

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VALORACION DE LOS METODOS: VDRL, RPR, MICROHEMAGLUTINACION DE
ANTICUERPOS AL *Treponema pallidum* y FTA-ABS
PARA LA INVESTIGACION DE SIFILIS

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ROSA MARIA CONDE DURAN

México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

Capítulo		Página
I	Introducción	1
II	Antecedentes	4
III	Material y Métodos	7
	3.1 Prueba de VDRL	7
	3.2 Prueba de RPR en tarjeta	14
	3.3 Prueba de FTA-ABS	18
	3.4 Prueba de MHA-TP	26
IV	Resultados	36
V	Análisis de los resultados	37
VI	Discusión	40
VII	Conclusiones	42
VIII	Bibliografía	44

CAPITULO I

INTRODUCCION

Aún cuando se ha logrado abatir el número de casos de sífilis en nuestro país, este padecimiento sigue siendo un problema de salud pública por sus complicaciones, cronicidad y repercusiones físicas y psicosociales para el individuo. A pesar de que el tratamiento es relativamente sencillo, continúa siendo la trepanomatosis más frecuente (1).

Uno de los principales factores es la poca sintomatología que presenta la evolución de la sífilis no tratada, lo que permite su propagación puesto que puede pasar inadvertida aún para el mismo enfermo.

En efecto, en la evolución de la sífilis no tratada habitualmente ocurren períodos sintomáticos y asintomáticos durante su etapa reciente y un largo estado de latencia en la etapa tardía, interrumpido entre el 15 y el 25% de los casos por manifestaciones nerviosas, cardiovasculares, viscerales, óseas, cutáneas, etc.

Tanto el chancro, como las lesiones de secundarismo, a veces resultan bloqueadas, cuando la persona infectada ha recibido ocasionalmente antibióticos y dichas lesiones sólo duran unas cuantas semanas: la lesión primaria aparece entre los 10 y 90 días que siguen al contagio y en cuanto al secundarismo, aproximadamente el 85% ocurre dentro de los dos primeros años de la infección.

En cambio, los períodos de latencia ocupan casi todo el tiempo en la evolución del padecimiento. Es así que la gran mayoría de los sujetos sifilíticos no tratados que existen en una comunidad se encuentran en la fase asintomática. Por lo tanto, son dos los puntos de partida básicos que se presentan para iniciar el descubrimiento de nuevas infecciones por sífilis:

1. Pacientes que presentan manifestaciones clínicas atribuibles a la sífilis, en cuyo caso los exámenes serológicos resultan ser indispensables para confirmar el diagnóstico presuntivo.

2. Personas que presentan serología positiva en aparente estado de salud. Pueden tener o no antecedentes específicos bien definidos, ya sean clínicos, de tratamiento o de exposición al contagio. En estos casos, el estudio serológico resulta ser fundamental en el descubrimiento de personas seropositivas para la detección de sífilis (2).

Los estudios serológicos constituyen muchas veces el único dato disponible, por eso es de suma importancia que el resultado serológico en el cual se apoya el diagnóstico de sífilis sea de lo más confiable.

Actualmente se utilizan comúnmente dos métodos: el Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) como prueba primaria en grupos numerosos de población y el Fluorescent Treponemal Antibody Absorption (FTA-ABS) como prueba de confirmación o en serologías dudosas. La prueba de VDRL es la básica dentro de las no treponémicas por su estandarización, disponibilidad, bajo costo y sencillez. Sin embargo, el elevado número de reacciones falsas positivas que se presentan en diversas afecciones agudas y crónicas, incluso en personas sanas, causa grandes problemas de carácter diagnóstico, económico, psicológico y social (3-5).

Por otra parte, la prueba de FTA-ABS tiene una sensibilidad y especificidad muy altas, por lo que casi no presenta reacciones falsas positivas; pero requiere de material y reactivos de elevado costo, así como de personal bien adiestrado, por lo que únicamente se trabaja en laboratorios especializados.

Se han realizado investigaciones sobre nuevas técnicas para la detección de sífilis, entre las cuales sobresale la prueba treponémica conocida como Microhemagglutination Assay for Treponemal Antibodies (MHA-TP) por su

bajo costo y facilidad de ejecución, cuya sensibilidad y especificidad se han comparado a las del FTA-ABS (6-16).

El presente estudio tiene como objetivo evaluar comparativamente la confiabilidad del método MHA-TP, así como la del VDRL y la del Rapid Plasma Reagin (RPR), tomando como referencia el FTA-ABS. Asimismo se pretende a nalizar cual de ellos presenta menos desventajas.

Para este fin se emplearon sueros de dos poblaciones diferentes en cuanto a seropositividad:

a) Del Centro de Adiestramiento "Dr. Eliseo Ramírez" de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, donde acuden pacientes para control de tratamiento antisifilítico, que han tenido contacto con algún enfermo, o bien porque existen sospechas de la infección. Se trata de una población con alta seropositividad. Se probaron 2,910 sueros con el VDRL, de los que se seleccionaron 81 con positividad 1:1 y 1:2 por ser en estas diluciones donde se observa mayor número de falsas positivas.

b) De la Clínica 31 del Instituto Mexicano del Seguro Social, se probaron 1,750 sueros de pacientes que acuden a exámenes preoperatorios, prenatales, o porque existen sospechas de la infección. Es una población con baja seropositividad. Se seleccionaron 40 sueros probados con el VDRL y RPR en tarjeta, positivos en alguna de las dos pruebas o en ambas en diluciones 1:1 y 1:2.

Los 121 sueros positivos en ambas poblaciones se probaron después por las pruebas treponémicas MHA-TP y FTA-ABS.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

La serología de la sífilis se inicia en 1906, cuando Wasseman descubrió el uso del antígeno, un extracto acuoso de los tejidos sifilíticos de un hombre, para demostrar anticuerpos séricos mediante un procedimiento de fijación de complemento aplicado a un paciente sifilítico. Wasseman supuso que su antígeno consistía de un antígeno de treponema. Más tarde se demostró que los extractos alcohólicos de muchos tejidos normales de animal producían los mismos resultados. Este material no relacionado con el treponema, denominado lipoide, era bastante crudo y producía muchas reacciones no específicas.

El posterior aislamiento y purificación de dos sustancias reactivas a partir de músculo de corazón de buey: la cardioplipina y lecitina, produjo el antígeno más específico utilizado en la prueba de VDRL. Este antígeno consiste de cardioplipina, lecitina purificada, colesterol y alcohol.

Distintos autores describieron modificaciones de la prueba de cardioplipina, relacionadas en su mayoría con alteraciones en la composición o preparación del antígeno, la concentración del cloruro de sodio o el tiempo de incubación. Estas modificaciones conservan el nombre del individuo que las desarrolló, como Kline, Mazzini, Hinton y Khan (17-18).

Desde la introducción del diagnóstico serológico de la sífilis, se señalaron condiciones en que se obtienen resultados positivos en ausencia de sífilis, como en diversas afecciones agudas o crónicas, entre las cuales, figuran algunos tipos de lepra, mononucleosis infecciosa, malaria, enfermedades de la colágena e infecciones virales; en situaciones especiales, tales como ciertas drogadicciones, después de algunas inmunizaciones y aún, muy excepcionalmente en personas calificadas como sanas: una de cada

600 o más, según algunos investigadores (19-21).

Este tipo de reacciones falsas positivas que presentan las pruebas serológicas no específicas en un índice elevado, condujeron a investigar el antígeno específico del *Treponema pallidum* y desarrollar nuevas metodologías que brindaran una mayor confiabilidad en los resultados serológicos. Así, en 1949, se introdujo la Prueba de Inmovilización del *Treponema* (TPI), lo que representó un gran avance en esta dirección. La TPI utiliza como antígeno una cepa de *Treponema pallidum* vivo, cultivado de testículo de conejo y suspendido en un medio de supervivencia. El antígeno se mezcla con el suero del paciente y se incuba, a continuación se observa en el campo oscuro para determinar la proporción de treponemas inmovilizados con respecto a la de los controles. Los sueros que causan inmovilización se denominan TPI positivos. Este método ha sido reconocido como método de referencia frente al cual se miden todas las demás pruebas serológicas de la sífilis. Técnicamente es difícil de realizar y el procedimiento varía de un laboratorio a otro.

Muchos han sido los esfuerzos para elaborar reacciones específicas utilizando al *Treponema pallidum* y siempre se ha encontrado como obstáculo insuperable la imposibilidad de su cultivo. Producto de estos intentos fue lograr el cultivo de una cepa de treponemas no patógenos: el *treponema* de Reiter. De él se obtiene una fracción proteica asociada al RNA que se utilizó como antígeno en una prueba de fijación del complemento. Esta prueba se desechó porque carece de especificidad para *Treponema pallidum* (22).

En 1957, la metodología de anticuerpos fluorescentes aplicada a la sífilis, condujo al procedimiento de FTA-ABS, el cual es altamente específico y sensible. El antígeno consiste de una cepa Nichols de *Treponema pallidum*, cultivado en testículo de conejo y fijado a un porta. Durante el desarrollo de este método se utilizó en primer lugar una dilución al 1:5 del suero del paciente, pero produjo demasiadas reacciones falsas positivas debido a la presencia de anticuerpos no específicos en los sueros de

los pacientes. La dilución del suero hasta 1:200 (FTA-200) eliminó las reacciones no específicas, pero también diluyó muchas reacciones positivas verdaderas.

Finalmente se desarrolló el método de FTA-ABS. En este método, se absorbe una dilución al 1:5 del suero del paciente con un extracto de un cultivo de treponema de Reiter para eliminar los anticuerpos no específicos. La sensibilidad del FTA-ABS es equivalente y en algunos casos incluso mejor que la de la TPI (23).

