcadores indelebles
- Desecante (Sílica gel)
- Cronómetro
- Tijeras
- Tubos capilares
- Agitadores magnéticos

4. Otros

- Papel Bond tamaño carta 80 grs.
- Sobres de papel manila
- Computadora
- Impresora

F. Procedimiento

1. Adaptación del método serológico

- Se elaboraron controles positivos y negativos para anticuerpos IgM anti- *T. pallidum* y anti – CMV con sueros positivos y negativos confirmados, los que se combinaron con eritrocitos “O” positivo lavados hasta obtener un hematocrito de 55%, para simular la concentración de la sangre de los recién nacidos. Se impregnó 50µL en papel filtro S&S 903[®] y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

- Se evaluaron de tres agentes eluyentes; diluyente del kit, amortiguador fosfato salino –PBS- 0.05M y seroalbúmina bovina 0.5% combinada con PBS (Anexo 2); cuatro tiempos de incubación; 1, 4, 18 y 24 horas; y dos diámetros de papel filtro (3 y 6 mm.).

- Se utilizó metodología de ensayo y error para obtener las condiciones óptimas para la adaptación del método, en el cual se realizaron 5 repeticiones de cada combinación de variables (tiempo de incubación, diámetro papel filtro, eluyentes) para el Kit ELISA.

2. Evaluación del método

- Para la evaluación del método, se incluyeron 25 sueros seropositivos para anticuerpos anti – CMV o anti - *T. pallidum* según el caso, combinados con eritrocitos lavados “O” positivo hasta obtener un hematocrito de 55%. Se impregnaron las muestras en el papel filtro. Las muestras fueron analizadas por el método de ELISA

adaptado anteriormente. Se utilizó el mismo procedimiento con 25 sueros seronegativos para CMV y sífilis como controles negativos.

- Los datos obtenidos fueron analizados en tablas de contingencia de 2x2 en el programa Epi Info y se obtuvieron los índices estadísticos como: sensibilidad relativa y exactitud r elativa.

3. Realización del tamizaje neonatal

i. Toma de muestra

- Se solicitó apoyo a distintos hospitales y centros de salud del interior de la república para aplicar las pruebas estandarizadas al tamizaje neonatal.

- Se capacitó a todo el personal de salud (médicos y personal de enfermería) para la correcta toma de muestra en papel filtro.

- Se incluyeron como participantes del estudio a todos los neonatos nacidos en Hospitales Nacionales y Centros de Salud de los departamentos de Zacapa, Jutiapa, Santa Rosa y Jalapa hasta alcanzar el tamaño de muestra, la selección se realizó por método de conveniencia. Se obtuvo carta de consentimiento de las madres aceptando tomar parte en el estudio “Tamizaje Neonatal de Citomegalovirus y Sífilis congénita en la República de Guatemala, Adaptación y Evaluación de un método serológico” (Anexo 3).

- Se completó el formulario de la tarjeta de papel filtro con la información general de la madre y el neonato (Anexo 4).

- Se recolectó la muestra en papel filtro con la ficha de identificación en un sobre y se almacenó dentro de un sobre con desecante hasta ser analizada en el laboratorio.

i. Análisis de muestra

- El análisis de las muestras de sangre de papel filtro se realizó según las condiciones óptimas ya establecidas en la adaptación del método ELISA, realizando y procesando las muestras mediante el procedimiento planteado anteriormente.

- En cada corrida de muestras, se procesaron controles de calidad internos, los cuales fueron analizados para validar los resultados. Se utilizaron controles provistos por el kit y controles elaborados en papel filtro con sueros conocidos.

- Se consideró una muestra como positiva cuando el índice de la muestra estaba por encima de 1.1, negativo por debajo de 0.9 e indeterminado un valor entre ellos.

ii. Confirmación de resultados

- Para la confirmación de casos positivos se citó a la madre y al recién nacido en el Hospital o Centro de Salud correspondiente para recolección de una muestra sérica de la madre y del recién nacido. Dichas muestras se confirmaron por medio de inmunocromatografía en el caso de Sífilis e inmunoquimioluminiscencia en el caso de Citomegalovirus previo al reporte de los resultados.

G. Diseño Estadístico

1. Tipo de estudio: Prospectivo transversal.
2. Adaptación de la metodología con sueros positivos.
 - a. Ensayo y error: Se probaron las 6 combinaciones de eluyentes, dos diferentes diámetros de muestra y dos distintos tiempos de incubación con sueros positivos confirmados por otras metodologías y se estableció si hay o no reproducibilidad en la detección de anticuerpos, repitiéndolo 5 veces (método por conveniencia).
3. El método seleccionado en el proceso anterior se aplicó a una muestra de neonatos y se obtuvieron las frecuencias en la población estudiada.
 - a. Cálculo de la muestra:
 - Nivel de confianza= 95% ($z=1.96$)
 - Prevalencia esperada (p): se asumirá el 50%
 - Varianza: pq si $p= 0.5$ y $q= 0.5$ entonces
varianza=0.25
 - Limite de error: 1% = 9,604
 5% = 385
 10% = 97
 - b. Diseño de muestreo: Por conveniencia
4. Análisis de resultados
 - a. Estadística descriptiva de la muestra: porcentaje de Masculino y femenino.
 - b. Frecuencia de sífilis y CMV.

VIII. RESULTADOS

Se adaptó una metodología para la detección de anticuerpos IgM anti - *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) para la detección de sífilis congénita y una metodología para la detección de anticuerpos IgM anti – Citomegalovirus (CMV) utilizando controles positivos y negativos de sangre completa impregnada en papel filtro S&S 903®.

En la adaptación del método de *T. pallidum* se evaluaron tres eluyentes, los cuales fueron amortiguador fosfato salino PBS 0.05M, amortiguador seroalbúmina bovina 5% y el diluyente que provee el kit. Asimismo , se probaron dos diámetros de papel filtro (3 y 6 mm), tres diferentes tiempos de elución (1, 18 y 24 horas), dos temperaturas (25° y 36°C) y dos tipos de pozos para la elución de los anticuerpos (pozos de fondo plano y pozos de reacción). Se modificaron las variables según se obtuvieron los resultados.

Para cada resultado se obtuvo el índice de la muestra, el cual se obtiene a partir de la división entre la absorbancia de la muestra y el valor del punto de corte dado por el calibrador del kit. También se obtuvo el radio entre el índice del control positivo y del control negativo el cual debe tener una diferencia significativa.

