

11237
2ej
179



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

*Hospital Infantil de México
"DR. FEDERICO GOMEZ"*

**PRUEBA DE COAGLUTINACION EN
ORINA PARA EL DIAGNOSTICO
DE FIEBRE TIFOIDEA.**

T E S I S

*Que para obtener el Título de
MEDICO PEDIATRA*

p r e s e n t a

Dr. Gonzalo Mauricio Valdez Pérez



**TESIS CON
VALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1985



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

11237
Ej
179



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

*Hospital Infantil de México
"DR. FEDERICO GOMEZ"*

**PRUEBA DE COAGULACION EN
ORINA PARA EL DIAGNOSTICO
DE FIEBRE TIFOIDEA.**

T E S I S

*Que para obtener el Título de
MEDICO PEDIATRA*

presenta

Dr. Gonzalo Mauricio Valdez Pérez



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1985

I N D I C E.

	páginas
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	4
MATERIAL Y METODOS	5
RESULTADOS	11
COMENTARIOS	20
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFIA	24

I.- INTRODUCCION.

La fiebre tifoidea es considerada como un problema de salud pública. En nuestro país, en 1978, obtuvo una tasa de mortalidad de 2.3 y de morbilidad de 4.1 por 100 000 habitantes.

La infección por S. typhi en el hombre, da origen, a través de sus antígenos somáticos 9, 12 y de su fracción flagelar "d", a la formación de anticuerpos; la detección y cuantificación de los dirigidos contra el antígeno somático "O" sirven para establecer un diagnóstico de probabilidad e iniciar una terapia antimicrobiana antes de la confirmación bacteriológica. (1)

Dentro de las pruebas serológicas se encuentran las de aglutinación como la de Widal; las de hemaglutinación, la prueba de fijación de superficie de Ruiz Castañeda y la de Talmage y Preter. (2) (3), (4).

Otros estudios existentes tales como la contraelectroforesis y la prueba inmunoenzimática ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) y el radioinmunoensayo también han sido utilizados para el diagnóstico de fiebre tifoidea. (5), (6), (7), (8). Sin embargo, muchos de estos procedimientos resultan costosos e inasequibles para muchos hospitales.

Debido a que la producción de anticuerpos ante la agresión bacteriana no es inmediata, y de que su producción a niveles cuantificables se inicia al quinto día (9), una proporción importante de las técnicas tanto de la Microbiología como de la Inmunología contemporáneas se basan en la detección de antígenos en los primeros días de la evolución de la enfermedad. De aquí, ha surgido la utilidad de la coaglutinación en placa para detección de antígenos de S. Typhi en orina y heces (10), (11). Esta prueba, basada en la unión por medio de un receptor del fragmento Fc de las IgG

de la mayoría de los mamíferos, a la proteína A del Staphylococcus aureus sobre todo la cepa Cowan I, donde la bacteria actúa como soporte para anticuerpos sensibilizados contra el antígeno en cuestión. (Figura 1).

La coaglutinación se lleva a cabo normalmente en una placa o en portaobjetos, de donde recibe la denominación de coaglutinación en placa. Al reconocer los anticuerpos al antígeno, se agregan los organismos produciendo una reacción visible. Tiene una alta sensibilidad capaz de descubrir antígenos a concentración de 10 ng/ml o $10^7 - 10^8$ bacterias por ml de cultivo.

La proteína A del S. aureus ha sido descrita y valorada su importancia desde los trabajos de Jensen en 1959, estudiada en forma más amplia desde 1966 por Forsgren y Sjoquist, entre otros. Estos últimos han mostrado su unión covalente a la estructura de la peptidoglicana de la pared celular, al obtenerla por medio de la digestión lisosomal con lisostafilina, una enzima bacteriológica (12).

La reacción entre la proteína A y el fragmento Fc de las gammaglobulinas (es decir, del sitio no activo de la gamaglobulina) ha sido estudiada por numerosos autores, entre ellos Kronvall. Se refiere que la proteína A no se une al fragmento Fab por ausencia de receptores para el mismo. (12)

Casi todos los miembros de la clase mamíferos reaccionan con la proteína A, por lo que esta proteína ha sido una arma útil en el estudio de la evolución de la gamaglobulina (13). Forsgren, desde 1967, demuestra la reacción con la globulina del conejo por medio de mecanismos de inhibición, ya que los fragmentos Fc y las cadenas H preparadas de gamaglobulina de conejo normal, fueron capaces de inhibir la precipitación entre protef

-na A y la globulina gama humana, la globulina normal de conejo o la antiproteína A de conejo. Las cadenas ligeras y el fragmento Fab no mostraron reactividad (14). El sitio de unión es localizado en el CH₂-CH₃, sin embargo, la reactividad con las inmunoglobulinas depende en un número de factores incluyendo las especies, las subclases, el pH. Sus aplicaciones dependen en su alta afinidad y la rápida unión a las inmunoglobulinas. Su K_D (constante de disociación) para humanos y conejos es aproximadamente de 10⁻⁸ M, semejante a una reacción antígeno-anticuerpo, típica, lo que permite lavados de rutina sin problemas importantes en la disociación (15).

