

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**Comprobación de la Especificidad del Método
de Inmunofluorescencia para el Diagnóstico de
la Sífilis y Variaciones en la Técnica**

43

T E S I S

QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N

MARIA DEL CARMEN BREÑA CANTU

MARIA LUISA GARCIA GONZALEZ



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.

Tesis
1974
Mit. 39



QUIMICA

PRESIDENTE: Q.F.B. Magdalena Acosta Segura

VOCAL: Q.F.B. Carmen Reyna Bordes

SECRETARIO: Q.F.B. Oscar Amor Dodero

1er. SUPLENTE: Q.F.B. Ernestina Ballesteros Rueda

2do. SUPLENTE: Q.F.B. Socorro Cao Romero Martínez

Sitio donde se desarrolló el tema:

CENTRO ELISEO RAMIREZ, S.S.A.

Sustentantes: Ma. del Carmen Breña Cantú

Ma. Luisa García González

Asesor del tema: Q.F.B. Oscar Amor Dodero

Supervisor técnico: Dr. Gilberto Breña Villaseñor

A NUESTROS PADRES
CON GRATITUD Y CARIÑO

CON AGRADECIMIENTO AL DR. BREÑA QUE CON SU
AYUDA Y CONSEJOS HIZO POSIBLE LA REALIZACION
DE ESTE TRABAJO

CON AGRADECIMIENTO A LAS SIGUIENTES PERSONAS
QUE COLABORARON EN FORMA DESINTERESADA:

Dr. José Morales García

Dr. Fernando Latapí

Q.F.B. Oscar Amor

Q.F.B Magdalena Acosta

Dra. Esperanza Lima

CONTENIDO

INTRODUCCION

GENERALIDADES

FLUORESCENCIA

INMUNOFLUORESCENCIA

REACCIONES DE INMUNOFLUORESCENCIA

GENERALIDADES SOBRE LAS REACCIONES -

- SEROLOGICAS APLICADAS A TREPONEMATOSIS

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

El estudio presentado a continuación intenta determinar en una forma comparativa la seguridad del método de inmunofluorescencia (FTA-ABS) para el diagnóstico diferencial de sífilis frente a las reacciones falsas positivas que se obtienen con antígenos lipóidicos en reacciones serológicas (VDRL).

Para este fin se emplearon sueros de enfermos comprobados de lepra y tuberculosis, porque son dos de las infecciones que producen reacciones serológicas "falsas positivas" y que se encuentran en proporción significativa en nuestro país.

El segundo objetivo fué comparar los resultados obtenidos en enfermos comprobados de sífilis con la técnica original (FTA-ABS) y los logrados con algunas variaciones sugeridas para acortar el tiempo de la reacción o hacer más fácil la lectura de sus resultados.

GENERALIDADES

Desde la introducción del diagnóstico serológico de la sífilis se señalaron diversas condiciones en que se obtienen resultados positivos en la ausencia de treponematosiis, como en los casos de otras infecciones: (paludismo, lepra, tuberculosis, sarampión, rubeola, vacunación antivariolosa, etc.), en enfermedades de la colágena (lupus eritematoso diseminado, periarteritis nodosa) y en otros procesos.

Faget y Ross en 1944 (1) hicieron una evaluación de las reacciones Wassermann y Kahn positivas en la lepra; Gollerki ri (2), Ruge (3), Almeida (4), Gilbert (5), Portnoy (6), Trespalacios (7) y Edmunson (8) encontraron una proporción de positivos de 24.9 %, 24.8 %, 65 %, 56 %, 58.8 %, 50 % y 63.4 % respectivamente. Utilizando las reacciones de VDRL y otras de microfloculación con cardiolipina y citolipina los resultados son aproximadamente los mismos entre 40 y 50 % de positivas y por lo tanto el uso de antígenos purificados de éste tipo no significa ventaja alguna (7). En 1958 Breña y Malacara estudiaron cuatro reacciones serológicas diferentes en enfermos de lepra (9). Algunos de los autores citados como Gollerkiri y Ruge encontraron proporciones más bajas de reacciones serológicas positivas en los casos de tuberculosis que en los de lepra. En 1964 G. Niel y A. Fribourg-Blanc (10) hicieron un estudio utilizando diezmil sueros, en los que se aplicaron las pruebas de cardiolipina, (VDRL, Kline y Kolmer) y la de FTA en forma comparativa.

FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un fenómeno que consiste en la absorción de energía radiante en forma de cuantos luminosos de -- cierta longitud de onda por moléculas llamadas fluorocromos, de tal manera que al ser excitados sus electrones, éstos son des-- plazados a un orbital de mayor energía, del que regresan a su -- posición original emitiendo energía luminosa de longitud de on-- da mayor a la absorbida (Ley de Stokes) en la porción visible -- del espectro.

La fluorescencia se introdujo a la microscopía a principios de la década 1930-1940 para el estudio de fenómenos di-- versos, pero fué hasta 1941 en que Coons y cols. demostraron -- que las inmunoglobulias se combinaban químicamente con fluoro-- cromos sin modificar el sitio activo que se une con los antíge-- nos respectivos, y así el fenómeno de fluorescencia se incorpo-- ró al arsenal de indicadores de una reacción antígeno-anticuer-- po y se originaron una serie de reacciones inmunológicas frente a diversos sistemas.

INMUNOFLUORESCENCIA

El método de inmunofluorescencia, introducido por -- Coons (1942) consiste en el empleo de fluorocromos para marcar las proteínas de los sistemas antígeno-anticuerpo y utilizar la emisión de luz fluorescente como indicador del fenómeno inmunológico que se investiga.

Los fluorocromos que se han empleado con esta finalidad son múltiples, pero sin duda alguna el isotiocianato de -- fluoresceína isómero III, es el más usado; fluoresce en verde -- excitado por luz azul por lo que el sistema microscópico utiliza un filtro "excitador" para seleccionar la longitud de onda -- con pico de transmisión a 365 y 465 nm y un filtro de "barrera" BG 12 (amarillo) que elimina del haz luminoso que ya atravesó -- la preparación cualquier vestigio de luz "excitadora" dejando -- pasar en cambio la luz que se ha producido por fluorescencia en las partículas proteínicas de los sistemas antígeno-anticuerpo -- que se han colocado para su investigación en el portaobjetos en la platina del microscopio.

El método de inmunofluorescencia tiene las siguientes ventajas:

- 1.- Es aplicable a cualquier sistema inmunológico.
- 2.- El fenómeno indicador de la positividad es más fácilmente -- observado que la hemólisis, la precipitación, la aglutinación, -- la microaglutinación, etc., que indican la positividad en otros sistemas inmunológicos, por lo cual su sensibilidad a pequeñas -- concentraciones de antígeno, anticuerpo o complemento es muy al -- ta.

Estas ventajas hicieron que se ensayara en practicamente todas las reacciones antígeno-anticuerpo que se usan para el diagnóstico clínico, por ejemplo: peste (11), difteria (12), -- salmonelosis (13), influenza (14), estreptococcias (15), gono--coccias (16), treponematosi (17), rabia (18), micosis (19), pa rasitosis (20), etc.

Se comprobó bien pronto que el método tan sensible de la inmunofluorescencia no mejoraba en modo alguno la especifici dad frente a la reactividad cruzada, antígenos de grupo, comple jos antigénicos, etc. por lo cual la alta sensibilidad en algu--nos casos era una desventaja, pues hacía más aparentes las reac ciones inespecíficas que estorbaban es diagnóstico inmunológico y poco a poco se fueron desechando para el uso rutinario con a plicaciones en la clínica humana.