La elución de anticuerpos anti – *T. pallidum* se realizó inicialmente en pozos de fondo plano con diferentes eluyentes, temperaturas, tiempos de elución y diámetro de muestra. En este caso no se obtuvo resultados de los controles positivos por encima del punto de corte y el radio entre controles positivos y negativos no mostró buena resolución entre ellos, por lo que no cumplió con los criterios requeridos.

Posteriormente, la elución de los anticuerpos se realizó directamente en los pozos de reacción, donde se obtuvo mejores resultados. En este caso se observó mayor resolución entre los índices de los controles positivos y negativos. Como se puede observar en la Tabla 1. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se eluyó la muestra con amortiguador fosfato salino 0.05M con tween 20 al 10%,

diámetro de muestra de seis mm y una hora a 25°C en rotación constante y 36°C en cámara húmeda. En estas condiciones los controles positivos dieron un índice mayor de 1.1 y los controles negativos presentaron índices menores a 0.9. (Tabla 1) Se eligió el ensayo a 36°C en cámara húmeda ya que la resolución entre controles fue mayor que en el ensayo a 25°C con rotación constante. Cuadros y cálculos estadísticos en Anexo 5.

En estas condiciones el coeficiente de variación de los resultados obtenidos es bajo, 1.13% para los controles positivos y 3.16% para los controles negativos.

Tabla 1. Resultado de la determinación de anticuerpos IgM anti – *T. pallidum* en pozos de reacción en la evaluación de variables.

Tiempo / Temperatura	PBS + tween 20 / Diámetro de muestra de 6mm						Radio
	Control Positivo			Control Negativo			
	Índice	SD	CV %	Índice	SD	CV %	
1 hora/ 25°C	1.3	0.047	3.42	0.6	0.03	4.7	2.16
1 hora/ 36°C	1.4	0.016	1.13	0.5	0.02	3.16	2.8

Fuente: Datos experimentales. Clave= PBS Amortiguador fosfato salino 0.05M, mm= milímetros, SD= Desviación estándar, CV= Coeficiente de variación.

El mismo procedimiento de evaluación se realizó en la determinación de anticuerpos IgM anti – CMV. La elución de anticuerpos en pozos planos no mostró resultados satisfactorios ya que el radio entre controles no fue el esperado y los índices de los controles positivos no se encontraron por encima del valor de punto de corte.

Por ello, la elución de anticuerpos se realizó directamente en los pozos de reacción, obteniendo índices mejores que en los pozos planos. Al igual que para sífilis, los mejores resultados se obtuvieron con amortiguador fosfato salino con tween 20 al 10%, diámetro de muestra de 6 mm, 1 hora de elución a 25°C con rotación constante y 36°C en cámara húmeda, con la diferencia que la resolución entre controles fue mayor cuando la elución se dio a 25°C con rotador constante (Tabla 2). Cuadros y cálculos estadísticos en anexo 5.

Tabla 2. Resultado de la determinación de anticuerpos IgM anti – T. pallidum en pozos de reacción en la evaluación de variables.

Tiempo / Temperatura	PBS + tween 20 / Diámetro de muestra de 6mm						Radio
	Control Positivo			Control Negativo			
	Índice	SD	CV %	Índice	SD	CV %	
1 hora/ 25°C	2.15	0.43	17.9	0.56	0.545	8.61	3.83
1 hora/ 36°C	1.43	0.02	1.53	0.65	0.46	8.6	2.2

Fuente: Datos experimentales. Clave= PBS Amortiguador fosfato salino 0.05M, mm= milímetros SD= Desviación estándar, CV= Coeficiente de variación .

Para llevar a cabo la estandarización de los ensayos y establecer la especificidad y sensibilidad relativa de los métodos de ensayo , se procesaron 25 muestras positivas y 25 muestras negativas. En la tabla 3 y 4 se observan los resultados de las muestras obtenidas en los ensayos. Tanto para el ensayo de CMV como para el de sífilis, se obtuvo una sensibilidad y una especificidad relativa del 100% (Tabla 5).

Tabla 3. Resultados de la estandarización para prueba de anticuerpos IgM anti - T. pallidum

Resultados	CONTROLES	CONTROLES
	POSITIVOS	NEGATIVOS
POSITIVOS	25	0
NEGATIVOS	0	25
TOTAL	25	25

Fuente: Datos experimentales

Tabla 4. Resultados de repeticiones para prueba de anticuerpos IgM anti - Citomegalovirus.

Resultados	CONTROLES POSITIVOS	CONTROLES NEGATIVOS
POSITIVOS	25	0
NEGATIVOS	0	25
TOTAL	25	25

Fuente: Datos experimentales

Con el método ya estandarizado se procedió a la realización del estudio piloto del tamizaje neonatal. Para ello se capacitó en la toma de muestra al personal de salud del Hospital Nacional de Zacapa, Centro de Salud de Cuilapa Santa Rosa, Conguaco Jutiapa, Cooperativa “El Recuerdo” Jalapa y Centro de Salud Jalapa. En total se logró la captación de 420 muestras cuya distribución se observa en la Tabla 6.

Tabla 6. Distribución de las muestras en los diferentes puntos de toma de muestra .

Procedencia	Neonatos			Total
	Hombres	Mujeres	No informa	
Hospital Nacional Zacapa “Hospital Regional San Juan de Dios”	33	63	54	150
Centro de salud de Santa Rosa	42	34	42	118
Centro de Salud, Jalapa	9	9	8	26
Cooperativa “El Recuerdo” San Pedro Jalapa	13	13	27	53
Centro de Salud, Conguaco Jutiapa	28	43	2	73
Total	125	162	133	420

Fuente: Datos experimentales

Algunas muestras fueron descartadas por inadecuada recolección, por lo que únicamente 395 muestras fueron analizadas para la detección de anticuerpos anti – CMV y 390 fueron para anti – *T. pallidum*.

En el caso de CMV se obtuvieron seis muestras positivas y tres muestras indeterminadas, las cuales fueron confirmadas por el mismo método en papel filtro. Posteriormente los resultados fueron confirmados séricamente por inmunoquimioluminiscencia, para lo cual se obtuvo una nueva muestra de la madre y del recién nacido, evaluando por este método anticuerpos IgM e IgG tanto para la madre como para el hijo. Dichos resultados se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de las muestras de neonatos y confirmaciones séricas de la determinación de anticuerpos IgM e IgG anti – CMV para las madres y neonatos .