Estudios posteriores han mostrado que también las IgM y las IgA se unen en forma importante a la proteína A (16). Para que se lleve a cabo la reacción antígeno-anticuerpo en la forma más adecuada, se necesita una óptima interacción antígeno-anticuerpo (17).

Esta interacción proteína A-Fc de las IgG ha sido utilizada con diferentes propósitos: para neutralizar complejos infectantes virus-IgG, para bloquear y facilitar la fijación del complemento "in vitro", como mitógeno para estimular subpoblaciones de linfocitos, como soporte para los anticuerpos en el radioinmuno ensayo, para separar subpoblaciones de células, en pruebas de inmunofluorescencia, inmunoferritina y enzaimunocensayo . (30).

Figura 1.- Esquema representando el sitio de unión de los anticuerpos con la proteína A.

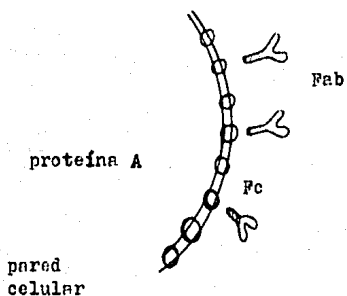
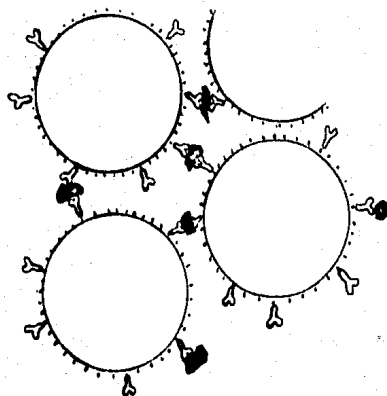


Figura 2.- Esquema que muestra la coaglutinación al reconocer los anticuerpos al antígeno específico.



O B J E T I V O S . -

Tomando en cuenta las consideraciones expuestas en la introducción, resulta conveniente lograr una prueba de laboratorio con alta especificidad, buena sensibilidad y bajo costo para diagnosticar fiebre tifoidea. Es el objetivo de esta tesis valorar estos puntos con la prueba de conglutinación en orina en pacientes con sospecha de fiebre tifoidea y tratar de determinar la utilidad real de la misma.

En caso de que los resultados sean satisfactorios las perspectivas de esta prueba son amplias; podría ser llevada a unidades médicas de primer nivel, sin dificultades para su realización y así poder establecer un diagnóstico más temprano de esta enfermedad cuyas complicaciones pueden ser mortales.

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

a.- Definiciones operacionales.-

Para fines de este estudio se determinaron dos grupos de pacientes en cuanto al diagnóstico de Fiebre tifoidea y, uno más, que correspondió a pacientes cuyo padecimiento fue distinto. Se mencionan las características de éstos:

I.- Paciente con diagnóstico altamente probable de fiebre tifoidea.- Será aquel paciente en quien no se aisle S. typhi en los cultivos que le sean solicitados pero que presente 2 o más parámetros siguientes: Prueba de fijación de superficie positiva, Reacción de Widal positiva (1:160 o mayor), Biometría hemática con leucopenia y, de preferencia, con ausencia de eosinófilos.

II.- Paciente con diagnóstico de certeza de fiebre tifoidea.- Será aquel en quien se haya aislado S. typhi en cultivo de médula ósea, sangre o heces, habiéndose de practicar el primero exclusivamente en pacientes hospitalizados.

III.- Fiebre: se considerará cuando la temperatura axilar sea mayor de 38.3oC, acompañándose de diaforesis, calosfríos, mialgias, artralgias.

IV.- Leucopenia: se considerará cuando exista cifra total de leucocitos menor de 4,500 x mm³.

V.- Leucocitosis: se considerará cuando exista cifra mayor de 10,000 x mm³.

b.- Características de la población.

Se estudiaron pacientes entre 1 y 15 años de edad, independientemente del sexo, que acudieron al servicio de urgencias del Hospital Infantil de México entre los meses de junio a octubre y que, por sus características clínicas se catalogaran como sospechosos de padecer fiebre tifoidea durante el año lectivo de 1984.

c.- Método Experimental.

La prueba de aglutinación con estafilococo para determinar antígeno de Salmonella typhi fue preparada por el suscrito en colaboración con el Dr. Jesús Alvarado Alemán del Departamento de Inmunología del Centro Médico Nacional del I.M.S.S. y con la colaboración del Dr. José Luis Lape Zúñiga en el servicio de Inmunología del Hospital Infantil de México.