En cambio otras reacciones de inmunofluorescencia pa ra el diagnóstico específico de enfermedades para las cuales -- los métodos inmunológicos tradicionales se habían mostrado ine ficaces por complejidad técnica o por baja sensibilidad; como - en el caso del estreptococo hemolítico del grupo A de Lancefield que para clasificarlo requería de la hidrólisis ácida de la ce pa aislada y preparación de un extracto para hacerlo reaccionar con el suero inmune en una reacción de precipitación.

También la demostración de anticuerpos específicos pa ra el grupo del Treponema pallidum (T. pertenue y T. carateum), en que se había logrado una máxima especificidad y sensibilidad

con la reacción de inmovilización del *Treponema pallidum* "TPI" (21), pero a costa de una técnica compleja y muy difícil de estandarizar y la imposibilidad de conservar vivos los treponemas (cepa Nichols) que se requerían como antígeno, durante tiempos prolongados.

La prueba de inmunofluorescencia para el *Treponema pallidum* (FTA) introducida en 1957 por Deacon, Falcon y Harris y perfeccionada al FTA-200 en 1960 por los mismos autores y en la actualidad FTA-ABS por Hunter y cols. descrita en 1964, permite en cambio el uso de treponemas muertos que se conservan liofilizados por meses con sus cualidades antigénicas íntegras y conjugados fluorescentes de anticuerpos con el mismo carácter permanente, siendo la sensibilidad y especificidad de éste método tan buena que la del TPI. En rigor cuando se observa una preparación de inmunofluorescencia para el *T. pallidum* cada uno de los cuerpos microbianos representa una unidad reaccional antígeno-anticuerpo que por su fluorescencia indica la positividad.

REACCIONES DE INMUNOFLORESCENCIA

El uso del tipo de prueba de anticuerpos fluorescentes (FTA) depende del objetivo de ésta, de los reactivos disponibles y de las preferencias del investigador. Vamos a considerar 4 variantes de la técnica de anticuerpos fluorescentes: directa, inhibición, indirecta y fijación de complemento.

El antígeno que se emplea puede ser tejido o cultivo--conteniendo virus, bacterias, protozoarios, hongos o antígenos--solubles de varios tipos. Las suspensiones de microorganismos -- pueden ser marcadas con sustancias fluorescentes pero es más fá--cil hacerlo usando un frotis o una sección en laminillas, pues--se manejan mejor que las suspensiones. La fijación del antígeno a la laminilla se lleva a cabo por diferentes métodos dependien--do de la naturaleza del material.

El método de anticuerpos fluorescentes debe incluir -- controles, tomando en cuenta que: En algunos materiales hay una fluorescencia natural, incluyendo los componentes de tejidos -- así como algunos organismos como por ejemplo los hongos. Esto -- se espera cuando se va a detectar un antígeno con especificidad cruzada que se unen a dos o varios organismos diferentes.

METODO DIRECTO:

La unión del antígeno con el anticuerpo fluorescente--es la forma más sencilla de efectuar esta reacción. El anticuer--po marcado se pone en contacto con el antígeno fijado en una la--minilla. Después de un intervalo de tiempo, determinado previa--mente para cada sistema en estudio, se lava el exceso de anti--

cuerpo, se monta la preparación y se examina con un microscopio de luz ultravioleta.

En pruebas de diagnóstico, esta reacción se utiliza para identificar antígenos desconocidas usando un anticuerpo marcado. Es aplicable con ventajas para identificar, por ejemplo: *E. coli*, *T. pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococo* del grupo A de Lancefield, *Endamoeba histolítica*, *Tripanosoma* y en general a todos los microorganismos de los que se puedan obtener sueros inmunes: en el caso de virus que no tienen una morfología definida se observará la fluorescencia comparándolo con una impronta de células normales (testigo negativo).

Ventajas: La identificación de antígenos por el método directo con anticuerpos fluorescentes no presenta serias dificultades en la interpretación si se tiene una globulina marcada con un buen título, además no se presentan uniones inespecíficas y muy poca antigenicidad cruzada.