Resultado	Muestras en papel filtro evaluadas para anticuerpos IgM anti – CMV por ELISA	<i>Inmunoquimioluminiscencia</i>			
		Suero de la madre		Suero del neonato	
		IgM	IgG	IgM	IgG
1	POSITIVO	-	-	-	-
2	POSITIVO	+	NR	SM	
3	POSITIVO	-	+	-	+
4	POSITIVO	-	+	-	+
5	POSITIVO	-	+	-	+
6	POSITIVO	-	+	-	+
7	INDETERMINADO	-	+	-	+
8	INDETERMINADO	-	+	-	+
9	INDETERMINADO	I	+	-	-

Fuente: Datos experimentales, Clave: - = Negativo, + Positivo, NR= No realizado, SM = sin muestra, I= Indeterminado

Para la detección de anticuerpos IgM anti – *T. pallidum* se procesaron 390 muestras, obteniéndose una muestra positiva y dos indeterminados. Se solicitó una muestra serológica tanto de la madre como del neonato, la cual fue recolectada aproximadamente dos meses después de la primera muestra. En esta muestra se realizó la detección de los anticuerpos totales por medio de inmunocromatografía, no obteniéndose ningún resultado positivo (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de las muestras de neonatos y confirmaciones séricas de la determinación de anticuerpos IgM anti – *T. pallidum* para las madres y neonatos

Resultado	Muestras en papel filtro evaluadas para anticuerpos IgM anti – <i>T. pallidum</i> por ELISA	Inmunocromatografía Anticuerpos totales	
		Suero de la Madre	Suero del neonato
Positivo	1	0	0
Indeterminado	2	0	0
Negativo	387	3	3
Total	390	3	3

Fuente: Datos Experimentales

En resumen en este estudio piloto, las frecuencias obtenidas fueron de 0% para CMV y de 0% para sífilis en los neonatos. Correspondiendo todos los casos presuntivos positivos a Conguaco Jutiapa.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las infecciones adquiridas congénitamente generalmente cursan asintomáticas al nacer y se manifiestan clínicamente hasta pasados varios meses o incluso años luego del nacimiento siendo ya irreversibles, por lo cual, es importante contar con metodologías que permitan detectar estas infecciones oportunamente, antes de la aparición de sus síntomas (42, 47).

Los programas de tamizaje neonatal detectan en los recién nacidos aparentemente sanos (diagnóstico asintomático) patologías endocrinas y metabólicas antes que la enfermedad se manifieste clínicamente, permitiendo así prevenir las secuelas que éstas pueden ocasionar, por ejemplo retraso mental, discapacidad física o muerte temprana. Actualmente, no existen metodologías estandarizadas de tamizaje neonatal para detectar enfermedades infecciosas las que pueden causar problemas en el desarrollo de los recién nacidos y que pueden no ser detectadas en el tamizaje de control prenatal en las madres debido a infecciones adquiridas después de dichos controles.

Es por ello que en este estudio se estandarizó y evaluó un método de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar anticuerpos IgM anti-*Treponema pallidum* (*T. pallidum*) y otro para anticuerpos IgM anti-Citomegalovirus (CMV) utilizando muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro. Posteriormente, los métodos estandarizados se utilizaron para realizar un estudio piloto determinar la frecuencia de estas infecciones en neonatos procedentes del Hospital Regional de Zacapa, Centro de Salud de Jalapa, Cooperativa “El Recuerdo” en San Pedro Pinula Jalapa, Centro de Salud de Conguaco Jutiapa y Centro de Salud de Cuilapa Santa Rosa.

El método de tamizaje neonatal para la detección de anticuerpos IgM anti-*T. pallidum* y anti-CMV se basa en la elución de anticuerpos IgM absorbidos en la matriz de sangre completa impregnada en papel filtro Schleicher & Schuell 903[®] (S&S 903[®]). El papel filtro S&S 903[®] es de elección para muestras de sangre para tamizaje neonatal ya que protege las proteínas presentes en ésta, permitiendo el

fácil manejo de las muestras. Los anticuerpos absorbidos en el papel filtro deben ser eluidos antes de poder realizar un ensayo por ELISA convencional.

En este caso, las condiciones que se evaluaron para lograr la adaptación fueron, para la elución se evaluaron tres eluyentes distintos (Amortiguador fosfato salino PBS 0.05M con tween 20 al 10%, amortiguador PBS con seroalbúmina bovina 5% y el diluyente del kit), dos temperaturas (25°C y 36°C), tres tiempos de elución (1, 18 y 24 hrs.) dos diferentes pozos para la elución (pozos de reacción y pozos planos) y dos diámetros distintos de muestra (3mm. y 6mm). Tomando en cuenta las variables anteriores se evaluaron distintas combinaciones para realizar el ensayo, y se realizaron cinco repeticiones.

Para la elución de anticuerpos IgM anti- *T. pallidum* se realizaron las primeras pruebas en pozos planos utilizando los dos diámetros de muestra, los tres eluyentes y las dos temperaturas, el eluido resultante se utilizó luego como muestra a diluir con el diluyente provisto por el kit según las indicaciones de éste, ninguna de estas combinaciones mostró buenos resultados a pesar de que la dilución del suero era la establecida por la casa comercial (1:21). La elución en pozos planos no proporcionó resultados satisfactorios, los controles positivos mostraron resultados por debajo del punto de corte, y el radio entre un resultado positivo y uno negativo no permitió una adecuada diferenciación.

Estas pruebas primarias permitieron determinar que los mejores resultados se obtuvieron cuando el tamaño de muestra fue de seis mm y la temperatura de elución fue de 25°C. A pesar de que la dilución final es la misma cuando se usan seis mm o tres mm, la cantidad de suero inicial es mayor en seis mm (12.27µL), por lo que hay mayor cantidad de anticuerpos para eluir que en una muestra de tres mm (6.135µL), razón por la cual este diámetro mostró mejores resultados. La temperatura de incubación a 25°C favoreció el desplazamiento de los anticuerpos fuera de la matriz, aumentando así la concentración de estos en el eluido. El amortiguador fosfato salino PBS 0.05M contiene Tween 20, detergente que permeabiliza las membranas y desplaza los anticuerpos absorbidos en la matriz de sangre en el papel filtro permitiendo así que estos migren más fácilmente.