La prueba de coagulación del estafilococo se basa en el ferramiento de Staphylococcus aureus Cepa Cowan I con anticuerpos anti-Salmonella typhi y la exposición de los estafilococos ferrados a orina de pacientes con y sin fiebre tifoidea en diversos momentos de su evolución.

c.1.- Producción del Antisuero.-

Se inmunizaron conejos machos de Nueva Zelanda de 3 kg de peso con S. typhi 0901 (sin antígenos flagelares) de la colección de la División de Inmunología del Centro Médico Nacional, I.M.S.S de acuerdo con la técnica de Edwards. Al antisuero se le practicó curva de precipitación de acuerdo a la técnica de Kabat con el policárido de Freeman, extraído en el Laboratorio de Carbohidratos por la técnica modificada por Staub obteniéndose una concentración de IgG de 314 ug/2ml en dicha curva. La concentración de proteínas se determinó por la técnica de Lowry.

c.2.- Obtención de la Fracción Gama del Antisuero.-

La fracción gama del antisuero anti-Salmonella typhi se obtuvo mediante precipitación con sulfato de amonio a concentración final de 33%. Se llevaron a cabo tres precipitaciones y, el precipitado final se resuspendió a un volumen igual al original del suero y se dializó hasta eliminar el sulfato de amonio contra buffer-boratos-saline pH 8.4 y, durante 48 hrs más contra PBS 0.15 M y pH 7.2. (35)

c.3.- Purificación de Anticuerpos por Cromatografía de Afinidad.

i) Preparación del Antígeno por adsorción.- Se obtuvieron cinco cepas de S. typhi aisladas e identificadas en el Hospital Infantil de México. Se colectaron 5 ml de paquete de S. typhi sedimentado. El paquete se dividió en dos alícuotas; una de ellas sirvió de base para la elaboración de Ag O y la otra para antígeno H flagelar. Para la preparación del Ag O se colocó la suspensión bacteriana en baño María a ebullición por dos y media horas, se centrifugó a 5°C por media hora a 1400 x g. Se descartó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 5 ml de solución salina formalizada 0.3%.

Para la preparación del Ag H la alícuota correspondiente se resuspendió en un volumen igual de solución salina formalizada al 0.6% y se dejó a temperatura ambiente por 72 hrs. Al término de ambos procedimientos se verificó la viabilidad de la suspensión bacteriana.

Dado que se obtuvo crecimiento en el primer tratamiento, éste se repitió en dos ocasiones más hasta tener cultivos negativos. Se tomó medio mililitro de paquete de Ag O y medio mililitro de AgH y se lavó en dos ocasiones con buffer glicina-HCl 0.2 M pH 2.3 y en cinco ocasiones más, con solución salina isotónica.

ii) Procedimiento.- Para la adsorción de los anticuerpos anti-S. typhi, el paquete obtenido en el último lavado se resuspendió con la fracción gammaglobulina del suero, diluida 1:2 con PBS a concentración 0.15 M y pH 7.2 en una proporción 1:10 volumen a volumen. La mezcla se agitó con vórtex y se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. La preparación se centrifugó a 5°C por 15 minutos a 1400 x g separando el sobrenadante del se-

c.3.- Purificación de Anticuerpos por Cromatografía de Afinidad.

i) Preparación del Antígeno por adsorción.- Se obtuvieron cinco cepas de S. typhi aisladas e identificadas en el Hospital Infantil de México. Se colectaron 5 ml de paquete de S. typhi sedimentado. El paquete se dividió en dos alícuotas; una de ellas sirvió de base para la elaboración de Ag O y la otra para antígeno H flagelar. Para la preparación del Ag O se colocó la suspensión bacteriana en baño María a ebullición por dos y media horas, se centrifugó a 5°C por media hora a 1400 x g. Se descartó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 5 ml de solución salina formalizada 0.3%.

Para la preparación del Ag H la alícuota correspondiente se resuspendió en un volumen igual de solución salina formalizada al 0.6% y se dejó a temperatura ambiente por 72 hrs. Al término de ambos procedimientos se verificó la viabilidad de la suspensión bacteriana.

Dado que se obtuvo crecimiento en el primer tratamiento, éste se repitió en dos ocasiones más hasta tener cultivos negativos. Se tomó medio mililitro de paquete de Ag O y medio mililitro de AgH y se lavó en dos ocasiones con buffer glicina-HCl 0.2 M pH 2.3 y en cinco ocasiones más, con solución salina isotónica.

ii) Procedimiento.- Para la adsorción de los anticuerpos anti-S. typhi, el paquete obtenido en el último lavado se resuspendió con la fracción gammaglobulina del suero, diluida 1:2 con PBS a concentración 0.15 M y pH 7.2 en una proporción 1:10 volumen a volumen. La mezcla se agitó con vórtex y se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. La preparación se centrifugó a 5°C por 15 minutos a 1400 x g separando el sobrenadante del se-

-dimento. El sobrenadante se guardó para titulación posterior, habiéndose demostrado la negativización o desaparición de la actividad anti-S. typhi por medio de la prueba de Widal. La mezcla de antígenos se resuspendió en el mismo amortiguador - PBS y se lavó en 3 ocasiones con el mismo.