Una prueba relativamente nueva que ha ganado popularidad es la de MHA-TP, cuyos resultados han sido evaluados por varios investigadores en los últimos años. Esta prueba desarrollada por Rathlev en 1965, 1967 (24) y modificada por Tomizawa T. y Kasamatsu en 1966 (25), se basa en la aglutinación por anticuerpos al *Treponema pallidum*, de eritrocitos de carnero sensibilizados.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

Se tomaron muestras de sangre:

a) A 1,750 pacientes que acuden a consulta a la Clínica 31 del IMSS. Con el suero obtenido de estas muestras se efectuaron en cada uno la prueba de VDRL y la de RPR. De los sueros que resultaron positivos, se seleccionaron 40 con positividad 1:1 y 1:2.

b) En el Centro de Adiestramiento "Dr. Eliseo Ramírez" de la SSA, se tomaron muestras de sangre a 2,910 pacientes que acuden a consulta. Con el suero obtenido de estas muestras se efectuó a cada uno la prueba de VDRL. De los sueros que resultaron positivos, se seleccionaron 81 con positividad 1:1 y 1:2.

Con los 121 sueros seleccionados se efectuaron en cada uno la prueba de MHA-TP y la de FTA-ABS como referencia.

3.1 Prueba de VDRL.

Esta prueba, así como todas las serológicas no específicas, se funda en la reacción entre una sustancia parecida al anticuerpo que se encuentra en sueros de personas sifilíticas y un antígeno inespecífico: el fosfolípido difosfatidil glicerol que recibió el nombre de cardiolipina por haberse aislado de músculo cardíaco.

La reacción que se lleva a cabo es de fluculación, parecida a las reacciones de precipitación, pero utiliza cardiolipina en suspensión acuosa, finamente dispersada debido a la acción del colesterol y la lecitina, en lugar de emplear un antígeno soluble. Se estandariza mediante un ajuste del contenido de lecitina, con objeto de obtener resultados reproductibles cualitativa y cuantitativamente. El colesterol proporciona los cen-

tros de absorción, de forma que las partículas aglutinadas puedan visualizarse. La solución al 1% de cloruro de sodio con amortiguador de fosfatos también es importante para la adecuada aglutinación del antígeno en presencia del anticuerpo. (17).

Debido a que la cardiolipina es un componente normal del tejido del huésped, no se ha establecido en forma precisa si el estímulo antigénico primario para el anticuerpo anticardiolipina procede del organismo invasor o del huésped y por tanto, si la presencia de este anticuerpo representa una respuesta autoinmune. El hecho de que aparezca en algunas otras enfermedades, especialmente en el lupus eritematoso, ha apoyado durante mucho tiempo la teoría autoinmune (22).

3.1.1 Material para la prueba de VDRL:

- a) Rotador mecánico, ajustable a 180 rpm, que circunscriba círculos de 4 cm de diámetro en un plano horizontal.
- b) Aparato para hacer anillos de parafina de aproximadamente 15 mm de diámetro.
- c) Agujas hipodérmicas.
- d) Placas de 5x7 cm, con anillos de parafina o cerámica de aproximadamente 15 mm de diámetro.
- e) Jeringa de 5 ml.
- f) Frasco de vidrio de 30 ml, con tapón esmerilado o de plástico, boca angosta, de aproximadamente 35 mm de diámetro, de fondo interior plano.
- g) Pipetas de 1 ml.

3.1.2. Reactivos para la prueba de VDRL:

A. Antígeno.

El antígeno para este ensayo es una solución alcohólica conteniendo 0.03% de cardiolipina, 0.9% de colesterol y cantidad suficiente de lecitina para producir una reactividad estandar. Cada lote del antígeno debe ser normalizado serológicamente comparándolo con un antígeno de reactividad conocida.

Se proporciona el antígeno en frascos de 5.0 ml cada uno; debe almacenarse bien tapado y a temperatura ambiente, en la oscuridad. Medir el antígeno exactamente al sacarlo del frasco, usando una pipeta muy limpia y seca. Los componentes de este antígeno permanecen en solución a temperaturas comunes, y cualquier precipitación que se note indicará cambios atribuibles a la evaporación o a materias extrañas provenientes de la pipeta. Desechar cualquier frasco de antígeno en que haya ocurrido la precipitación.

3.1.3 Como preparar el suero:

Centrifugar la sangre íntegra coagulada a fin de separar el suero claro, y calentar a 56°C por 30 minutos. Examinar todos los sueros al sacarlos del baño maría, y calentar de nuevo los que tengan partículas suspendidas. Los sueros que se utilicen después de 4 horas de calentados, deben reinactivarse a 56°C por 10 minutos.

3.1.4. Como preparar la solución salina:

La solución salina amortiguadora conteniendo cloruro de sodio al 1% se prepara de la siguiente manera con sustancias q.p. para reactivos analíticos:

Fomaldehído neutro	0.5 ml
Fosfato disódico, anhidro.....	0.093 g
Fosfato monopotásico	0.170 g
Cloruro sódico	10.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Al ser sometidos a ensayos potenciométricos, esta solución tiene un pH de 6.0 ± 0.1 .

Una solución salina al 0.9% se prepara añadiendo 900 mg de cloruro sódico seco a cada 100 ml de agua destilada.

3.1.5. Como preparar las placas:

Usar placas de vidrio (5x7 cm), marcadas con 12 círculos de parafina, cada círculo de diámetro interior de 15 mm. Limpiar las placas de vidrio

nuevas con polvo para pulir y quitar el polvo cuando ya estén secas, con un trapo limpio. Las placas usadas deben lavarse en agua caliente para quitarles la parafina, después con jabón y enjuagarlas, entonces se preparan tal como se hace con las placas nuevas.

Sujetar las placas de los bordes para no marcar con las huellas digitales las superficies destinadas a las reacciones. El suero se extenderá dentro de los círculos en las placas limpias. Si el suero no se extiende fácilmente, es indicación de que la placa está sucia y por lo tanto, no debe usarse. Los círculos de parafina se hacen con moldes de metal con parafina caliente y depositados sobre la superficie de la placa.

3.1.6 Como preparar la emulsión de antígeno:

- a) Con una pipeta depositar 0.4 ml de solución salina amortiguadora en el fondo de un frasco de 30 ml, con un tapón esmerilado o de tornillo.
- b) Añadir 0.5 ml de antígeno (tomado con la parte inferior de una pipeta de 1 ml graduada hasta el extremo) directamente sobre la solución salina, girando el frasco continua y suavemente sobre una superficie plana. Nota: Añadir el antígeno gota a gota, pero rápidamente, a fin de que cada 0.5 ml de antígeno tarda seis segundos. El extremo de la pipeta debe quedar en la parte superior del frasco y no se debe girar con tanta fuerza que la solución salina moje la pipeta.
- c) Soplar por la pipeta para expeler la última gota del antígeno sin que la pipeta toque la solución salina.
- d) Continuar girando el frasco por 10 segundos más.
- e) Añadir 4.1 ml de la solución salina amortiguada con una pipeta de 5 ml.
- f) Tapar el frasco y agitar vigorosamente durante 10 segundos, de manera que el contenido del frasco choque alternativamente con el fondo y el tapón.
- g) La emulsión del antígeno está ahora lista para usarse. Esta cantidad (5.0 ml) es suficiente para efectuar aproximadamente 250 reacciones serológicas.
- h) Para preparar de una sola vez una cantidad doble de emulsión de anti-

geno y de la solución salina. Si se necesita más emulsión del antígeno, hacer varias mezclas separadas que pueden combinarse y usarse en la reacción.

3.1.7. Como ensayar la aguja usada con la emulsión antigénica:

El número de partículas de antígeno por campo microscópico lo determina el tamaño de la gota de la emulsión del antígeno que se use; por lo tanto, es sumamente importante examinar cuidadosamente la aguja usada todos los días.

Tomar la emulsión del antígeno con una jeringa de 2 o 5 ml y una aguja hipodérmica de bisel regular de calibre 22 o de bisel largo de calibre 23 o 18 sin bisel, aguja cortada, gotear en posición vertical. De un mililitro se deben obtener 60 gotas de la emulsión antigénica. Tomar la jeringa con el bisel de la aguja para abajo y la superficie que libera las gotas en posición horizontal. Para lograr gotas de tamaño más pequeño, aumentar el ángulo en que se sujeta la jeringa. Prescindiendo del método empleado para añadir la emulsión antigénica, es de suma importancia usar una cantidad exacta (1/60 ml) de la emulsión antigénica. La práctica demostrará el mejor método de añadir rápidamente la emulsión antigénica, pero es importante conseguir siempre gotas del mismo tamaño. Cuando permanece la emulsión antigénica en un lugar por varias horas antes de usarse, se debe mezclar girando el frasco suavemente y llenando y vaciando la jeringa.

3.1.8 Ensayo preliminar de la emulsión antigénica

Cada preparación de la emulsión antigénica debe ser examinada cuidadosamente, ensayándola con sueros positivos y negativos conocidos. Añadir una gota de la emulsión antigénica a 0.5 ml de cada suero y proceder del modo descrito bajo reacción cualitativa con suero. Estas reacciones deben dar resultados típicamente positivos y negativos, respectivamente, y el tamaño y el número de partículas del antígeno por campo microscópico en el suero debe ser óptimo.

Si las partículas del antígeno en el suero negativo parecen demasiado grandes, generalmente es porque la emulsión antigénica no se preparó correctamente y las emulsiones deben desecharse.