Asimismo posee un pH 7.2 lo que favorece la elución de los anticuerpos. En cambio la seroalbumina bovina al 0.5% funciona como un proteína bloqueadora de los sitios activos de los pozos de reacción, eliminando de esta manera los sitios que no se encuentren unidos a los anticuerpos de la matriz, no permitiendo la unión del antisuero marcado a dichos sitios y obtener falsamente un pozo completamente coloreado.

La elución de anticuerpos directamente en los pozos de reacción mostró mejores resultados. Se evaluó también el ensayo en cámara húmeda por 18 y 24 horas a 36°C para evitar la desecación de las muestras, sin embargo los resultados no mostraron un radio bien definido entre los controles. También se realizó la elución de anticuerpos con el diluyente del kit proporcionando resultados menos aceptables, evidenciando que este diluyente no presenta características que favorecen la elución de anticuerpos.

La elución se realizó también durante una hora con amortiguador fosfato salino 0.05M con tween 20 al 10%, amortiguador PBS con seroalbúmina al 0.5% y diluyente del kit para ambos tamaños de muestra, obteniéndose mejores resultados cuando se utilizó amortiguador fosfato salino PBS 0.05M a 36°C en cámara húmeda y un diámetro de muestra de 6 mm, condiciones que fueron establecidas como las óptimas para el ensayo. La elución directamente en el pozo de reacción favorece la unión de los anticuerpos a los antígenos unidos al pozo y al utilizar únicamente una hora de elución, se evitó la aparición de un efecto de prozona y de reacciones inespecíficas.

En cuanto a la adaptación del método para la detección de anticuerpos anti - CMV, se realizaron pruebas en pozos planos utilizando amortiguador fosfato salino PBS 0.05M y seis mm con 1 y 18 horas de elución, condiciones ya establecidas para el ensayo para *T. pallidum*, sin embargo ninguno de estos factores mostró buenos resultados, probablemente porque el tiempo para que los anticuerpos se unieran a los antígenos no fue el suficiente o la temperatura no fue la ideal.

Es por ello que se realizó la elución de anticuerpos anti- CMV directamente en los pozos de reacción con las distintas variables para determinar las que mejores resultados mostraban. Se evaluaron 18 horas y 24 horas de elución pero ninguno mostró resultados satisfactorios. En algunos casos se observó un buen radio entre los controles positivos y negativos pero no se logró que los controles positivos estuvieran por encima del punto de corte por lo que no fueron aceptados. Los mejores resultados fueron observados utilizando amortiguador fosfato salino PBS 0.05M con diámetro de muestra de 6 mm y una hora de elución, pero a diferencia de la prueba para anti- *T. pallidum* se observó mayor radio cuando la elución se hizo a 25°C auxiliado por un rotador mecánico, es probable que la rotación favoreciera la elución de los anticuerpos fuera del papel filtro.

Previo a su aplicación con muestras clínicas se evaluó la sensibilidad y especificidad relativa de las dos metodologías adaptadas y estandarizadas a fin de conocer sus características, dando así validez a su uso como herramienta de diagnóstico, ya que la validez de un método asegura que este mide únicamente lo que debe medir.

La sensibilidad y especificidad relativa de ambos métodos de detección de anticuerpos anti- *T. pallidum* y de anticuepos anti – CMV fue de 100%, lo que indica que hay una probabilidad de 100% de que un paciente con anticuerpos IgM de un resultado positivo en la prueba y el 100% de probabilidad de que para un paciente sin presencia de anticuerpos IgM obtenga un resultado negativo.

Posteriormente se procedió a realizar el estudio piloto con las muestras clínicas obtenidas de neonatos para establecer así la frecuencia de sífilis y CMV congénita utilizando la metodología previamente estandarizada. Se obtuvieron 420 muestras, cuya distribución se muestra en la tabla 6. La mayor cantidad de muestras se obtuvo del Hospital Regional “San Juan de Dios” Zacapa, mientras que en la Cooperativa “El Recuerdo” San Pedro Jalapa fue donde se recolectó el menor número de muestras. Esto se debió a que en Zacapa, por ser un hospital regional, la cantidad de neonatos nacidos es mayor en comparación con los otros lugares en donde se realizó el muestreo.

En el caso de CMV se obtuvieron seis muestras positivas y tres muestras indeterminadas, las cuales fueron confirmadas por el mismo método en papel filtro. Posteriormente los resultados fueron confirmados séricamente por inmunoquimioluminiscencia, para lo cual se obtuvo una nueva muestra de la madre y del recién nacido. Sin embargo solo se obtuvieron muestras de 9 madres y 8 recién nacidos, en uno de los recién nacidos con resultado positivo para anticuerpos IgM anti CMV no fue posible la obtención de la muestra. De las 6 muestras positivas, una muestra materna se confirmó como positiva para anticuerpos IgM, mientras las 5 restantes resultaron negativas para anticuerpos IgM, sin embargo cuatro de ellas fueron positivas para anticuerpos IgG. Las cinco muestras de recién nacidos evaluadas fueron negativas para anticuerpos IgM, y cuatro positivas para anticuerpos IgG.

De los tres indeterminados, al ser confirmados séricamente dos muestras maternas fueron negativas para anticuerpos IgM pero positivas para anticuerpos IgG la tercera muestra fue indeterminada para anticuerpos IgM y positiva para anticuerpos IgG no siendo posible la obtención posterior de otra muestra sérica para establecer el estatus de anticuerpos IgM. En el caso de los neonatos todas las muestras resultaron negativas para anticuerpos IgM y dos muestras positivas para anticuerpos IgG (Tabla 7).

Cabe resaltar que los anticuerpos IgM desaparecen aproximadamente a los dos meses del inicio de la infección, mientras que los anticuerpos IgG permanecen de por vida (49). La obtención de los sueros confirmatorios se realizó de dos a tres meses después de la primera toma de muestra, período durante el cual se pudo dar la desaparición de los anticuerpos IgM por ausencia de una infección activa, quedando únicamente los anticuerpos IgG de memoria. Obteniendo de esta manera los resultados descritos anteriormente, de 7 muestras positivas y una negativa en las madres.

En el presente estudio no se demostró la presencia de anticuerpos IgM anti - CMV en los recién nacidos, posiblemente debido a que la frecuencia de la infección en ellos ocurre en menos del 0,5 % de los casos. Por la edad de

muestreo se puede considerar que los anticuerpos IgG determinados en los bebés valuados fueron traspasados intraútero de sus madres, confiriéndoles protección ante la infección por este virus (50).