iii).- Elusión de anticuerpos anti-S. typhi.- Para la elusión se adicionaron 3 ml de amortiguador glicina-HCl 0.2 M pH 2.3 a la mezcla de antígenos con anticuerpos; se agitó con vórtex durante un minuto y se centrifugó a 1400 x g por 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se neutralizó mediante adición de cristales de TRIS (Sigma) hasta obtener pH de 7. El procedimiento de elusión se repitió en dos ocasiones. El sobrenadante obtenido se dializó mediante Aquacide II^R hasta obtener un volumen igual al volumen inicial del suero (3 ml) y al que se agregó azida de sodio para obtener una concentración de 0.1%.

iiii) Preparación del S. aureus.- El S. aureus Cowan I (ATCC - 12598) se preparó de acuerdo a trabajos previos, Kronvall, Edwards, Rockhill y Kumate. S. aureus Cowan I, se sembró en medio de Müller Hinton por 18 horas a 37° C; se cosechó con amortiguador fosfato salino (PBS) 0.15 N pH 7.3. Se lavó por centrifugación en tres ocasiones, se suspendieron y se agregó 10 mg para 100 ml de la suspensión bacteriana de azul de tetrazolio (SIGMA), dejándose en estufa a 37° C por 2 horas. Se lavaron con el amortiguador en 3 ocasiones a discreción y a 500 rpm por 5 minutos. Se resuspendieron en SSI 0.9% y formaldehído al 0.5% durante 2 horas. Se lavaron en tres ocasiones en la misma forma anterior. La suspensión se calentó en baño María a 80° C por 60 minutos, agitando en forma constante. Se lavó en dos ocasiones más con PBS y el botón de bacterias se ajustó al 10%.

iiii).- Recubrimiento.- Para recubrir los estafilococos se mezcló un volumen de 0.5 ml de la suspensión bacteriana con la solución de anticuerpos eluidos dejándose en suspensión por 30 minutos a temperatura ambiente. La operación se repitió en dos ocasiones para asegurar un buen recubrimiento. La solución de gammaglobulina anti-S. typhi se tituló antes y después del procedimiento mediante reacción de Widal, observándose desaparición de actividad anti-S. typhi.

Para verificar que las inmunoglobulinas se habían unido a los estafilococos se probaron éstos con un antisuero anti-IgG de conejo preparado en cabra. La coaglutinación fue positiva en forma instantánea. Los controles, estafilococos sin sensibilizar y sensibilizados en forma independiente con SSI 0.9% no se aglutinaron. Se prepararon diluciones de antígenos de Ruiz-Castañeda, Freeman y Westphal, mostrando aglutinación positiva por abajo de 100 nanogramos/ml. Los controles, estafilococo sin sensibilizar, sensibilizados y forrado con anticuerpos de conejo, no mostraron aglutinación al suspenderlos en SSI 0.9%.

En placa se llevó a cabo una titulación doble empleando mezcla de antígeno O y H y la suspensión de S. aureus forrado. Mediante esta prueba se pudo observar que la aglutinación del S. aureus era más fácil de apreciar empleando la suspensión de estafilococos ajustada de tal manera que se obtenía D.O. de 1.06 a 660 nm con una dilución 1:10 de la misma, por lo que se empleó esta concentración durante el estudio de las muestras de los pacientes.

d.- Realización de la Prueba.-

La prueba se llevó a cabo en muestras de orina provenientes de pacientes febriles cuyas características se describen posteriormente. Las muestras de orina se recolectaron durante un periodo

de 4 meses, conservándose en refrigeración hasta su empleo. Para la realización de la prueba las muestras de orina se centrifugaron a 2000 rpm por 3 minutos en una centrífuga clínica. De un capilar de microhematócrito sin heparina se tomó aproximadamente un tercio de su longitud con la suspensión del estafilococo formado y, a continuación, la mitad de su longitud con cada muestra de orina, de tal manera que, la suspensión del estafilococo, quedó estratificada por encima de la muestra de orina.

Los capilares se colocaron en posición vertical enclavados en plastilina y se observaron periódicamente en un tiempo aproximado de una hora. Al mismo tiempo, se prepararon muestras similares controles utilizando estafilococo de la misma cepa sin formar con anticuerpos.

La valoración de los resultados se hizo de negativo a +++ y fue el producto de observación longitudinal del descenso de los estafilococos más que la observación a un solo tiempo dado.

RESULTADOS .-

El estudio comprendió originalmente a cincuenta pacientes con los criterios clínicos ya referidos previamente. Diecisiete de ellos fueron excluidos por no haber cubierto los requisitos necesarios en cuanto a exámenes de laboratorio se refiere, o, -- bien, por no haber acudido a las consultas de control.

Se analizaron treinta y tres pacientes. Las edades comprendieron entre 1 y 15 años, predominando francamente el grupo escolar con 66% del total, obteniéndose una media de 8.6 años. (tabla 1). En cuanto al sexo no hubo predominancia estadística de alguno, correspondiendo, en términos generales, el 50% a cada uno. (tabla 2).