3.1.9 Reacción cualitativa con suero:

- a) Con una pipeta depositar 0.05 ml del suero inactivado en un círculo de parafina de la placa.
- b) Añadir una gota (1/60 ml) de la emulsión antigénica a cada círculo con suero.
- c) Agitar las placas por cuatro minutos, con movimientos rotatorios (si se agita a mano, sobre una superficie lisa, el movimiento debe describir un círculo de 5 cm. de diámetro 120 veces por minuto). También se puede usar un rotador de tipo Boerner a 180 rpm.
- d) Los resultados de las reacciones se leen inmediatamente después de agitar las placas.

Nota: se deben incluir siempre controles de sueros positivos, positivos débiles y negativos.

3.1.10 Como leer e interpretar los resultados de las reacciones:

Las reacciones se deben leer microscópicamente, con un objetivo a seco débil (10X). Las partículas del antígeno aparecen en forma de cilindros cortos a este aumento y dependiendo del tamaño de los conglomerados de éstas, se interpretan los diferentes grados de positividad.

Lectura	Interpretación
Sin grumos o con leve grado de aspereza	Negativo (N)
Grumos pequeños	Positivo débil (PD)
Grumos medianos y grandes	Positivo (P)

Una cantidad excesiva de anticuerpo en el suero problema, ocasiona una reacción atípica que se reconoce por los grumos grandes e irregulares y las características indefinidas en sus bordes. La reacción positiva franca se caracteriza por grumos grandes o pequeños de tamaño uniforme y la ex-

perencia demostrará la diferencia entre esta reacción y las reacciones atípicas en las cuales aparecen grumos grandes y/o pequeños mezclados con las partículas de antígeno libre.

En estos casos o siempre que se sospeche la existencia de una reacción insatisfactoria, el suero debe ser diluido al 1:5 y al 1:25 y reexaminado. Si la reacción máxima lograda con cualquiera de estas diluciones es mayor que la obtenida con el suero sin diluir, se considera esa como el resultado del ensayo. Preparar las diluciones poniendo 0.4 ml de solución salina en cada uno de los dos tubos añadiendo 0.1 ml del suero calentado al primer tubo. Mezclar y traspasar 0.1 ml al segundo tubo.

3.1.11 Reacción cuantitativa con suero:

Las reacciones cuantitativas se efectúan usando una serie de sueros diluidos en solución salina y cada dilución se trata como un suero individual y se ensaya del modo descrito bajo reacción cualitativa con suero.

Usar una solución salina al 0.9% recién preparada para hacer estas diluciones. Las diluciones del suero se preparan poniendo 0.5 ml de solución salina en cada uno de seis o más tubos. Al tubo 1 añadir 0.5 ml del suero calentado, mezclar bien y pasar 0.5 ml al tubo 2. Se continúa esta operación hasta que el tubo seis contenga 0.5 ml. De esta manera se preparan diluciones al 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, etc. Se ensaya cada dilución serológica de la manera descrita bajo reacción cualitativa con suero.

3.1.12 Como leer e interpretar las reacciones cuantitativas:

- a) Las reacciones se leen microscópicamente a un aumento de 100 X de la manera descrita para el procedimiento cualitativo.
- b) Se reportan los resultados en términos de la mayor dilución serológica que produce una reacción positiva franca (no positiva débil). (26)

3.2 Prueba de RPR en tarjeta.

Las pruebas no treponémicas conocidas como "pruebas rápidas de reagina en tarjeta" se desarrollaron como métodos selectivos en situaciones de campo, donde el equipo es limitado. El antígeno que se emplea es el de VDRL, con algunas modificaciones como son la adición de cloruro de colina y partículas de carbón vegetal. El cloruro de colina tiene como finalidad inactivar el suero o plasma, en vez de usar el calentamiento y las partículas de carbón vegetal permiten la identificación macroscópica de la floculación mediante grumos negros contra el fondo blanco de la tarjeta (17).

3.2.1 Material para la prueba de RPR en tarjeta:

A. Tubos goteros de plástico.

- a) Se usan para transferir el suero no calentado o plasma, del tubo a la superficie de la tarjeta. En pruebas cualitativas, se usa un tubo de plástico para cada muestra.
- b) Cada tubo gotero tiene un extremo sellado que se utiliza para extender la muestra depositada en toda el área del círculo.
- c) Los tubos goteros están diseñados para depositar sobre la tarjeta 0.05 ml de suero, más un pequeño excedente para compensar el suero retenido por la punta sellada cuando se extiende el suero.

B. Tarjetas recubiertas de plástico con 10 círculos de 18 mm.

Deberá tenerse precaución de no usar las tarjetas si contienen residuos de grasa porque esto puede falsear los resultados.

C. Aguja.

- a) Para mantener libre el pasaje de la aguja, una vez utilizada, se retira del envase y se enjuaga con agua destilada. No debe limpiarse la aguja, ya que eliminará los silicones de recubrimiento y puede afectar la medida de la gota del antígeno.
- b) Para revisar la entrega de antígeno de la aguja, se llena una pipeta serológica de 1 ml en posición vertical con la suspensión antigénica. Contar el número de gotas depositadas en 0.5 ml. El número

correcto de gotas debe ser de 30 ± 1 gota.

D. Frasco gotero de polietileno.

En el frasco gotero se vacía el contenido del ampulla con antígeno. Cuando se va a depositar la gota de antígeno, se le inserta la aguja. Para guardarse el remanente de antígeno se cierra con la tapa de rosca una vez que ha sido retirada la aguja.

E. Aparato de rotación de 100 rpm, que circunscriba un círculo de 2 cm de diámetro, con medidor de tiempo automático y cubierta húmeda.

Las rotaciones entre 95 y 110 rpm no afectan significativamente los resultados obtenidos. Abajo de 95 rpm y arriba de 110 rpm, hay una tendencia de los grumos de antígeno a ser menos intensos en las pruebas con sueros no diluidos, así como algunas reacciones débiles pueden no ser notadas. En la cuantificación, la rotación arriba de 110 rpm tiende a producir una disminución en el título, aproximadamente una dilución más baja.

3.2.2 Reactivos para la prueba de RPR.

A. Suspensión Antigénica.

- a) La suspensión antigénica está formada por: 0.03% de cardiolipina, 0.02 - 0.022% lecitina, 0.09% colesterol, 0.0125 M EDTA, 0.01M Na_2HPO_4 , 0.01M KH_2PO_4 , 0.1% merthiolate (preservativo), 0.01875% carbón (especialmente preparado), 10% cloruro de colina w/v y agua destilada.
- b) Se conserva en refrigeración a $2^\circ - 8^\circ\text{C}$. No debe congelarse. Puede usarse hasta 12 meses después de la fecha de elaboración. Una vez abierta la ampolleta, el remanente se refrigera a $2^\circ - 8^\circ\text{C}$ y la reactividad es satisfactoria aproximadamente por 3 meses. Cuando el remanente se guarda a 26°C , puede usarse durante un mes.
- c) Debe homogeneizarse bien antes de usarse. No debe utilizarse inmediatamente después de refrigerar, antes debe estar a la temperatura ambiente, pues los resultados decrecen en sensibilidad.

B. Controles positivo y negativo.

Controles con patrones establecidos de reactividad que deben incluirse en cada lote de pruebas para confirmar la reactividad óptima de la suspensión antigénica. Deben conservarse refrigerados a 2° - 8°C.

C. Solución salina (0.9%)

Para realizar las pruebas cuantitativas.

3.2.3 Procedimiento para la reacción cualitativa.

- a) Tomar el tubo gotero entre el pulgar y el índice cerca del extremo sellado. Apretar y no soltar la presión hasta que el extremo abierto esté abajo de la superficie de la muestra, tomando la muestra con el tubo en posición vertical para minimizar la agitación de los elementos celulares, cuando se usa el tubo original de la muestra. Soltar la presión de los dedos para detener la muestra en el tubo gotero.
- b) Tomando el tubo gotero en posición vertical, directamente sobre el círculo de prueba de la tarjeta, depositar una gota (sin tocar la superficie de la tarjeta), apretando el tubo gotero.
- c) Invertir el tubo gotero, y con el extremo sellado extender la muestra hasta los límites del círculo. Descargar el tubo gotero. Repetir el procedimiento para cada suero que se vaya a probar.
- d) Agitar el frasco gotero con el antígeno antes de usarlo. Colocar la aguja y depositar algunas gotas de antígeno en la tapa de rosca del frasco para eliminar burbujas de aire. Agregar una gota de antígeno en cada círculo de prueba donde se encuentran los sueros. No mezclar. La mezcla completa se realiza durante la rotación. Recoger las gotas de antígeno que se depositaron en la tapa de rosca. Quitar la aguja del frasco gotero y cerrarlo.
- e) Mantener la tarjeta en rotación por 8 minutos a 100 rpm. Después de la rotación, diferenciar los resultados negativos de los débilmente positivos, haciendo una ligera rotación e inclinación de la tarjeta sobre la mano. Inmediatamente leer macroscó-

picamente cada círculo de reacción bajo una fuente de luz intensa.

Informar como: Positivo.- característico agrupamiento o grumos negros que pueden ser muy marcados o muy ligeros, pero definidos.

Negativo.- una suspensión uniforme de color gris.