Desventajas: Los sueros inmunes son caros y se requieren tantos conjugados como bacterias y virus para identificar.

La reacción directa funciona según el siguiente esquema:

Reacción positiva:



Antígeno desconocido + Suero inmune = Si Ag₁ y Ac₁ se co-
(anticuerpo marcado) responden se obser-
va fluorescencia

Reacción negativa:



Antígeno desconocido + anticuerpo marcado = Si Ag₂ y Ac₁ no se
corresponden no se
observa fluorescencia

Nota: En este esquema y en los sucesivos se emplean los símbo-
los: Ag como antígeno y Ac como anticuerpo.

METODO DE INHIBICION;

Este procedimiento se basa en el fenómeno inmunológico de bloquear las reacciones específicas antígeno-anticuerpo, exponiendo primero el antígeno frente a una solución de un anticuerpo homólogo sin conjugar. Por ejemplo si una laminilla con Estreptococos grupo A se expone a anticuerpo específico de Es-
treptococo grupo A no marcado, el antígeno se fijará a la bacte-
ria. Si después la misma laminilla se expone al anticuerpo espe-
cífico Estreptococo grupo A pero marcado, no ocurrirá reacción-
alguna y el microorganismo permanecerá sin presentar fluore-
sencia. En la práctica se observa fluorescencia positiva si no-
ha ocurrido bloqueo y una brillantez menor en caso de que exis-

tiera bloqueo. La inhibición puede demostrarse también exponiendo al antígeno a una mezcla de anticuerpos conjugados y sin marcar en el mismo paso. Por razones aún desconocidas el último -- procedimiento a veces demuestra la inhibición cuando el primer método da resultados equívocos. En ambos métodos el grado de inhibición debe de ser evaluado por comparación con el efecto de un suero normal sin conjugar usado en la misma manera que el suero problema sin conjugar sobre una preparación de antígeno para comparar.

La técnica de inhibición es importante en dos aspectos: Es una fuerte evidencia de la especificidad de una reacción inmunológica (se emplea como comprobación para la especificidad de el método directo). También nos proporciona un medio de demostrar anticuerpos desconocidos en el suero. La reacción de inhibición funciona según el esquema:

REACCION DE COMPROBACION:

Paso 1:

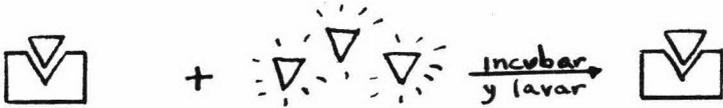


Antígeno desconocido + anticuerpo sin marcar = Producto sin marcar

Ag_1 (suero inmune) car Ag_1-Ac_1

Ac_1

Paso 2:



Producto sin marcar + anticuerpo marcado = Producto sin marcar

Ag_1-Ac_1

Ac_1'

Fluorescencia nega-

tiva indica inhibi-

ción de la segunda -

reacción con Ac_1' por

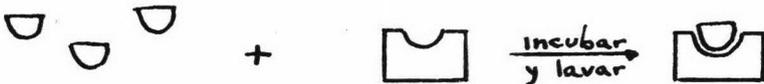
conjugación del Ag_1

con el Ac_1 sin marcar

REACCION DE INHIBICION PARA DEMOSTRAR ANTICUERPOS DESCONOCIDOS
EN EL SUERO:

Reacción positiva:

Paso 1:



Anticuerpo desconocido + Antígeno sin marcar = Producto de reac

Ac_1

Ag_1

ción

Ac_1-Ag_1

Paso 2:



Producto de reacción + anticuerpo marcado = Producto sin fluo-

Ag_1-Ac_1

Ac_1'

rescencia significa

que si hay anticuer

pos en el suero pro

blema. Ag_1-Ac_1

Reacción negativa:

Paso 1:



Anticuerpo desconocido + antígeno sin marcar = Producto de reacción Ag_1

Ac_2 Ag_1 Ag_1

Paso 2:



Producto de reacción + Anticuerpo marcado = Producto con fluorescencia positiva—
significa que no hay anticuerpos frente a Ag_1 en el suero problema. Ag_1-Ac_1'

Ag_1 Ac_1'

METODO INDIRECTO:

El método de anticuerpos fluorescentes indirecto es una modificación de la reacción de Coombs, en la que la unión del anticuerpo sin marcar con el antígeno se visualiza por medio de una segunda reacción con el anticuerpo fluorescente como indicador, que corresponde a la segunda etapa de la reacción de Coombs en la que se produce aglutinación. El anticuerpo sin marcar juega aquí un doble papel actuando como anticuerpo en la primera reacción y como antígeno en la segunda.

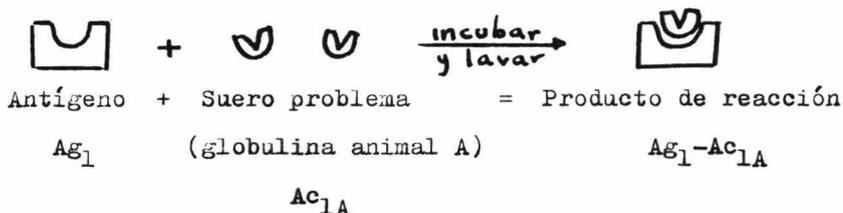
La prueba indirecta permite determinar un antígeno o anticuerpo desconocido en el suero. En el primer caso el antígeno desconocido reacciona con el anticuerpo no marcado conocido obtenido de una especie animal "A". Se elimina el exceso de anticuerpo y la preparación se trata con antiglobulina marcada -- contra la globulina de la especie "A" usada en la primera exposición. La fluorescencia indica una reacción entre el antígeno desconocido y el anticuerpo globulina de la primera reacción.

La investigación de la presencia de un anticuerpo desconocido en suero por el método indirecto, puede hacerse cuantitativo usando el suero a diferentes diluciones: el título será la última dilución que sea positiva.

La ventaja del método indirecto consiste en que no se requiere un cojugado para cada germen que se estudie, sino solamente un suero antiglobulina conjugado frente a la especie animal del suero conocido.

Esquema del método indirecto (Ac desconocido).

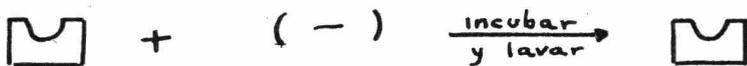
Reacción positiva:





Producto de reacción + Suero antiglobulina A = Fluorescencia po
 $\text{Ag}_1\text{-Ac}_{1A}$ Ag_A sitiva si **existen**
 anticuerpos fren-
 te a Ag_1 en el --
 suero problema.
 $\text{Ag}_1\text{-Ac}_{1A}\text{-Ag}_A$

Reacción negativa:



Antígeno + Suero problema sin Ac_{1A} = Producto de reacción
 Ag_1 Ag_1



Producto de reacción + suero antiglobulina A = Fluorescencia ne
 Ag_1 marcado gativa pues **no hay**
 Ag_A anticuerpos frente
 a Ag_1 en el suero
 problema.

METODO DE FIJACION DE COMPLEMENTO:

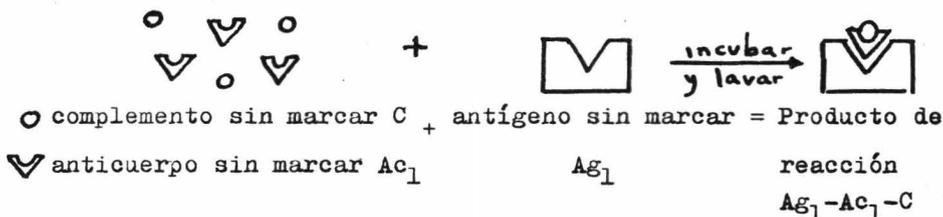
Este método es similar al indirecto pero la antiglobu
lina marcada no es contra la especie animal de la que procede el
 suero inmune, sino contra la especie animal que proporciona el-