El tiempo de evolución del padecimiento, al acudir por vez primera al servicio de urgencias del Hospital Infantil de México, obtuvo una media de 6.2 días. (tabla 3).

Los principales síntomas manifestados por los pacientes se enumeran en la tabla 4, considerando que, la fiebre, como requisito indispensable, se encontró en el 100% de los casos.

Con respecto a los exámenes peraclicnicos se obtuvieron los siguientes resultados: anemia en el 39% de los pacientes; leucopenia 12% y leucocitosis 24%. (tabla 5). Se practicó examen de orina a las 2/3 partes de los pacientes, presentándose alguna alteración en el 30% de los mismos. La importancia de este hecho se expondrá en la sección de comentarios. (tabla 6).

Los coprocultivos fueron positivos en el 20% de los casos, incluyendo todo tipo de germen, y, solamente en 3 de los 11 pacientes en quienes se diagnosticó fiebre tifoidea, se aisló por este método S. typhi. (tabla 7)

El hemocultivo tuvo positividad exclusivamente en los 3 pacientes en quienes la S. typhi se detectó en heces. (tabla 8)

En cuanto a las reacciones serológicas, la prueba de aglutinación en tubo (Reacción de Widal) y la prueba de fijación de superficie de Ruiz-Castañeda resultaron positivas en los 11 pacientes en quienes se determinó el diagnóstico de fiebre tifoidea, constituyendo éstas el parámetro con el cual se catalogaba el padecimiento como de alta probabilidad. (tabla 9)

En la tabla 10 se especifican los diagnósticos finales a los que se llegó en los pacientes analizados en este estudio. Se aprecia que solamente en el 33% de los casos se corroboró el diagnóstico de fiebre tifoidea, aún cuando esta enfermedad se había sospechado en todos ellos.

Al efectuar la prueba de coagulación en orina se obtuvieron los siguientes resultados: en los 3 pacientes con diagnóstico de certeza de fiebre tifoidea la coagulación fue positiva; en 3 pacientes de los 8 con diagnóstico de alta probabilidad, la prueba resultó negativa (falsos negativos). En 2 de ellos se obtuvo el dato de administración de cloranfenicol y de ampicilina, respectivamente. (tabla 11)

De los veintidós pacientes en quienes el diagnóstico fue distinto al de tifoidea, se encontró coagulación positiva en orina en 8 de ellos (falsos positivos), encontrándose en 3 de ellos un exámen general de orina con algún tipo de alteración. (tabla 12)

Finalmente, en la tabla 13 se expone la valoración estadística a que fue sometido el estudio encontrándose una sensibilidad de 72% y una especificidad del 63% lo cual resulta bajo para una prueba diagnóstica. Por otra parte, la prueba de χ^2 con un gra-

-do de libertad mostró poca significancia estadística con un va
lor de $p < 0.04$. En el capítulo de comentarios y conclusiones
se harán más consideraciones al respecto.

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS A ESTUDIO
PARA PRUEBA DE COAGULACION EN ORINA.

Tabla 1. Edad. n = 33.

periodo (años)	número de pacientes	porcentaje
1 - 2	2	6%
3 - 6	5	15%
7 - 12	22	66%
13 - 15	4	13%
Total	33	100%

$$\bar{x} = 8.6$$

$$D.E. = 5.45$$

Tabla 2. Distribución por sexos. n = 33.

sexo	número	porcentaje
masculino	16	49%
femenino	17	51%
total	33	100%

Tabla 3. Tiempo de evolución al momento del estudio. n = 33

Días	número	porcentaje
1 - 5	17	51%
6 - 10	11	33%
11 - 15	5	16%
total	33	100%

$$\bar{x} = 6.2$$

Tabla 4. Principales síntomas. n = 33.

a.- Fiebre.....	100%
b.- Dolor abdominal.....	37%
c.- Ataque al estado genl.	81%
d.- Vómitos.....	49%
e.- Cefalea.....	39%
f.- Diarrea.....	36%
g.- Constipación.....	36%
h.- Síntomas urinarios....	3%

Tabla 5. Biometría hemática. n = 33

a. Anemia.....	39%
b.- Leucopenia.....	12%
c.- Leucocitosis.....	24%

Tabla 6. Exámen General de orina. n = 33.

a.- Sin alteraciones.....	36%
b.- Hemoglobinuria.....	15%
c.- leucocituria.....	9%
d.- bacteriuria.....	6%
e.- no referido.....	34%

Tabla 7. Coprocultivo. n = 33.

gérmen	número	porcentaje.
negativo	20	60%
<u>S. typhi</u>	3	9%
<u>E. coli</u> (no tipifi- cada)	3	9%
Salmonella B	1	3%
no referido	6	19%
total	33	100%

Tabla 8. Hemocultivo. n = 33.

gérmen	número	porcentaje
negativo	21	63%
<u>S. typhi</u>	3	9%
Salmonella B	1	3%
no practicado	8	25%
total	33	100%

Tabla 9. Reacciones serológicas. n = 33

tipo	número	porcentaje
fijación de # superficie	11	33%
aglutinación en tubo (Widal)	11	33%
O-X19	1	3%

Los pacientes que tuvieron fijación de superficie positiva fueron los mismos que en la de Widal. En el resto de pacientes fueron negativas.