3.2.4 Procedimiento para la reacción cuantitativa.

- a) Para cada muestra que se va a analizar, poner 0.05 ml de solución salina 0.9% dentro de los círculos numerados 2 al 5. Puede utilizarse un capilar de línea roja o una pipeta serológica de 1 ml, o menos. No extender la solución salina.
- b) Usando el capilar marcado con línea roja graduado a 0.05 ml, llenar hasta la marca con el bulbo y depositar 0.05 ml de muestra en el círculo 1.
- c) Llenar el capilar otra vez hasta la marca de 0.05 con la muestra, hacer las diluciones mezclando los 0.05 ml de suero con la solución salina del círculo 2, subiendo y bajando la mezcla en el capilar, 5 o 6 veces. Evitar la formación de burbujas. Transferir 0.05 ml de la mezcla al círculo 3, repetir la dilución y pasar al círculo 4 y después al 5. Descargar 0.05ml después de mezclar el contenido en el círculo 5.
- d) Usando un tubo gotero limpio, extender las diluciones empezando por la mayor, es decir, por el círculo 5, llenando la superficie del círculo.
- e) Homogeneizar la suspensión antigénica. Tomando el frasco gotero en posición vertical, agregar una gota en cada círculo de prueba. No mezclar. La mezcla completa de suspensión antigénica y la dilución de cada suero se realiza durante la rotación.
- f) Rotar por ocho minutos, bajo cubierta húmeda a 100 rpm. Después de la rotación, diferenciar los resultados negativos de los débilmente positivos o positivos moderados haciendo una ligera rotación e inclinación de la tarjeta sobre la mano. Inmediatamente leer macroscópicamente cada círculo de reacción bajo una fuente

de luz intensa.

3.2.5. Informar en términos de la más alta dilución que presente un resultado positivo, débilmente positivo o positivo moderado (26).

3.3 Imunofluorescencia.

La inmunofluorescencia se basa en el empleo de fluorocromos que se conjugan con el anticuerpo para poder identificar la unión de éste al antígeno por medio de la emisión de luz fluorescente en el microscopio de fluorescencia.

Los fluorocromos son colorantes que absorben energía radiante de cierta longitud de onda cuando son excitados; las moléculas excitadas son entonces capaces de emitir energía luminosa de una longitud de onda mayor a la absorbida y cesa casi inmediatamente después de suspender la energía excitadora. A este efecto se le llama fluorescencia. Los fluorocromos que se emplean en inmunofluorescencia son múltiples, pero el más comúnmente utilizado es la fluoresceína que es excitada por luz ultravioleta para emitir luz visible verde amarillenta (27).

Para que los fluorocromos puedan ser fácilmente conjugados a las proteínas es necesario formar derivados que contengan grupos químicamente activos como el isotiocianato de fluoresceína. Así, un suero inmune o su fracción inmunoglobulina puede ser marcado por medio de una firme unión al fluorocromo e identificarse en una forma muy llamativa cuando es excitado. A esto se debe la sensibilidad de la prueba a pequeñas concentraciones de antígeno, anticuerpo o complemento, ya que el suero inmune o conjugado mantiene su reactividad inmunológica específica.

Los anticuerpos marcados con fluoresceína pueden ser utilizados tanto en las secuencias de reacciones directas como en las indirectas, así como en las de inhibición del anticuerpo fluorescente y las de fijación del com-

plemento. La elección del método depende del objetivo de éste, así como de los reactivos disponibles.

En la investigación de anticuerpos específicos al *Treponema pallidum* en el suero del paciente, se utiliza el método indirecto, que consiste en la separación de los anticuerpos específicos de grupo del suero del paciente por absorción con lisado de treponemas de Reiter. Esta prueba, conocida como FTA-ABS, tiene lugar en dos fases:

- a) La suspensión de *Treponema pallidum* se fija a un porta. El suero del paciente, previamente absorbido y en dilución 1:5, se extiende sobre el antígeno y se deja en incubación, de tal manera que el anticuerpo específico pueda unirse al antígeno. Se retira el suero del porta mediante un lavado.
- b) Se extiende sobre el antígeno, el antisuero conjugado dirigido contra las inmunoglobulinas humanas. Si éstas se han unido al antígeno, no se eliminarán por lavado. El antisuero humano conjugado, se unirá al anticuerpo presente en el suero del paciente, causando la fluorescencia del antígeno.

Una dificultad en las técnicas de inmunofluorescencia es que pueden presentar fluorescencia inespecífica, es decir, fluorescencia que no es debida a la interacción antígeno-anticuerpo específica bajo estudio. Esto puede deberse a la fluorescencia natural de los componentes del tejido examinado o por la adherencia no inmunológica del conjugado a componentes celulares o del tejido. Por eso, toda prueba de anticuerpos fluorescentes debe incluir controles, tanto positivo y negativo, como positivo inespecífico (28).

3.3.1 Material para la prueba de FTA-ABS.

- a) Incubadora, ajustable a 35°- 37°C.
- b) Microscopio de fluorescencia con condensador de campo oscuro.
- c) Papel absorbente.
- d) Lápiz con punta de diamante (opcional).

- e) Plantilla, usada para grabar círculos de 1.0 cm de diámetro interior sobre laminillas de vidrio (opcional).
- f) Placa para colocar las laminillas.
- g) Cámara húmeda. Colocar un papel humedecido en la cubierta de la cámara para colocar las laminillas.
- h) Asa bacteriológica de platino, standard de 2 mm, calibre 26, o pipeta automática de 10 ul.
- i) Laminillas para microscopio de 1x3 pulgadas, aproximadamente de 1 mm de espesor.
- j) Cubreobjetos.
- k) Frasco Coplin con portaplacas removible.
- l) Pipetas de 0.2 ml 1/1000 y 1.0 ml 1/100.

3.3.2 Reactivos para la prueba de FTA-ABS.

A. Antígeno de *Treponema pallidum*.

- a) El antígeno para la prueba de FTA-ABS es una suspensión de *Treponema pallidum* (cepa Nichols), extraída de tejido testicular de conejo. El extracto debe contener un mínimo de 30 microorganismos por campo a seco débil. El antígeno puede conservarse de 6° a 10°C liofilizado.
- b) Conservar el antígeno liofilizado a 6°- 10°C y rehidratarlo para usarlo de acuerdo a las instrucciones adjuntas.
- c) Descartar la suspensión de antígeno si desarrolla contaminación bacteriana o si no muestra la reactividad apropiada con el suero control.

B. Medio de Absorción para FTA-ABS.

- a) El medio de absorción es un producto estandarizado, preparado de cultivos de treponemas de Reiter (cepa no patógena *T. phagedenis*). Este puede conservarse en estado líquido o liofilizado.
- b) Conservar el medio de absorción a 6°- 10°C y reconstituirlo si se encuentra liofilizado, de acuerdo a las instrucciones adjuntas.

C. Suero antiglobulina humana conjugada con fluoresceína (conjugado).

- a) Es una fracción gamaglobulina liofilizada de suero de cabras inmunizadas con gama globulina humana.
- b) El conjugado debe ser de calidad aprobada para la prueba de FTA-ABS. Cada nuevo lote de conjugado se debe probar para determinar su título y verificar que no da reacciones inespecíficas, así como su reactividad estandar.
- c) Conservar el conjugado liofilizado a 6°- 10°C. Reconstituir el conjugado de acuerdo a las instrucciones adjuntas con solución PBS-Tween que contiene: 98% PBS (6 mmol/l) pH 7.2 con 2% de Tween 80.
- d) El conjugado reconstituído se conserva en alícuotas no menores de 0.3 ml a -20°C o menos. Cuando se descongela para usarse, no se vuelve a congelar, pero puede conservarse a 6°- 10°C y puede usarse mientras muestre reactividad satisfactoria con pruebas controladas.
- e) Si se nota un cambio en la reactividad de la prueba de FTA-ABS en el trabajo de rutina de laboratorios, el conjugado debe retirarse para determinar si es el factor contribuyente.

D. Amortiguador salino de fosfatos (PBS), pH 7.2 ± 0.1

Fórmula por litro:

NaCl	7.65 g
Na ₂ HPO ₄	0.724 g
KH ₂ PO ₄	0.21 g

Debe determinarse el pH de cada lote de PBS preparado para la prueba de FTA - ABS. El PBS fuera del rango de pH de 7.2 ± 0.1 debe descartarse.

E. Tween 80

Para preparar PBS conteniendo 2% de Tween, calentar los dos reactivos a 56°C en un baño de agua. A 98 ml de PBS, añadir 2 ml de Tween 80, midiendo del fondo de la pipeta. La solución de Tween 80 al 2% debe tener un pH 7.0 - 7.2. Verificar el pH periódicamente, pues la solu--

ción se puede volver ácida. Esta solución se mantiene bien en refrigeración: descartarla si se desarrolla precipitado o si cambia el pH.

F. Suero control positivo FTA:

- a) Suero humano obtenido en sífilíticos.
- b) Conservarlo liofilizado a 6°- 10°C y reconstituirlo para usarlo de acuerdo a instrucciones adjuntas.

G. Suero control negativo FTA:

- a) Es suero humano de donadores sanos
- b) Conservarlo liofilizado a 6°- 10°C. Reconstituir para su uso de acuerdo a las instrucciones adjuntas.

H. Suero control positivo inespecifico FTA:

- a) Es un suero humano, que muestra reacción positiva inespecífica en la prueba FTA.
- b) Conservarlo liofilizado a 6°- 10°C. Reconstituir para su uso de acuerdo a las instrucciones adjuntas

I. Medio de inmersión

Consiste en una parte de PBS, pH 7.2, más nueve partes de glicerina (calidad reactivo).

J. Acetona (R.A.)

3.3.3 Como preparar las placas de antígeno de *Treponema pallidum*.

- a) Homogeneizar bien la suspensión de antígeno con una pipeta que contenga un bulbo de hule y absorbiendo y expeliendo la suspensión de la pipeta por lo menos diez veces para romper los acúmulos de treponemas y asegurar una distribución uniforme de treponemas. Determinar por examen de campo oscuro que los treponemas están adecuadamente distribuidos antes de hacer las placas para la prueba de FTA. Se puede reque--

rir una mezcla adicional.