Los resultados obtenidos en las confirmaciones con la muestra séricas no son comparables con los resultados obtenidos en las muestras impregnadas en papel filtro, ya que para esto se deben evaluar al mismo tiempo los dos métodos, tanto el método a evaluar como el método estándar, evitando así la variabilidad biológica en las muestras. Debido a esto no se calcularon los valores predictivo positivo y predictivo negativo.

En la tabla 8 se observan los resultados de las muestras evaluadas para anticuerpos IgM anti- *T. pallidum*. Una muestra presentó resultado positivo y dos resultados indeterminados, los que fueron confirmados primero con la misma metodología. Posteriormente se confirmaron mediante la detección de anticuerpos totales en suero, tanto de la madre como del recién nacido utilizando el método de inmunocromatografía en placa obteniéndose un resultado negativo para todas. Por ello la frecuencia final obtenida a partir del total de muestras procesadas es del 0% en la población evaluada, similar a la frecuencia de 0.72% reportada en el 2006 por el Centro Nacional de Epidemiología en 1522 mujeres embarazadas (45).

Cabe resaltar que el neonato con resultado positivo para anticuerpos anti- *T. pallidum* en el tamizaje, presentó también resultado positivo para anticuerpos anti- CMV, pero en la confirmación por las metodologías de referencia ambas dieron un resultado negativo, por lo que puede tratarse de un proceso autoinmune cuya hiperproducción de proteínas ocasione una reacción cruzada en la detección de anticuerpos por la metodología de ELISA, produciendo así resultados falsos positivos.

Las pruebas de tamizaje permiten la detección precoz de una enfermedad y la instauración temprana del tratamiento oportuno. Estas son de mayor calidad en la medida que ostenten una mejor combinación de su rendimiento, evaluada a través de los indicadores tradicionales de sensibilidad, especificidad, precisión y

exactitud. En la adaptación de metodologías para pruebas de tamizaje se busca la obtención de herramientas diagnósticas de sensibilidad muy alta que permitan filtrar a los individuos con infección latente de los sanos. Las metodologías estandarizadas durante este estudio mostraron muy buenos resultados con 100% de sensibilidad y especificidad relativa.

La importancia de implementar un programa de tamizaje neonatal para enfermedades infecciosas radica en la posibilidad de detectar muchas infecciones latentes antes de la aparición clínica de estas, infecciones como Sífilis o Citomegalovirus cuya detección temprana permite la prevención de secuelas como la sordera y el retraso mental. Al permitir la detección temprana se puede disminuir la mortalidad y la morbilidad de dichas infecciones aumentando el valor diagnóstico de un programa de tamizaje.

X. CONCLUSIONES

1. La adaptación del ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos IgM anti- CMV y anti- *Treponema pallidum* a la metodología de tamizaje neonatal en papel filtro se logró obteniéndose una especificidad y una sensibilidad del 100% para cada uno de los ensayos.
2. Las metodologías adaptadas cumplen con las características mínimas necesarias para realizar un tamizaje neonatal, ya que, ambos métodos presentan alta sensibilidad y especificidad.
3. La metodología para la detección de anticuerpos IgM anti - *T. pallidum* se estandarizó con la elución de anticuerpos con amortiguador fosfato salino 0.05M como eluyente, 6mm de diámetro de muestra, 36°C en cámara húmeda y 1 hora de elución de anticuerpos.
4. La metodología para la detección de anticuerpos IgM anti - CMV se estandarizó con la elución de anticuerpos con amortiguador fosfato salino 0.05M, 6mm de diámetro de muestra, 25°C con rotación constante y 1 hora de elución de anticuerpos.
5. No se encontró ningún caso positivo para anticuerpos IgM anti - *T. pallidum*, ni para anticuerpos IgM anti- CMV por lo que la frecuencia en la muestra estudiada fue de 0%.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar más estudios que confirmen la sensibilidad y especificidad de los métodos adaptados en este estudio para determinar los valores predictivos positivos y negativos de las metodologías.
2. Determinar la validez del método por medio de la aplicación tanto de la metodología a validar como uno de referencia en muestras tomadas simultáneamente tanto séricas como en papel filtro .
3. La investigación se debe profundizar, en estudios posteriores, para ampliar la información, determinar la prevalencia y características locales y regionales de la infección por CMV y sífilis, en recién nacidos.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gutiérrez J. *et al.* Infección congénita por citomegalovirus. Pautas para su diagnóstico. México. Rev. Mexicana de pediatría 1999 66 (55). 203-208.
2. Cancho R. *et al.* Encefalopatía por infección congénita por citomegalovirus. Caso Clínico. *Bol Pediatr* 2002; 42: 244-248
3. Fumarola A. *et al.* Microbiología y Parasitología Médica. 2 ed. España: Editorial Masson S.A. 1998. 1895p.
4. Horsfall J. *et al.* Viral and Rickettsial infections of man. 4 ed. Philadelphia Toronto: Editorial. B. Lippincott Company 1995. 544p.
5. Ruiz V, *et al.* Tratado de SEIMIC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. España: Panamericana. 2006. 2067p
6. Arana R. Prevalencia de Infección por Citomegalovirus en donadores que asisten al Banco de Sangre del hospital San Benito Peten. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. (Tesis de Graduación, Químico Biólogo) 2006.
7. Lucero A. Porcentaje de positividad de la infección por Citomegalovirus en mujeres embarazadas que asisten a maternidad del hospital Roosevelt. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. (Tesis de Graduación, Química Bióloga) 2006.
8. Valoup C. Infecciones materno-fetales de origen viral. Madrid. Acta Bioquím Clín Latinoam 2008; 42 (3): 361 -78.
9. Rodríguez M. *et al.* Infección Congénita por Citomegalovirus: Nuevos Aspectos Terapéuticos. Chile. Rev Chil Obstet Ginecol 2008; 73(6): 402 – 405
10. Diestefano L. *et al.* Diagnóstico de la infección congénita por citomegalovirus en muestras de sangre seca de recién nacidos en la tarjeta de Guthrie. Una técnica promisorio. Argentina. Arch Argent Pediatr 2008; 106(2):132-137.