Tabla 10.- Diagnósticos. n = 33 .

Fiebre tifoidea	11	33%
Infección urinaria	2	6%
Sinusitis maxilar	1	3%
Sarampión	1	3%
Apendicitis perforada	1	3%
Leucemia aguda L ₁	1	3%
Hepatitis	2	6%
Faringoamigdalitis	1	3%
Tifo Exantemático	1	3%
Gastroenteritis aguda	5	15%
Salmonelosis (B)	1	3%
No determinado [#]	6	19%
Total	33	100%

Se refiere como diagnóstico no determinado en virtud de que el cuadro febril y el resto de la sintomatología cediéron en forma espontánea.

Tabla 11. Coaglutinación en orina en casos de fiebre tifoidea.

Diagnóstico	número	coaglutinación positiva	coaglutinación negativa
Certeza	3	3	0
alta probabilidad	8	5	3
Total	11	8	3

Tabla 12. Coaglutinación en orina en casos sin fiebre tifoidea

Diagnóstico	número	coaglutinación positiva	coaglutinación negativa
Infección urinaria	2	1	1
Salmonelosis(B)	1	0	1
Sinusitis	1	1	0
Sarampión	1	1	0
Apendicitis	1	1	0
L.A.L.	1	1	0
Hepatitis	2	0	2
Tifo exantemático	1	0	1
Gastroenteritis	5	1	4
No determinado [#]	6	1	5
Faringoamigdalitis	1	1	0
total	22	8	14

pacientes cuyo curso clínico cedió espontáneamente.

Tabla 13. VALORACION ESTADISTICA

Prueba	Resultado
Sensibilidad [#]	72%
Especificidad [#]	63%
χ^2 (Ji cuadrada)	G.L. 1 p < .04

De acuerdo a fórmula expuesta en referencia 36.

G.L. = grados de libertad.

COMENTARIOS

La probabilidad de que una prueba diagnóstica dé resultado para diferenciar entre la enfermedad o ausencia de ésta depende de dos factores: a.- sensibilidad (habilidad de resultar positiva cuando el sujeto padece la enfermedad), y, b.- especificidad (habilidad de resultar negativa cuando el sujeto no padece la enfermedad).

Hablando específicamente de la prueba de coagulación en orina para fiebre tifoidea en este estudio, tanto la sensibilidad como la especificidad tuvieron un valor bajo para considerarse de utilidad como prueba rutinaria diagnóstica. Así mismo, tuvo significancia estadística muy baja mediante la prueba de χ^2 (Ji cuadrada). Sin embargo, hay que tener en mente varios hechos al respecto que pudieron tener influencia importante en los resultados obtenidos.

Primeramente, la prueba de coagulación efectuada en este trabajo estuvo constituida por anticuerpos policlonales lo cual favorece el índice de falsos positivos dado las interacciones que pueden presentar las enterobacterias en general entre sí y de las salmonelas que compartan alguno de los antígenos propios de *S. typhi*. A diferencia de esto, en un estudio realizado en 1982, utilizando esta misma prueba pero con anticuerpos monoclonales, se obtuvo positividad en el 97% de los pacientes con diagnóstico de certeza de fiebre tifoidea. Los falsos positivos correspondieron a pacientes con leucocituria. No obstante, han quedado interrogantes por resolver en estos trabajos tales como el tiempo que pueden detectarse los antígenos después de iniciar antimicrobianos; la intensidad de la coagulación en relación con la severidad de la enfermedad y, la posibilidad de

utilizar la prueba de coagulación como diagnóstica aún en ausencia de otros exámenes positivos.

Partiendo de estos puntos, y relacionándolos con el presente trabajo cabe hacer mención que tres de los 8 pacientes con prueba falsa positiva, presentaban algún tipo de alteración en el exámen de orina (leucocituria, hemoglobinuria, bacteriuria) no habiéndose efectuado correlación de tipo estadístico en virtud de tratarse de un número muy pequeño de casos y de requerirse para ésto, un proyecto de trabajo encaminado a definir conceptos y efectuar pruebas por separado de acuerdo a cada tipo de alteración urinaria para poder así formular deducciones más precisas. Se refiere que, incluso la presencia de bilirrubinuria o concentración elevada de proteínas en la orina pueden condicionar coagulación aún en ausencia de antígenos específicos.