- b) En placas perfectamente limpias y desengrasadas, cortar dos círculos de 1 cm de diámetro interior con un lápiz de punta de diamante. Limpiar las placas con gasa para remover las partículas de vidrio.
- c) Extender una asada de antígeno de *T. pallidum* en cada círculo, usando un asa de platino estandar de 2 mm. calibre 26, o extender aproximadamente 10 ml con pipeta automática. La experiencia con lotes individuales del antígeno pueden indicar qué cantidad de antígeno, mayor o menor, se deben extender en cada círculo. Dejar secar de 1 a 2 horas en un incubador de 37°C
- d) Fijar las extensiones en acetona por diez minutos y dejarlas secar enteramente al aire.
(No se deben fijar más de 60 laminillas con 200 ml. de acetona). La suspensión una vez reconstituída debe usarse el mismo día de su preparación; o almacenar las laminillas preparadas a - 20°C, tanto tiempo como el que los resultados de los controles aún den los resultados esperados. No se deben volver a guardar en congelación las placas que ya se han sacado.

3.3.4 Como preparar los sueros

La contaminación bacteriana o un exceso de hemólisis pueden ocasionar que los sueros no sean satisfactorios para la prueba.

Calentar los sueros por 30 minutos a 56°C antes de la prueba.

3.3.5 Como preparar los controles

- a) Los sueros controles ya reconstituídos se calientan a 56°C por 30 minutos.
- b) Con el objeto de obtener reacción fuerte (+++) media (+++) y débil (+), diluir el suero positivo con PBS como sigue: 1:5, 1:100 y 1:200 respectivamente.

El suero negativo no muestra reacción a una dilución 1:200.

El suero control positivo inespecífico muestra una reacción media (++) , cuando se diluye 1:5 con PBS. Si se diluye con medio de absorción FTA, el suero reaccionará negativamente.

- b) Si se van a ocupar únicamente pequeñas cantidades es recomendable almacenar el suero reconstituido, pero no diluido, en alicuotas a - 20°C. El medio de absorción se debe congelar si no se va a utilizar por completo.

3.3.6 Dilución de trabajo adecuada de antiglobulina humana conjugada con fluoresceína.

- a) Una vez reconstituido el contenido del frasco, como indica la etiqueta con PBS- tween, para la demostración de anticuerpos contra el treponema, se debe correr una prueba preliminar, con el objeto de determinar la dilución de trabajo adecuada. Generalmente se recomienda diluir la solución 1:4.
- b) El conjugado reconstituido, pero no diluido, puede almacenarse en alicuotas a - 20°C.

3.3.7 Procedimiento para la reacción.

- a) Identificar las laminillas previamente preparadas, numerándolas en los extremos.
- b) Una vez inactivados los sueros de los pacientes y de los controles a 56°C por 30 minutos, se preparan las diluciones de los sueros control para la prueba de FTA-ABS.

Dilución en amortiguador de fosfatos:

suero control positivo: 1:5, 1:100, 1:200

suero control negativo FTA: 1:200

suero control positivo inespecífico FTA: 1:5

Dilución en medio de absorción:

suero control positivo: 1:5

suero control inespecífico 1:5

suero del paciente: 1:5 (prueba de FTA-ABS).

- c) Aplicar aproximadamente 10 microlitros del suero diluido en cada uno de los campos de reacción de la laminilla con treponemas, previamente preparada.
- d) Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, o a 37°C en una cámara húmeda.
- e) Enjuagar las laminillas con PBS, introduciéndolas en un frasco Coplin lleno con PBS, por 10 minutos, cambiando el líquido de lavado después de 5 minutos.
- f) Colocar las laminillas en uno de sus extremos sobre un papel absorbente, con objeto de eliminar el amortiguador superficial, posteriormente se secan al aire cuidadosamente.
- g) Se cubren completamente las zonas de reacción de las laminillas con aproximadamente 10 microlitros de la dilución recién preparada de antiglobulina humana conjugada con fluoresceína.
- h) Colocar las laminillas en cámara húmeda e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente o a 37°C.
- i) Enjuagar las laminillas con amortiguador de fosfatos y colocarlos por 10 minutos en un frasco Coplin con PBS. Cambiar el líquido de lavado después de 5 minutos.
- j) Colocar las laminillas en uno de sus extremos, sobre un papel absorbente con el objeto de eliminar el amortiguador sobrante.
- k) Montar las preparaciones secadas al aire, colocándoles encima una pequeña gota de medio de montaje y evitando la formación de burbujas de aire, colocar encima un cubreobjeto por área de reacción.
- l) Evaluar las preparaciones con un microscopio de fluorescencia. Los controles deben mostrar los valores establecidos.
- m) Usando la laminilla control de mínimo reactivo (1+) como un estándar de lectura, registrar la intensidad de fluorescencia de los treponemas de acuerdo con la siguiente tabla:

<u>Lectura</u>	<u>Intensidad de fluorescencia</u>	<u>Interpretación</u>
2+ a 4+	Moderado a fuerte	Reactivo (R)
1+	Equivalente a control mínimo reactivo (1+)	Reactivo (R)
1+	Débil, pero definido, menos que control mínimo reactivo	Límite (B)
-	Negativo	No reactivo (N)

Repetir la prueba en aquellos sueros en los que la intensidad de la fluorescencia es 1+ o menos. Cuando un suero inicialmente da lectura de 1+ y al volver a probarlo da 1+ o mayor, la prueba se registra como reactiva. Todos los demás resultados al volver a hacer la prueba se registran como límite, si no dan una lectura mayor (border). No es necesario repetir la prueba a los sueros que no presentan fluorescencia (26).

3.4 Prueba de MHA-TP.

Esta prueba se basa en la aglutinación, por anticuerpos al *Treponema pallidum*, de eritrocitos de carnero sensibilizados. Antes de efectuar la prueba, el suero se mezcla con un diluyente absorbente para remover la mayoría de los reactantes no específicos; el diluyente consiste de una solución salina con amortiguador de fosfatos que contiene componentes solubles de membranas celulares de glóbulos rojos de carnero, extracto testicular normal de conejo, componentes celulares de *treponemas de Reiter* y suero normal de conejo. El suero ya absorbido que contiene el anticuerpo específico, reaccionará con las células de carnero sensibilizadas y cubiertas con antígeno de *Treponema pallidum* (cepa Nichols), para formar una capa uniforme de eritrocitos aglutinados que cubrirá el fondo de la policubeta de microtitulación. En las reacciones negativas, las células no aglutinadas se deslizan hacia el centro del fondo curvado formando un anillo bien definido en el centro.

La superficie antigénica de los glóbulos rojos, es muy elaborada, y aunque esto puede facilitar la unión del antígeno, ocasiona una complicación en la prueba debido a la frecuente presencia de anticuerpos heterófilos naturales al eritrocito en el suero de muchos animales. La presencia de estos anticuerpos se comprueba por medio de eritrocitos tratados con ácido tánico (tanados), pero no recubiertos, colocándolos como control con cada uno de los sueros que se van a probar. La aglutinación en alguno de estos controles, se deberá a la presencia de anticuerpos heterófilos y no a anticuerpos al *Treponema pallidum*.

La sensibilidad de la prueba se debe al previo tanado de las células rojas, debido a que altera la superficie celular para revelar nuevos receptores proteicos, de tal manera que la cantidad de antígeno proteico que se une a los eritrocitos aumenta después que han sido tratados con ácido tánico, además incrementa la inestabilidad de las células rojas que normalmente no aglutinan y de ese modo se provoca la reacción de aglutinación. Es necesario balancear esta tendencia de aglutinar, adicionando un estabilizador. Las células recubiertas están así en un estado muy sensible, listas para aglutinar en presencia de una cantidad muy pequeña de anticuerpo (30).

3.4.1 Material para la prueba de de MHA-TP.

- a) Microdilutores (0.025 ml o 25 ul).
- b) Pipeta gotero calibrada para entregar 0.025 ml o 25 ul
- c) Probador de volumen (papel secante).
- d) Policubetas desechables de plástico transparente de fondo redondo.
- e) Lector de espejo de policubetas.
- f) Pipetas: automáticas de 20, 25 y 50 ul, o pipetas serológicas de 0.1 ml graduadas en 1/1000 ml.
serológicas de 1.0 ml graduadas en 1/100 ml.
- g) Tubos de ensaye y gradilla.

3.4.2 Reactivos para la prueba de MHA-TP.

A. Diluyente absorbente.

- a) Este reactivo consiste de una solución salina con amortiguador de fosfatos (pH 7.2) que contiene componentes solubles de membranas celulares de glóbulos rojos de carnero (0.50 % v/v), componentes solubles de membranas celulares de glóbulos rojos bovinos 0.25% v/v), extracto testicular normal de conejo (0.1%), componentes celulares de treponemas de Reiter (0.125% v/v), suero normal de conejo (1.0% v/v) y estabilizadores.
- b) Este reactivo, lo presentan las casas comerciales listo para ser usado y no requiere reconstitución. Se usa para absorber y diluir el suero, y para preparar las diluciones de trabajo de las suspensiones celulares sensibilizadas e insensibilizadas.
- c) Debe conservarse en refrigeración a 2° - 8°C.