complemento. Durante la primera etapa de la reacción se añade - el complemento al suero inmune. Como el método indirecto, esta reacción permite la identificación de un antígeno desconocido, - o de un anticuerpo desconocido. Su principal ventaja sobre el - método indirecto es en la prueba de un suero desconocido donde - un solo conjugado (anticomplemento) se usa en las pruebas de - los sueros de cualquier especie. En esta prueba el suero inacti - vado y el complemento se aplican simultáneamente al antígeno. - Después de incubar y lavar, se aplica el segundo reactivo marca - do y la preparación se incuba nuevamente, el último lavado y la observación se hacen como en los demás métodos. Otra ventaja es que aplicado a *Rickettsias*, haciendo diluciones de los sueros in - munes, los puntos finales por éste método son más altos que por otros.

Por lo contrario el método de fijación de complemento tiene la desventaja de que es más difícil eliminar fluorescencia inespecífica de fondo que en los métodos directo o indirecto.

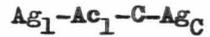
Esquema del método de fijación de complemento:

Reacción positiva:





Producto de reacción + anticomplemento marcado = Fluorescencia-
positiva si an-
tígeno y anticuer-
po se correspon-
den.



Reacción negativa:



○ complemento sin marcar C + Ag desconocido = Producto de reac-
ción Ag₂
▽ anticuerpo sin marcar Ac₁ Ag₂ ción Ag₂



Producto de reacción + anticomplemento marcado = Fluorescencia-
negativa, no se
combina Ag₂

Nota: En vez de las iniciales AFT (anticuerpos fluorescentes de treponema) se emplean las correspondientes en inglés FTA por -- ser las que se encuentran más comunmente en la literatura.

Buscando la forma de aumentar la sensibilidad y espe-
cificidad de la prueba de FTA, se realizaron investigaciones so

bre la naturaleza de los anticuerpos responsables de su positividad. Los resultados obtenidos por varios autores parecen indicar que el resultado positivo de la prueba de FTA, depende como mínimo de dos anticuerpos. Uno de ellos es reconocido como específico del *T. pallidum* y el otro como "específico de grupo". Pudo demostrarse que este último puede eliminarse del suero de los luéticos mediante procesos de absorción o bloqueo, lo que conduce a un aumento de la especificidad reactiva de la prueba de FTA.

Sobre la base de estos resultados Hunter y cols. introdujeron en 1964, el método de FTA-ABS en el diagnóstico serológico de la sífilis. El principio es el mismo que en método de FTA y la diferencia consiste en la separación de los anticuerpos "específicos de grupo" del suero del paciente por absorción con lisado de treponemas de Reiter, usandolo para diluir el suero problema y absorber los anticuerpos de grupo. El empleo de treponemas íntegros de Reiter como sustancia de absorción mostró menor efectividad que la utilización de treponemas de Reiter lisados. En la actualidad sólo se emplean como medio de absorción los gérmenes desintegrados (22).

GENERALIDADES SOBRE LAS REACCIONES
SEROLOGICAS APLICADAS A TREPONEMATOSIS

En la actualidad se utilizan dos clases de reacciones para la sífilis: con antígenos no treponémicos y con antígenos-treponémicos.

Reacciones con antígenos no treponémicos.- Se hacen con "antígenos lipóidicos" obtenidos por lo general del corazón de res y revelan un anticuerpo denominado "reagina". En todas las pruebas de sífilis anteriores, a partir de la reacción -- Wassermann se usaban "antígenos lipóidicos crudos" de tejido de mamífero extraídos por solventes orgánicos y disueltos finalmente en alcohol. El aislamiento en 1941 de la cardiolipina (23) - fosfolípido responsable de la reactividad de los "antígenos lipóidicos" en las pruebas de sífilis, mostró que esta sustancia se puede combinar con proporciones apropiadas de lecitina purificada y colesterol, formando así "antígenos" utilizables en -- las pruebas de fijación de complemento y de floculación. Los -- "antígenos de cardiolipina" son mezclas de cardiolipina, lecitina purificada y colesterol, disueltos en etanol.