Por otra parte, de los tres pacientes que resultaron con prueba falsa negativa bajo diagnóstico de alta probabilidad de fiebre tifoidea, dos de ellos habían estado sometidos a tratamiento antimicrobiano contra S. typhi por periodo promedio de 4 días por lo que también debe considerarse como un factor que pueda alterar el resultado de la coagulación en orina. Sin embargo, por las mismas circunstancias que en el caso de alteraciones urinarias, no se realizó correlación alguna con esta variable. De nueva cuenta, sería interesante valorar, por medio de un estudio bien controlado, el efecto de los antimicrobianos en la coagulación tomando en consideración el tipo, tiempo de administración y dosis de dichos fármacos.

El hecho de que la mayoría de los pacientes acuda al hospital con un tiempo de evolución promedio de una semana constituye otro problema, pues, habitualmente, han sido valorados previamente

-te por uno o más facultativos y recibido tratamiento diverso _
sobre todo, antibióticos. Una buena opción sería efectuar un _
nuevo estudio a nivel de unidades de primer nivel de atención _
médica para poder eliminar este factor de error.

CONCLUSIONES.-

La prueba de coagulación en orina para fiebre tifoidea presenta un alto número de falsas positivas y falsas negativas lo cual condiciona baja sensibilidad y especificidad. Esto es verdadero al menos, cuando se utilizan anticuerpos policlonales

Las alteraciones en el exámen de orina, tales como hemoglobinuria, bacteriuria, leucocituria y albuminuria, deben tenerse en mente como factores que puedan modificar la respuesta a la coagulación (falsos positivos).

Existen otros factores que también pueden favorecer respuestas incorrectas en la prueba, a saber, : administración previa de antibióticos, sobre todo si tienen acción directa contra salmonellas; el tiempo de evolución en que se presenta el paciente pues no se ha determinado con precisión el lapso durante el cual se excretan antígenos por orina.

En resúmen, en el momento actual, la mayoría de los diagnósticos establecidos de fiebre tifoidea, están sustentados en las pruebas serológicas, dado que los cultivos no tienen alto índice de positividad y, la prueba de coagulación no ofrece mejores perspectivas.

De ser utilizada la prueba de coagulación, lo conveniente es emplear anticuerpos monoclonales para una mayor efectividad de la misma. Sin embargo, ésto resultaría costoso y fuera del alcance de muchos hospitales.

B I B L I O G R A F I A.

- 1.- Kumate, J.; Gutiérrez, G.: Fiebre Tifoidea. En Kumate J.; Manual de Infectología. 6a ed. México: Méndez Cervantes, 1981 47-57.
- 2.- Spaun, J.: Determination of Salmonella typhi O and Vi antibodies by haemagglutination. Act. Pathol. Microbiol. Scand. 1952 31: 462-69.
- 3.- Landy, M., Trapeni, R.U. y Clark, W.R.: Studies on the O antigen of Salmonella typhi. Am. J. Hyg. 1955; 62: 54-65.
- 4.- Talmage, D.W., Preter, G.G. y Talafierro, W.H.: Two antibodies of related specificity but different hemolytic efficiency separated by centrifugation. J. Infect. Dis. 1956; 98: 300.
- 5.- Muñoz, O., Hernández-Velarde, R.; Garduño, R.G.; González, A.S.; Gutiérrez, G.: Contrainmunolectroforesis para la identificación de anticuerpos contra antígenos "O" de S. typhi. II. E valuación en enfermos de fiebre tifoidea y población sana. Arch. Invest. Méd. (Méx) 1979; 10: 33.
- 6.- Carlsson, H.E., Lindberg, A.A.; Hammarstrom, S. y Ljunggen, A.: Quantitation of salmonella O antibodies in human sera by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Int. Arch. Allergy Appl. Immun. 1975; 48: 485-494.
- 7.- Hernández- Velarde, R., Sánchez, G.; J.: Díaz G., Ma. G.; Muñoz O.: Utilización de la técnica de ensayo enzimático inmunoespecífico (ELISA) para el diagnóstico de la fiebre tifoidea. I Estandarización de la técnica. Arch. Invest. Méd. (Méx) 1980 ; 11: 137.
- 8.- Tsang, W. R.; Chan, Y. P.; Lam, K.S.; Labroy, T.J., y Rowley, D.: Antibody response to the lipopolysaccharide and protein antigens of Salmonella typhi during typhoid infection. Clin Exp. Immunol. 1981; 46: 508-514.