B. Células sensibilizadas

- a) Son eritrocitos de carnero liofilizados, formalinizados, tana dos, sensibilizados con antígeno de Treponema pallidum (cepa Nichols).
- b) Conservar las células sensibilizadas liofilizadas a 2° - 8°C y reconstituirlas como indica la etiqueta. Este antígeno, ya reconstituido es una suspensión al 2.5%. Una vez reconstituido, debe refrigerarse y usarse antes de 5 días. Las soluciones de trabajo deben refrigerarse y usarse el mismo día.
- c) Las células están sensibilizadas con antígeno y reaccionarán con el suero que contenga los anticuerpos específicos al Treponema pallidum.

C. Células insensibilizadas.

- a) Son eritrocitos de carnero liofilizados, formalinizados, tana dos. Estas células no se sensibilizan con el antígeno de Treponema pallidum.

- b) Conservar las células insensibilizadas liofilizadas a 2°- 8°C y reconstituirlas como indica la etiqueta. Una vez reconstituídas, deben refrigerarse y usarse antes de cinco días. Las soluciones de trabajo deben refrigerarse y usarse el mismo día.
- c) La suspensión de células insensibilizadas se usa para comprobar aglutinación inespecífica.

D. Control positivo.

- a) Es suero de conejo que contiene anticuerpos al *Treponema pallidum*.
- b) Se conserva liofilizado a 2°- 8°C y se reconstituye como indica la etiqueta en la que también se encuentra el título de positividad. Los resultados pueden variar en \pm una dilución. Una vez reconstituido debe conservarse en refrigeración y usarse antes de cinco días.

E. Control negativo.

- a) Es suero humano normal.
- b) Conservarlo liofilizado a 2°- 8°C. Reconstituir como se indica en la etiqueta. Una vez reconstituido debe refrigerarse y usarse antes de cinco días.

F. Preparación de las soluciones de trabajo.

Para preparar las soluciones de trabajo de células sensibilizadas e insensibilizadas, se añade una parte de la suspensión reconstituida a 5.5 partes de diluyente absorbente (dilución 1:6.5). Solamente debe prepararse una cantidad de soluciones de trabajo suficientes para un día.

G. Agua destilada estéril.

H. Solución salina al 0.85%.

3.4.3 Preparación del equipo microdiluyente.

A. Preparación de los microdilutores .

a₁) Limpiar los microdilutores por rotación, en agua destilada.

a₂) Quemar los microdilutores: hasta la incandescencia en un quemador bunsen; enfriar en agua destilada y secar para expeler el líquido.

B. Probador del volumen de la gota. (La prueba del volumen de la gota y el prehumedecimiento se realizan en la misma operación)

b₁) Llenar cada microdilutor tocando la superficie de la solución salina al 0.85%. No debe mojarse la campana superior del asa.

b₂) Tocar con el microdilutor la marca central de uno de los círculos del probador y observar el área que se humedeció dentro del círculo.

b₃) Un microdilutor preparado apropiadamente, entregará todo el líquido contenido, el cual será suficiente para humedecer inmediatamente toda el área interior. del círculo.

C. La pipeta gotero-calibrada debe estar limpia. Para asegurar la entrega apropiada del líquido, secar suavemente, después de llenarla, el exceso de solución que puede haber en el exterior de la pipeta, con una toalla de papel. Manténgase la pipeta en posición vertical en el momento de añadir el líquido a la policubeta.

3.4.4 Preparación de los sueros.

a) Alistar y marcar un tubo de ensayo para cada suero que vaya a ser analizado y para cada uno de los dos controles.

b) Agregar 0.38 ml de diluyente absorbente a cada tubo.

c) Agregar 0.02 ml (20 ul) de suero sin inactivar (o controles) a sus tubos respectivos para obtener una dilución 1:20 con el diluyente absorbente.

d) Usando las pipetas de 20 ul, mezclar cada suero diluido ocho ve-

ces e incubar a temperatrua ambiente por 30 minutos. La muestra absorbida y el suero control (dilución 1:20) estarán listos para ser analizados. El remanente del suero absorbido puede refrigerarse a 2°- 8°C y puede ser reanalizado el mismo día. El suero absorbido debe estar a la temperatura ambiente en el momento de ser analizado.

3.4.5 Procedimiento para la reacción.

Cada suero requerirá el uso de dos cavidades de la policubeta.

- a) Comenzando por el extremo superior izquierdo, colocar el número de identificación del suero entre dos cavidades adyacentes, por cada suero que va a ser analizado. La muestra no. 1 en las filas A y B; muestra no.2 en la cavidad 2: filas A y B, etc. (ver fig.1). Anotar los números del control y del suero en la hoja de trabajo de manera que corresponda al número de la policubeta y cavidad respectivamente.
- b) Colocar 0.025 ml de cada suero absorbido (dilución 1:20) en las dos cavidades adyacentes, identificadas para cada suero en el paso I.

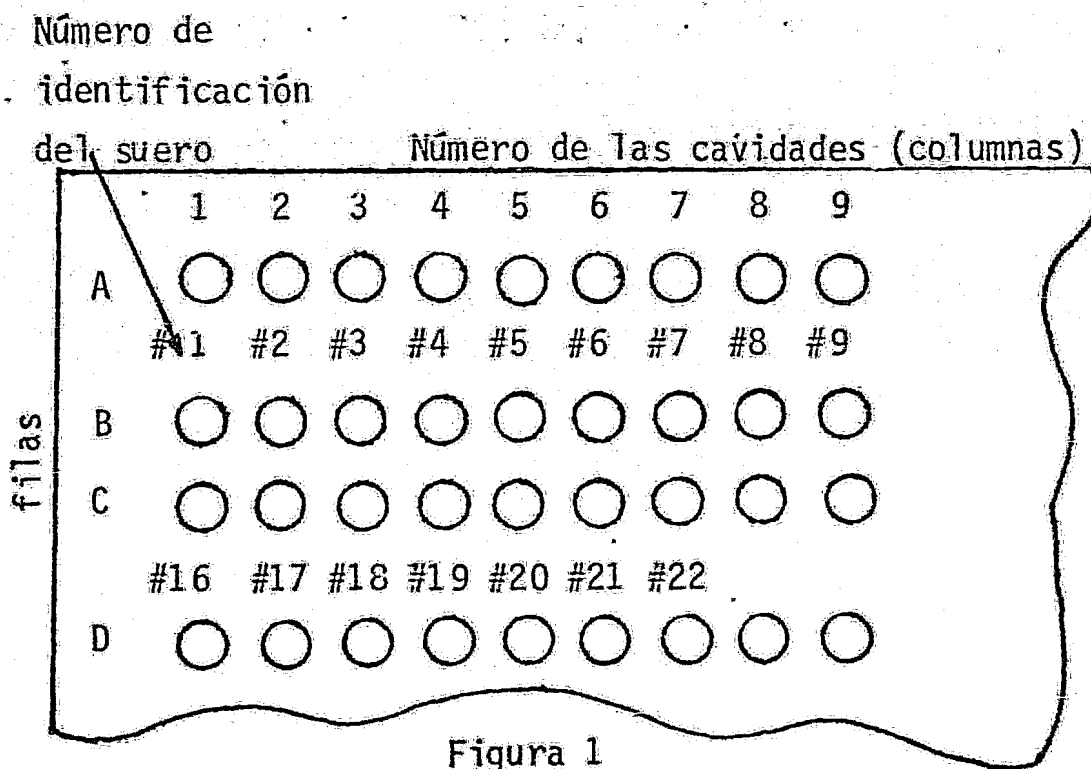


Figura 1

- c) Utilizando una pipeta gotero calibrada para entregar , por gota, 0.025 ml, agregar 0.075 ml (3 gotas) de la solución de trabajo de las células sensibilizadas en cada cavidad de la fila superior por cada par de sueros (filas A, C, E, etc.). Estas filas serán para los sueros.
- d) Agregar 0.075 ml (gotas) de la solución de trabajo de células insensibilizadas a cada cavidad de la fila inferior para cada par de sueros (filas B, D, etc.). Las cavidades de estas filas se utilizarán para detectar aglutinación inespecífica.
En los pasos 3 y 4 se obtiene una dilución final del suero de 1:80.
- e) Los controles, positivo y negativo, deben procesarse junto con cada serie de muestras. Junto con los controles se deben verificar las soluciones celulares. Como se demuestra en la figura 2, se deben reservar espacios para los controles y las soluciones celulares. Otra manera adicional de realizar el control de calidad es la de analizar sueros conocidos, como positivos y negativos, obtenidos de muestras de laboratorio, o sueros de referencia.
- f) Agitar suavemente las policubetas, apilar y tapar con una policubeta vacía.
- g) Incubar las policubetas a temperatura ambiente, ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) sin moverlas, por lo menos durante cuatro horas. Si la prueba se realiza durante la tarde, el período de incubación puede extenderse por toda la noche sin que produzcan cambios perceptibles.

3.4.6 Controles positivo y negativo.

- a) Marcar una fila de la policubeta como suero positivo (figura 2). Colocar 0.050 ml del suero control positivo, absorbido, en la cavidad no. 1
- b) Colocar 0.025 ml del diluyente absorbente en la cavidad 2 hasta la 8 de esa fila. Para la dilución se usan 8 cubetas. Esta permitirá suficientes diluciones dobles hasta exceder el punto final de titulación para el suero control positivo.

- c) Preparar diluciones seriadas del suero control positivo utilizando los microdilutores . Colocar un microdilutor de 0.025 ml en la cavidad no.1 que contiene 0.050 ml del suero control. Rotar cuatro segundos hasta llenar el microdilutor, retirar y colocar en la siguiente cavidad de la misma fila y rotar nuevamente. Repetir el proceso de dilución, transfiriendo 0.025 ml de una cavidad a la próxima hasta llegar a la octava cavidad. Descartar el exceso de ésta (8a.) comprobando su volumen el probador.
- d) Colocar 0.025 ml del suero control negativo en la cavidad no. 9.
- e) Agregar 0.075 ml de células sensibilizadas a la cavidad 1 hasta la 9, utilizando una pipeta gotero.