11. Parsiow T., Suites O., Terra J. Inmunología básica y clínica. 10.ed. Rebetga, Trad. México. El Manual Moderno. 2002. p.917 (p. 158 -160, 167-184)
12. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. Clin Microbiol Rev 2002; 15(4):680-715.
13. Viglioglia, P. Infección por Citomegalovirus. *Atención a sus manifestaciones cutáneas. Act Terap Dermatol 2007; 30: 298*
14. Díaz A, Valdés M, Resik S. Infecciones por Citomegalovirus. Rev Cubana Med Gen Integr 1998;14(3):270-278.
15. Baquer-Artigao F. Citomegalovirus congénito: ¿es necesario un cribado serológico durante el embarazo? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009.doi:10.1016/j.eimc.2009.01.017.
16. OPS. Infecciones Perinatales: Transmitidas por la madre a su hijo. CLAP/SMR - Publicación Científica N°1567. Uruguay. 2008. pags.48 - 51.
17. Wallach J. Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio. Editorial Masson. 4ª edición 2002. (P. 1014 -1018)
18. Forouzan I. Fetal abdominal echogenic mass: an early sign of intrauterine cytomegalovirus infection. Obstet. Gynecol. 1992.
19. Omeñaca F. El Recién Nacido de alto riesgo. El citomegalovirus. 2003.
20. Recinos A. Investigación de Anticuerpos a Citomegalovirus por un método inmunoenzimático en niños menores de tres meses de edad y búsqueda complementaria de otros agentes del Síndrome TORCH. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación) 1982.
21. Ramírez A. Determinación de anticuerpos a citomegalovirus por el método de ELISA, en 48 pacientes embarazadas, del Hospital General San Juan de Dios, durante los meses de Mayo a Junio de

1986. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación) 1986.
22. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998;
23. Martínez A. *et al* Infecciones por citomegalovirus. *Rev Cub Med Gen Integr* 1999; 14: 66-68.
24. Revallo P., Gerna B. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:660- 683
25. Stern, H. Isolation of cytomegalovirus and clinical manifestation at different ages. 1968. *Br. Med. J.* 1:665-669.
26. Manchon, F. de *et al*. Seroepidemiología frente a citomegalovirus en la Comunidad de Madrid. *Rev. Esp. Salud Pública* [online]. 2001, vol.75, n.1 [cited 2009-09-13], pp. 00-00. Available from: <http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272001000100007&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1135-5727. doi: 10.1590/S1135-57272001000100007.
27. Revello MG and Gerna. G. Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002.
28. Torselli C. Infección por Citomegalovirus en mujer embarazada y su transmisión perinatal. Guatemala: Universidad Francisco Marroquí n. (Tesis de Graduación, médico y cirujano) 1995.
29. Juárez I. Prevalencia de infección por Citomegalovirus en donadores que asisten al banco de sangre del Hospital General San Juan de Dios. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación) 2003.
30. Hernández M *et. al*. Sífilis materna y congénita en dos hospitales mexicanos: evaluación de una prueba diagnóstica rápida. *Rev Invest Clin* 2006, 58 (2): 119-125

31. Bennet J, Plum F. Tratado de Medicina Interna. 20 ed. Pensilvania, USA: McGraw Hill Interamericana. Vol 2, No. 11, 1997, p.1967 -1976.
32. Usandizaga J, De la Fuente P. Tratado de Obstetricia y Ginecología. 2 ed. USA: McGraw Hill Interamericana, 2004. (p 275 — 277).
33. Koneman.E.W., *et al* Color Atlas and Textbook of diagnostic Microbiology. 5th. Ed. Philadelphia.1998.
34. Murray P, *et. al*. Microbiología Médica. 4 ed. Madrid, España: Elsevier Science, 2002. p 373 —378.
35. Lunar V, Cotran R, Robbins S. Patología Humana. 6 ed. Pensilvania, USA: McGraw Hill Interamericana, 1999. (p.639 -643).
36. Valderrama J k. *et. al*. Sífilis materna y sífilis congénita en América Latina: un problema grave de solución sencilla. Rev Panam Salud Pública. 2004;16(3):211-17
37. Abarzúa F. *et. Al*. Pesquisa de sífilis congénita al momento del parto: ¿Suero materno o sangre de cordón? Rev Chil infect 2008; 25(3) 155-161.
38. Harrison T, *et. al*. Principios de Medicina interna. 16 ed. México: McGraw Hill Interamericana. Vol. 2, 2005, (p 1088 — 1091).
39. Barba R. Tamiz neonatal: Una estrategia en la medicina preventiva. MG Rev Mex Patol Clin, Vol. 51, Núm. 3, pp 130-144 • Julio - Septiembre, 2004
40. Galban, E. *et. al*. Situación de la sífilis en 20 países de Latinoamérica y el Caribe: Año 2006. *DST – J bras Doenças Sex Transm 2007; 19(3-4): 166-172 – ISSN: 0103-4065.*
41. Clavero J. Tratado de Ginecología. 14 ed. Editorial Santos, 1993. p355—357.
42. Guía de atención a sífilis congénita. Asociación de médicos Colombianos. 2008
43. Escobar, E. Sífilis y embarazo. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Médicas) 1981.

44. Blanco, B. Uso de pruebas rápidas para el diagnóstico de hepatitis B, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y sífilis en mujeres embarazadas que acuden a control prenatal al Hospital General San Juan de Dios. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2004. 62 p.
45. García J. Estudio de Sífilis en Embarazadas que consultaron las maternidades periféricas del Departamento de Guatemala durante 2004 Julio 2006. Boletín del Centro Nacional de Epidemiología 2006. Mo VIII No. 442: p 4 y 5.
46. Rosanna W, Peeling Y. Diagnostic tools for preventing and managing maternal and congenital syphilis: an overview. Bulletin of the World Health Organization. June 2004; Vol 82: 439 -446.
47. Camargo E, *et al.* Newborn Screening for Congenital Infectious Diseases. Emerging Infectious Diseases. Vol. 10, No. 6, June 2004. pp. 5
48. García M, Cabezas S, *et al.* Determinación de Anticuerpos IgM contra Virus dengue partir de sangre absorbida en papel filtro: Un método alternativo y sencillo. Rev Peru Med Exp Salud Pública, 2000, vol.17, no.1-4, p.21-25. ISSN 1726-4634-
49. Blazquez, b *et. al.* Síndrome de Guillain-Barré por citomegalovirus en dos hermanos. Medidor del pico de flujo espiratorio como mecanismo de transmisión. Med Clin (Barc) 2002;119(8):315-9
50. Godoy, G *et. al.* Anticuerpos anti-citomegalovirus en sangre del cordón umbilical de recién nacidos. Rev. Soc. Ven. Microbiol. v.27 n.2 Caracas 2007