- 9.- Pink, W.C.; Miller, W.E., Dorward, B. and Lo Spalluto, J. ; The formation of macroglobulin antibodies. II. Studies on neonatal infants and older children. J. of Clin. Invest. 1962; 41 : 1422-1428.
- 10.- Rockhill, R.C., Rums, L.W.; Lesmona, M.; Demus, T.; Detection of Salmonella typhi D, Vi and d antigens by slide coagglutination in humans urine from patients with typhoid fever. J. Clin. Microbiol. 1980; 11: 213.
- 11.- Kumate, J.; Carrillo, J.; Coagglutination diagnostic techniques in human salmonellosis. Afr. U. Clin. Exp. Immunol. 1982 30 : 190-194.
- 12.- Sjöquist, J.; Movitz, J.; Johansson, I. and Hjelm, H.: Localization of protein A in the bacteria. Eu. J. Biochem. 1972 ; 30: 190-194.
- 13.- Kronvall, G.; Seal, S.V.; Finstad, J. and Williams C. Ralph (hijo) : Phylogenetic Staphylococcal protein A. J. of Immunology 1977; 104: 140-146.
- 14.- Forsgren and Sjöquist, J. : " Protein A from Staphylococcus aureus. III. Reaction with rabbit gamma globulin. J. of Immunol. 1967; 99 : 19-24.
- 15.- Langone, J.J.: Use of labeled protein A in quantitative immunochemical analysis of antigens and antibodies. J. of Immunol. Methods. 1982; 51: 2-22.
- 16.- Grangeot-Keros; L.; Lebrun, L.; Briantais, J.M. and Pillot J.: A critical study of the use of staphylococci containing protein A for separation of IgG and IgM antibodies. J. Immunol. Methods. 1982; 51: 183-195.
- 17.- Ekins, R. : More sensitive immunoassays. Nature. 1980; 284 14-15.

- 18.- Freeman, G. : The preparation and properties of a specific polysaccharide from *Bact. typhosum*. *Biochem. J.* 1942; 36: 340-356.
- 19.- Staub, A.M. and R. Girard: Etude immunochemique sur les Salmonellas. Analyse des facteurs 1 de groups B, Fy et G.: Leur rapport avec les facteurs. 112, 19 et 37. *Bull. Soc. Chim, Biol.* 1965; 47: 1245-1268.
- 20.- Lowry, O.H., Rosenbrough, A.L.: Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193: 265-273.
- 21.- Affinity chromatography. Principles and methods. Pharmacia fine chemicals. p.p. 16-22.
- 22.- Roshanti, F.: Antigen-antibody precipitates and immunosorbents. Application to purifications of alpha-fetoprotein. *Scand. J. Immunol. Suppl.* 1976; 3: 39.
- 23.- Marcus, S.L. y Balbiden, E.: Use of affinity matrices in determining steric requirements for substrate binding: Binding of antranilate 5-phosphoribosyl;phyrophosphate phosphoribosyl--transferase from Salmonella typhimurium to sepharose-antranilate derivatives. *Anal. Biochem.* 1972, 48: 448-459.
- 24.- Kronvall, G.: A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody absorbed to protein A-containing staphylococci. *J. Med. Microbiol.* 1973; 6: 187-190.
- 25.- Luderitz, O.: Staub, A.M.; y Westphal, O.; Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and *Enterobacteriaceae*. *Bact. Revs.* 1966: 30: 192-255.
- 26.- Edwards, A.E. and Hilderbrand, L.P.: method for identifying *Salmonella* and *Shigella* directly from the primary isolation plate by coagglutination of protein A-containing staphylococci

sensitized with specific antibody. J. Clin. Microb. 1976; 3: 339-343.

27.- Ingemar, B.; Bengt-Ake, P.; Sjöquist, J.: Some physicochemical properties of protein A from Staphylococcus aureus. Eur. J. Biochemical. 1972, 23: 579-584.

28.- Engvall, E.; Preparation of Enzyme-labelled Staphylococcal protein A and its use for detection of antibodies. Scand. J. Immunol. 1973; vol. 8, suppl. 7: 25-31.

29.- Sjöquist, J.; Meloune, B.; Protein A isolated from Staphylococcus aureus after digestion with Lysostaphin. Eur. J. Biochem 1972, 23: 572-578.

30.- García Tamayo F.; Drago, E.; Demostración de antígenos en productos biológicos por coaglutinación de estafilococos que contienen proteína A. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1982, vol. 39, 5: 321-326.

31.- Kumate, J.; Benavides, L.; Hikimura, J.; Herrera, R.L.: Respuesta inmunológica en fiebre tifoidea. Bol. Méd. Hosp. Infant. (Méx). 1962, 19: 17-27.

32.- Kumate, J.; Villareal, J.; Carrillo, J.; Isibasi, A.: Eliminación de antígenos de salmonelas en la fiebre tifoidea. Encues epidemiológica; Arch. Invest. Méd. (Méx). 1983; 14: 51.

33.- Sheldon, L. K.; Feigin D.R.: Identificación rápida del microorganismo invasor. Clínicas Pediátricas de Norteamérica. 1980 4: 809-830.

34.- Krugman, S.; Ward, R.: Fiebre tifoiden. In Krugman, S y Ward, R.: Enfermedades infecciosas. 6a Ed. Interamericana. 1979 269-275.

35.- Garvy J.S.; Cremer, N.F.; Suis Dorf. Methods in Immunology 3th Edition. W.A. Benjamin Inc. London, 1977. pp 218-219.

36.- Vandale, S.T.; Almada I.; Soní, M.: Glosario de Epidemio--
logía. Revista de la Facultad de Medicina. Vol XXIII. 1980, 2.;
14-25.