3.4.7 Control de reactivos.

Continuando con las filas reservadas para control de calidad, marcar 4 cavidades, como se indica en la fig.2

- a) Agregar 0.075 ml de la solución de trabajo de células sensibilizadas y 0.025 ml del diluyente absorbente a la cavidad no. 10.
- b) Agregar 0.075 ml de la solución de trabajo de células insensibilizadas y 0.025 ml del diluyente absorbente a la cavidad no. 11.
- c) Agregar 0.025 ml del suero control positivo y 0.075 ml de células insensibilizadas a la cavidad no. 12.
- d) Agregar 0.025 ml del suero control negativo y 0.075 ml de células insensibilizadas a la cavidad no. 13.
- e) Agitar la policubeta suavemente. Incubar junto con las muestras.

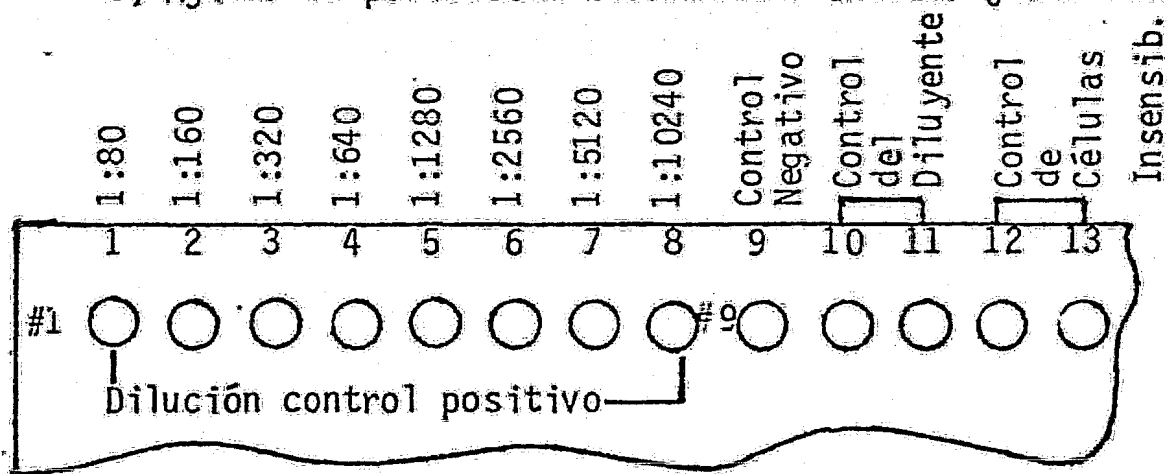


Figura 2

El suero control positivo no debe variar más de + una dilución con respecto al título final indicado en la etiqueta del suero. El control negativo debe ser negativo, tanto para las células insensibilizadas como para las sensibilizadas. Los controles para el diluyente absorbente deben ser negativos.

3.4.8 Resultados.

Los resultados cualitativos del método y los del control de la titulación, se obtienen leyendo los patrones de sedimentación de los glóbulos rojos, utilizando el lector de espejo. Las lecturas van desde - a 4+, utilizando el criterio siguiente:

<u>Grado de hemaglutinación</u>	<u>Lectura</u>	<u>Interpretación</u>
Redondel de células, suave que cubre todo el fondo de la cubeta; algunas veces doblez en el fondo del redondel	4+	Positivo
Redondel suave de células que cubre un área menor de la cubeta	3 +	Positivo
Redondel suave de células rodeadas de un círculo rojo	2 +	Positivo
Redondel suave de células rodeadas de un círculo rojo más pequeño	1 +	Positivo
Botón de células que tiene una pequeña perforación en el centro.....	<u>+</u>	Negativo
Botón compacto, muy definido, en el centro de la cubeta que puede tener una pequeña perforación central	-	Negativo

Se informa como resultado positivo cuando un suero muestra una hemaglutinación de 1+ o mayor, con células sensibilizadas, y es negativo con las células insensibilizadas.

Se informa como resultado negativo cuando un suero no muestra hemaglutinación (- o +) con células sensibilizadas e insensibilizadas.

Si hay positividad con las células sensibilizadas e insensibilizadas, el suero debe analizarse nuevamente en diluciones con células sensibilizadas e insensibilizadas:

- 1 - Anotar como positivo sin tener en cuenta el título, si:
 - a) La hemaglutinación con células sensibilizadas es mayor por lo menos dos diluciones que con células insensibilizadas, y
 - b) La primera dilución que no muestre hemaglutinación con células insensibilizadas tiene una reacción de 3+ o 4+ con células sensibilizadas.

2. Anotar como "hemaglutinación inespecífica, no concluyente del suero control", si:
 - a) La hemaglutinación con células sensibilizadas es solamente mayor en una dilución que la de células insensibilizadas, o
 - b) La hemaglutinación con células sensibilizadas está en la misma dilución que con las células insensibilizadas (29).

CAPITULO IV

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos de acuerdo a las siguientes claves:

P. Positivo

N. Negativo

Tabla No. 1
Resultados de los 121 sueros seleccionados

No. de sueros	64	3	13	1	21	1	2	6	8	2	Total 121
FTA-ABS	P	N	N	P	P	P	P	P	N	N	
MHA-TP	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P	
VDRL	P	P	P	P	P	P	N	N	P	N	
RPR					P	N	N	P	N	N	

CAPITULO V

ANALISIS DE LOS RESULTADOS

De 4,660 sueros analizados, se seleccionaron 121 que resultaron positivos al VDRL hasta la dilución 1:2, de los cuales, 40 se analizaron también por RPR en tarjeta.

Los 121 sueros se analizaron después por MHA-TP y finalmente por FTA-ABS, que es la prueba de referencia de que se dispone, por ser la más sensible y específica. Los resultados se resumen en la tabla no.2

Tabla no. 2

Resultados de los sueros seleccionados de las dos poblaciones estudiadas.

	Positivos a MHA-TP	Negativos a MHA-TP	Positivos a VDRL	Negativos a VDRL
Positivos a FTA-ABS	91	2	87	6
Negativos a FTA-ABS	5	23	24	4

En la tabla no. 3, se presentan unicamente los resultados de los 40 sueros analizados en la clínica 31 del IMSS.

VDRL y negativos al FTA-ABS.

c) Grado de especificidad: 79%.

Para el RPR en tarjeta:

a) Concordancia con el FTA-ABS. De 40 sueros, 28, o sea, el 70% de los resultados coincidieron en ambas pruebas.

b) Índice de falsos positivos: 12 sueros, el 30% fueron positivos al RPR en tarjeta y negativos al FTA-ABS.

c) Grado de especificidad: 70%.

tabla no. 4
Resumen de los resultados obtenidos para
cada método.

Método	Concordancia con el FTA-ABS (%)	Índice de falsas positivas: (%)	Grado de especificidad (%)
MHA-TP	94.2	4.1	95.8
VDRL	75.2	19.8	79
RPR	70	30	70

CAPITULO VI

DISCUSION

De los 121 sueros seleccionados, el 94.2% de sus resultados coincidieron en los métodos de MHA-TP y FTA-ABS. Otros autores han informado que las coincidencias de sus resultados entre estos dos métodos varían del 94. al 99% y que la sensibilidad de ambos es muy parecida, (sin embargo, ésta depende del estadio en que se encuentre la sífilis, puesto que en el primer estadio se ha observado menor sensibilidad para el MHA-TP) (25), por lo que puede utilizarse con ventaja el MHA-TP en lugar del FTA-ABS, considerando que la técnica del MHA-TP es muy sencilla, no requiere de material costoso ni de aditamentos especiales, a diferencia del FTA-ABS, cuya técnica es complicada, costosa, requiere de equipo especial de inmunofluorescencia y de personal especializado. Por estas razones, el FTA-ABS se practica en pocos laboratorios, mientras que el MHA-TP puede practicarse en cualquier laboratorio de rutina, sin dejar de considerar al FTA-ABS como la prueba de referencia.

En la literatura revisada de cinco años a la fecha no encontramos trabajos de investigación realizados en México con el empleo del MHA-TP.

Los resultados del VDRL coincidieron con los del FTA-ABS en un 75.2%, con 19.8% de falsos positivos. Por esto, su utilidad sigue considerándose básica como prueba de selección de grandes poblaciones si también se considera su bajo costo y sencillez. SIN EMBARGO, SI EN EL TRABAJO DIARIO SE OMITEN UNO O VARIOS PASOS DE ESTA TECNICA, EL NUMERO DE RESULTADOS FALSOS POSITIVOS AUMENTA. Para que esta prueba sea confiable, es necesario apegarse estrictamente a la técnica, pues de otra manera, a los falsos positivos biológicos se suman aquellos debidos al mal manejo técnico y se pierde el control de la metodología seguida.

Puede agregarse, además, el hecho de que la calidad del antígeno varía

de una marca comercial a otra, e incluso de lote a lote. Es necesario el uso de controles positivos, cuantitativos y negativos, así como contar con un laboratorio de referencia donde se comparen periódicamente los resultados.

El RPR en tarjeta es todavía más sencillo que el VDRL porque elimina la incubación de los sueros y la observación microscópica. Sin embargo, es mucho más costoso. Sus resultados coincidieron con el FTA-ABS en el 70%, con un 30% de falsos positivos, por lo que mostró menos especificidad que el VDRL. Un dato muy importante que se obtuvo en esta comparación es el lue de 10 resultados positivos a RPR y negativos a VDRL, 6 (15%) resultaron positivos también a FTA-ABS, lo que sugiere una mayor sensibilidad del RPR. En el presente estudio se observó que un resultado positivo a VDRL de 1:1 a 1:4, por RPR dió siempre positivo a la siguiente dilución.