IX. ANEXOS.

Anexo 1. Resultado e interpretación de métodos serológicos

Resultado	Interpretación
No treponémica (-) Treponémica (-)	Se puede excluir la infección. Una excepción sería la infección reciente, por lo que si hay sospecha se deben repetir las pruebas después de 15 - 21 días.
No treponémica (+) Treponémica (+)	Es una infección sifilítica. La entrevista ayudará a establecer si es reciente o antigua, conocida o desconocida. Si se confirma que había sido diagnosticada y tratada correctamente puede ser una cicatriz serológica, sin embargo debe hacerse un seguimiento cuantitativo con el VDRL.
No treponémica (+) Treponémica (+)	Es una reacción treponémica específica (99,5% - 100%) Generalmente refleja la persistencia normal de anticuerpos al treponema y no infección activa.
No treponémica (+) Treponémica (-)	Es una reacción cardiolipínica no muy específica que puede estar debida a otras patologías incluyendo la gestación- Generalmente se trata de un falso positivo y no es un caso de sífilis gestacional. Confirmar con otras pruebas treponémicas (FTA -abs, TPHA)

Fuente: www.paho.org/Spanish/AD/FCH/AI/EliminaSifilisLAC.pdf

Anexo 2. Preparación de Amortiguadores de elución

1. Amortiguador fosfato salino (PBS) 0.05M

NaCl (g)	7.65 gr
Na ₂ HPO ₄ (g)	0.724 gr
KH ₂ PO ₄ (g)	0.21gr
Agua destilada (L)	1000mL
Glicerol (mL)	50.00mL

2. Amortiguador de seroalbúmina bovina

0.05M amortiguador fosfato salino	50 ml.
0.1% NaN ₃	5 ml. al 10%
0.01%EDTA	0.05 gr.
0.9% NaCl	4.5 gr.
0.5% seroalbúmina bovina	5gr.
Tween 20	1.25 ml al 10%
Aforar a 500 ml con agua destilada.	

Fuente: Therrell B. Laboratory Methods for Neonatal Screening. American Public Health Association, Washington, DC: 2005, pp 191 -234

Anexo 3. Carta de Consentimiento

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA BIOLÓGICA

Código: _____

HOJA DE CONSENTIMIENTO

Yo, _____, autorizo la utilización de la sangre de mi hijo y sus componentes para el seminario de investigación titulado "TAMIZAJE DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS, ADAPTACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN MÉTODO SEROLÓGICO PARA LA EVALUACIÓN DE UN MÉTODO SEROLÓGICO PARA LA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS IgM EN EL DIAGNÓSTICO DE SÍFILIS Y CITOMEGALOVIRUS CONGÉNITO. ESTUDIO PILOTO", que será realizado por la Facultad de Ciencias Química y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Entiendo que participar en este estudio no implica ningún daño para mi hijo y que los datos serán totalmente confidenciales.

Firma

Cedula No. _____

Anexo 4. Ficha de datos para la recolección de muestras de sangre

No. Registro _____
Parto Normal <input type="checkbox"/> Cesárea <input type="checkbox"/>
Sexo: Femenino <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/>
Hijo de: _____
Dirección: _____ _____
Teléfono _____

Número total de embarazos _____
Partos _____ Abortos _____ Mortinatos _____
¿Ha recibido transfusiones de sangre?
Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> ¿Cuándo? _____
Escolaridad
Primaria <input type="checkbox"/>
Secundaria <input type="checkbox"/>

Anexo 5. Cuadros y Cálculos estadísticos

Tabla 10. Radios de muestras para la evaluación de variables. Determinación de anticuerpos IgM anti – *T. pallidum* en pozos de fondo plano.

Tiempo / T°	PBS/3mm						PBS/6mm					
	CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO			CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO		
	I	SD	CV %	I	SD	CV %	I	SD	CV %	I	SD	CV %
1hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	0.18	0.016	8.7	0.05	0.002	3.2
1hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	0.45	0.016	3.5	0.2	0.032	15.8
18hr / 25°C	0.49	0.01	1.7	0.12	0.01	11	0.7	0.016	2.26	0.114	0.004	3.1
18hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
24hr / 25°C	0.43	0.03	7.9	0.06	0.01	23.6	0.58	0.02	3.4	0.574	0.011	1.98
24hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	0.1	0.014	14.1	0.03	0.002	6.7

Fuente: Datos Experimentales, Clave: I= Promedio de radio NR= No realizado, ND= No determinado, PBS= Amortiguador fosfato salino PBS 0.05M pH 7.2 + tween 20, hr = hora, mm= milímetros, CP= control positivo, CN= control negativo, SD= Desviación estándar, CV= coeficiente de variación.

Tabla No. 11 Radios de muestras para la evaluación de variables. Determinación de anticuerpos IgM anti – *T. pallidum* en pozos planos y amortiguador seroalbúmina bovina.

Tiempo / T°	BS/3mm						BS/6mm					
	CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO			CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO		
	I	SD	CV %	I	SD	CV%	R	SD	CV %	No.	SD	CV %
1hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	0.18	0.019	10.4	0.05	0.0019	3.85
1hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	0.45	0.016	2.3	0.2	0.022	11.2
18hr / 25°C	0.45	0.02	1.5	0.09	0.01	11	0.7	0.026	3.8	0.114	0.005	4.84
18hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
24hr / 25°C	0.57	0.03	5.6	0.14	0.02	16.8	0.35	0.03	7.28	0.16	0.015	9.88
24hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND

Fuente: Datos Experimentales, Clave: R= Promedio de radio NR= No realizado, ND: No determinado, BS= Amortiguador seroalbúmina bovina, hr = hora, mm= milímetros, CP= control positivo, CN= control negativo, SD= Desviación estándar, CV= coeficiente de variación.

Tabla 12. Radios de muestras para la evaluación de variables. Determinación de anticuerpos IgM anti – *T. pallidum* en pozos de reacción y amortiguador fosfato salino PBS 0.05M pH 7.2 + tween 20.

Tiempo / T°	PBS/3mm						PBS/6mm					
	CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO			CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO		
	R	SD	CV%	R	SD	CV%	R	SD	CV %	R	SD	CV%
1hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	1.3	0.04	3.42	0.6	0.1	4.7
1hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	1.4	0.02	1.13	0.5	0.1	3.16
18hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
18hr / 36°C	0.4	0.03	6.44	0.1	0.02	21	0.6	0.02	3.9	0.1	0.1	10
24hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
24hr / 36°C	0.53	0.02	3.53	0.13	0.02	18	0.54	0.02	3.93	0.12	0.1	8.3

Fuente: Datos Experimentales, Clave: R= Promedio de radio NR= No realizado, ND: No determinado, PBS= Amortiguador fosfato salino PBS 0.05M pH 7.2 + tween 20, hr = hora, mm= milímetros, CP= control positivo, CN= control negativo, SD= Desviación estándar, CV= coeficiente de variación.