Algunos investigadores sugieren que el MHA-TP se use como prueba de tamiz y como prueba de confirmación el FTA-ABS. Esto sería lo ideal, sin embargo, el costo resulta muy elevado. Se justifica en los bancos de sangre, donde actualmente se usa el VDRL, cuya sensibilidad decrece notablemente en los casos latentes, lo que hace posible que un donador en ésta etapa no se detecte; por eso es imprescindible el uso de un método más específico y sensible, como el MHA-TP (33).

Algunos estudios indican que la prueba de MHA-TP es menos sensible que el FTA-ABS en la etapa primaria de la sífilis. En este estudio no se evaluó la sensibilidad de los métodos empleados. Es necesario que se estudie más el MHA-TP en la población de México con pacientes sifilíticos en diferentes etapas de la enfermedad para comparar en cada una de ellas la sensibilidad del método con el FTA-ABS y con las pruebas no específicas.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

1. En sífilis latente, donde el diagnóstico descansa en la evidencia serológica solamente, es de gran importancia la confiabilidad del método empleado.
2. Los resultados que se obtienen con el MHA-TP son casi iguales a los del FTA-ABS, con la ventaja de que el primero puede realizarse en cualquier laboratorio de rutina y es más económico que el segundo. Las pruebas no específicas positivas, podrían confirmarse en el mismo laboratorio por el MHA-TP, sin dejar de considerar al FTA-ABS como prueba de referencia.
3. Es necesario un buen control de calidad en la prueba de VDRL, un apego estricto a la técnica y una supervisión adecuada en los laboratorios que la realizan, para evitar los resultados falsos positivos debidos al manejo técnico.
4. El RPR en tarjeta es un método más sencillo que el VDRL, pero mucho más costoso, con mayor sensibilidad y menor especificidad.
5. La mayoría de los autores consultados están de acuerdo en que el diagnóstico de sífilis no debe apoyarse en una prueba serológica. Teóricamente deben usarse tres: el MHA-TP, como prueba de selección en grandes poblaciones, el FTA-ABS, como prueba confirmatoria y el VDRL, como control de tratamiento (34). En la práctica, debido al elevado costo que esto implica, puede usarse el VDRL como prueba de tamiz, el MHA-TP como prueba confirmatoria y el FTA-ABS únicamente en casos problema y como prueba de referencia. Durante la incubación del *Treponema pallidum*, las pruebas serológicas son de poca utilidad, en cambio, la observación en campo oscuro constituye el único diag-

nóstico definitivo en caso de positividad. En lesiones de sífilis temprana deberá realizarse siempre la observación en campo oscuro.

6. En México no se encontraron cifras de sensibilidad y especificidad del método de MHA-TP. En el presente trabajo no fue posible evaluar su sensibilidad; para hacerlo, deberían haberse analizado los 4,660 sueros por FTA-ABS y MHA-TP. Sería interesante estudiarlo más ampliamente en pacientes sífilíticos y comparar su sensibilidad con la del FTA-ABS y las de las pruebas no específicas en los diferentes estadios de la sífilis.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

1. González, G.A.: Trabajo presentado en la XXXIV Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Salud Pública. México, D.F., 1980.
2. Campos, S.A.: Interpretación de las reacciones serológicas en la sífilis. Boletín Médico del IMSS. 14(7): 211-229, 1972.
3. Gibowski, M., Neumann, E.: Non-specific positive test results to syphilis in dermatological diseases. Brit. J. of Ven. Dis. 56(1): 17-19, 1980.
4. Ovchinnikov, N.M.: Important problems of serodiagnosis of syphilis. Vestn. Dermatol. Venerol. 8: 22-26, 1981.
5. Kampeneier, R.H.: Syphilis and marriage. Sexually Transmitted Dis. 8 (1):29-32, 1981.
6. Garner, M.F., Backhouse, J.L., Daskalopoulos, G.: Treponema pallidum hemagglutination test for syphilis. Comparison with the TPI and FTA-ABS tests. British J. Vener. Dis. 48: 470-473, 1972.
7. Dixon, J.M., Grocholski, J.J.: Experience with the microhemagglutination test for Treponema pallidum antibodies. Canadian Journal of Public Health. 63: 257-260, May-Jun, 1972.
8. Ravel, R.: Hemagglutinations test for syphilis (MHA) as alternative to the FTA-ABS. Laboratory Medicine. 7(5): 22-24, 1976.
9. Barbara, J.A.J., Rajas Salker, Fátima Lajli.: An economical, simplified hemagglutination test for mass. Journal of Clin. Pathol. 33(12):1216-1217, 1980.
10. Brathwaite, A.R.: The microhemagglutination Treponema pallidum tests in syphilitic problem sera. West Indian Med. Journal. 27(4): 205-210, 1978.
11. Young, H., Henrichsen, C.: Treponema pallidum Hemagglutination test a screening procedure for the diagnostic of syphilis. Brit. J. Vener. Dis. 50: 311-346, 1974.

12. Tight, R.R., Leland, D., French, M.L.V.: Incidence of positive tests for treponemal infection in healthy rabbits. *Sex. Transmitted Dis.* 8(1): 8-11, 1981.
13. Melinn, M.T., McLaughlin, H., Harman, J.W.: The *Treponema pallidum* hemagglutination test as a screening procedure in the diagnosis of syphilis. *Ir. J. Med. Sci.* 146(12): 418-420, 1977.
14. Luger, A., Schmidt, B., Spendlingwimmer, I., Horn, F.: Recent observations on the serology of syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* 56(1): 12-16, 1980.
15. Petukhova, R.N., Diyachenko, L.A.: Indirect hemagglutination test with treponema antigen for serodiagnosis of syphilis. *Vestn. Dermatol. Vener.* 12: 52-54, 1979.
16. Tight, R.R., White, A.C.: Quantitative microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies in experimental syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* 56: 291-296, 1980.
17. Todd-Sanford y cols.: *Diagnóstico clínico por el laboratorio*, 6a. Ed., Salvat Editores. Barcelona, España. 1259-1263, 1978.
18. Berntsson, E., Larsson, P.: The Wasserman, Kline and VDRL reactions in routine syphilis serodiagnosis. *Acta. Derm. Vener.* 60 (1): 71-72, 1980.
19. Gollerkiri, P., Gokhda, B.B., Radane, S.N.: Some observations on the behavior of the Wasserman and Khan tests in leprosy and tuberculosis. *Indian J. Med. Sci.* 6: 357-358, 1952.
20. Garner, M.F., Backhouse, J.L.: Reacciones crónicas biológicas falsas positivas a las pruebas serológicas de la sífilis en donantes de sangre. *Journal of Chemical Path.* 23(6), 1970.
21. Moore, J.E., Mohr, C.F.: Biologically false-positive serologic test for syphilis: type, incidence and cause. *JAMA.* 150: 467-473, 1952.
22. Davis, B.D., Dulbecco, R., y cols.: *Tratado de Microbiología* 2a. Ed., Salvat Editores. Barcelona, España. 904-912, 1978.
23. Meigel, W., Tupath-Barsiske, R., Shiers, Z.G.: FTA-ABS, especificidad y sensibilidad en comparación con la prueba de TPI. *Das Arztliche Laboratorium.* 16(4) Abril, 1970.
24. Rathlev, T.: Hemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pa-*

- ... lldum for serodiagnosis of syphilis. Brit. J. Vener. Dis. 43:181, 1967.
25. Tomizawa, T., Kasamatsu, S.: Hemagglutination test for serodiagnosis of syphilis. A preliminary report. Jap. J. Med. Sci. Biol. 19: 305, 1966.
 26. Organización Panamericana de la Salud. Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis. (revisión de 1969). Publicación científica No. 988. Washington, D.C. (Traducción de la Publicación No. 411 del Servicio de Salud Pública de los E.U.A.), 1975.
 27. Técnicas de Anticuerpos Fluorescentes en el diagnóstico de enfermedades transmisibles. Publicación de la Dirección de Servicios de Salud Pública en Estados y Territorios, S.S.A. México, 1964.
 28. Weir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology. 3a. Ed. Black Well Scientific Publication. Oxford, London. Vol.1 Cap. 15, 1978.
 29. U.S. Department of Health.: Education and Welfare. Microhemagglutination assay for treponemal antibodies (MHA-TP). provisional technique, N.C.D.C. Atlanta, Georgia, 1973.
 30. Weir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology, 3a. Ed. Black Well Scientific Publications. Oxford, London. Vol. 1 Cap. 20, 1978.
 31. Lefevre, J.C., Prere, M.F., Lareng, M.B.: Limitations of passive Treponema hemagglutination test (TPHA) in the detection of early syphilis. Nouv Presse. Med. 10(21): 1703-1705, 1981.
 32. Dyckman, J.D., Storms, S., Huber, T.W.: Reactivity of microhemagglutination, fluorescent treponemal antibody absorption and VDRL tests in primary syphilis. J. Clin. Microbiol. 12(4):629-630, 1980.
 33. Garretta, M., Paris-Hamelin, A., Muller, A., Vaisman, A.: Syphilis and blood transfusion. Rev Fr. Transfus. Immunohematol. 20(2): 28-308, 1977.
 34. Yehudi, M., Feldman, M.D., James, A.: Syphilis serology today. Arch. Dermatol. 116(1): 84-89, Enero 1980.