Tabla 13. Radios de muestras para la evaluación de variables. Determinación de anticuerpos IgM anti – *T. pallidum* en pozos de reacción y amortiguador seroalbúmina bovina.

Tiempo / T°	BS/3mm						BS/6mm					
	CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO			CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO		
	R	SD	CV %	R	SD	CV %	R	SD	CV%	R	SD	CV
1hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
1hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	0.4	0.016	3.95	0.1	0.01	11.9
18hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	0.6	0.013	2.18	0.2	0.02	7.9
18hr / 36°C	0.2	0.019	9.35	0.1	0.007	7.1	0.5	0.02	4	0.1	0.01	13.3
24hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
24hr / 36°C	0.61	0.008	1.38	0.16	0.011	7	0.79	0.015	1.91	0.5	0.01	2.3

Fuente: Datos Experimentales, Clave: R= Promedio de radio NR= No realizado, ND: No determinado, PBS= Amortiguador Seroalbúmina bovina 5%, hr = hora, mm= milímetros, CP= control positivo, CN= control negativo, SD= Desviación estándar, CV= coeficiente de variación.

Tabla 14. Promedio de radios, desviación estándar y coeficiente de variación de los controles en las diferentes condiciones examinadas con el Diluyente del Kit en los pozos de reacción para anticuerpos anti – *T. pallidum*.

Tiempo / T°	DK/3mm						DK/6mm					
	CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO			CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO		
	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)
1hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	0.49	0.011	2.29	0.4	0.02	3.95
1hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
4hr / 37°C	0.13	0.011	8.5	0.16	0.016	9.9	0.1	0.011	10.9	0.04	0.01	3.67
18hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
18hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
24hr / 25°C	0.06	0.016	26.3	0.03	0.011	44	0.06	0.013	2.17	0.05	0.01	21.1
24hr / 36°C	0.15	0.024	16.3	0.07	0.014	20	0.29	0.027	0.2	0.1	0.02	20

Fuente: Datos Experimentales, Clave: NR= No realizado, ND: No determinado, DK= Diluyente del kit, hr = hora, mm= milímetros, CP= control positivo, CN= control negativo, SD= Desviación estándar, CV= coeficiente de variación.

Tabla 15. Promedio de radios, desviación estándar y coeficiente de variación de los controles en las diferentes condiciones examinadas con el Amortiguador Fosfato Salino PBS 0.05M en los pozos de fondo plano para anticuerpos anti - Citomegalovirus.

Tiempo / T°	PBS/6mm					
	CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO		
	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)
1hr / 25°C	0.36	0.016	4.6	0.24	0.02	8.1
18hr / 36°C	0.2	0.03	14.9	0.08	0.02	21.8

Fuente: Datos Experimentales, Clave: NR= No realizado, ND: No determinado, PBS= Amortiguador fosfato, hr = hora, mm= milímetros, CP= control positivo, CN= control negativo, SD= Desviación estándar, CV= coeficiente de variación.

Tabla 16. Promedio de radios, desviación estándar y coeficiente de variación de los controles en las diferentes condiciones examinadas con el Amortiguador Fosfato Salino PBS 0.05M en los pozos de reacción para Citomegalovirus.

Tiempo / T°	PBS/3mm						PBS/6mm					
	CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO			CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO		
	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)
1hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	2.15	0.43	17.9	0.56	0.545	8.61
1hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	1.43	0.02	1.53	0.65	0.46	8.6
18hr / 25°C	0.2	0.152	58.3	0.8	0.02	2.79	0.3	0.332	81.1	0.2	0.014	23
18hr / 36°C	0.3	16.7	49.2	0.15	0.03	22.6	NR	ND	ND	NR	ND	ND
24hr / 25°C	0.5	0.016	3.16	0.2	0.02	11.7	0.89	0.02	2.25	0.31	0.016	5.1
24hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	0.29	0.02	7.31	0.16	0.015	9.88

Fuente: Datos Experimentales, Clave: NR= No realizado, ND= No determinado, PBS= Amortiguador fosfato, hr = hora, mm= milímetros, CP= control positivo, CN= control negativo, SD= Desviación estándar, CV= coeficiente de variación.

Tabla 17. Promedio de radios, desviación estándar y coeficiente de variación de los controles en las diferentes condiciones examinadas con el Amortiguador Seroalbúmina bovina en los pozos de reacción para anticuerpos IgM anti - Citomegalovirus.

Tiempo / T°	BS/3mm						BS/6mm					
	CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO			CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO		
	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)
1hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
1hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
18hr / 25°C	0.2	0.152	58.3	0.8	0.02	38.03	0.1	0.011	12.1	0.1	0.014	12.1
18hr / 36°C	0.3	16.7	49.2	0.15	0.03	22.6	NR	ND	ND	NR	ND	ND
24hr / 25°C	0.5	0.016	3.16	0.2	0.02	11.7	0.7	0.18	26.3	0.4	0.016	5.1
24hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	0.29	0.02	7.31	0.61	0.015	9.88

NR= No realizado; ND: No determinado; BS= Amortiguador seroalbúmina bovina, hr= hora; mm= milímetros; CP= control positivo; CN= control negativo.

Tabla 18. Promedio de radios, desviación estándar y coeficiente de variación de los controles en las diferentes condiciones examinadas con el Diluyente del Kit en los pozos de reacción para Citomegalovirus.

Tiempo / T°	DK/3mm						DK/6mm					
	CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO			CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO		
	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)	No.	SD	CV (%)
1hr / 25°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
1hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
18hr / 25°C	0.2	0.152	58.3	0.2	0.02	38.03	0.1	0.011	12.1	0.1	0.014	12.1
18hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND
24hr / 25°C	0.28	0.016	3.16	0.2	0.02	11.7	0.3	0.18	26.3	0.2	0.016	5.1
24hr / 36°C	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND	NR	ND	ND

Fuente: Datos Experimentales, Clave: NR= No realizado, ND: No determinado, DK= Diluyente del kit, hr = hora, mm= milímetros, CP= control positivo, CN= control negativo, SD= Desviación estándar, CV= coeficiente de variación.