Las pruebas no treponémicas más usadas fueron la de Kahn, que puede hacerse con antígenos lipóidicos o de cardiolipina, la de Hinton, Kline, Kolmer, Mazzini y la de VDRL, basadas en "antígenos de cardiolipina".

Reacciones con antígenos treponémicos.- Hay dos grupos de reacciones: Las que emplean antígenos preparados con *T. pallidum* obtenido de sífiloma testicular de conejo y comprende-

las reacciones de inmovilización del *T. pallidum* (TPI), la de inmuno-adherencia del *T. pallidum* (TPIA), la de aglutinación del *T. pallidum* (TPA), la de fijación del complemento del *T. pallidum* (TPCF) y la de anticuerpos fluorescentes del *T. pallidum* (FTA). El segundo grupo de reacciones utilizan antígenos preparados con *T. Reiter*, una cepa no patógena, cultivable en medios artificiales, por ejemplo la de fijación de complemento del *T. Reiter* (RPCF). Ambos tipos de reacciones revelan anticuerpos antitreponémicos distintos de la reagina.

Cuando el *T. pallidum* invade el organismo humano produce la sífilis y provoca una respuesta inmunológica que se manifiesta por la presencia de anticuerpos en el suero sanguíneo para tres clases de antígenos.

1.- Anticuerpos inespecíficos que resultan de la interacción del treponema con los tejidos (reagina). Reaccionan frente a los antígenos lipoidicos.

2.- Anticuerpos específicos que reaccionan con antígenos treponémicos:

a) Anticuerpos para el *T. pallidum*, que sólo reaccionan con los treponemas patógenos.

b) Anticuerpos de grupo comunes a los treponemas patógenos y a los no patógenos de la cepa Reiter.

Los anticuerpos contra la lúes son sustancias sintetizadas por el organismo bajo el estímulo de los antígenos repre

sentados por el *T. pallidum*. Estos anticuerpos representan moléculas proteicas de tipo globulinas y su síntesis no depende solamente del número de treponemas y de la permanencia de éstos en el organismo, sino que también de la capacidad orgánica individual para producir inmunoglobulinas (24).

La producción de reagina acompaña constantemente en cantidad elevada y por largo tiempo a todas las treponematosishumanas. Estas reacciones positivas convencionalmente se les considera como reacciones "positivas verdaderas".

En otros padecimientos ya mencionados, puede producirse la reagina, pero raras veces, en escasa cantidad y por lo común por corto tiempo. También se presenta la reagina, muy raramente, (1 en 3000) en un sujeto sano (25). Se ha reportado la presencia de reagina en algunos individuos durante el embarazo, el cancer y la donación de sangre (especialmente si es repetida), etc. Las reacciones positivas obtenidas con antígenos lipóidicos en estas condiciones convencionalmente se denominan "falsas positivas biológicas" o "seudo-positivas".

Se ha encontrado que los casos de resultados "seudo-positivos" en personas sin evidencia clínica de sífilis son mayores cuando se efectúan las pruebas no treponémicas y que se eliminan prácticamente por las pruebas treponémicas.

En los casos en que las pruebas de tamiz para sífilis dan resultados positivos sin síntomas, signos o historia de tre

ponematosi, conviene practicar las pruebas de **FTA-ABS** para diferenciar las "positivas verdaderas" (26).

En términos generales de cada 100 resultados positivos para la reagina practicados con reacciones aprobadas, sólo uno es de esperar que sea causado por una enfermedad distinta de las treponematosi. La cualidad de ser positiva en casos de treponematosi y negativa en las demás condiciones constituye la "especificidad", que es mayor del 99% en las reacciones "aprobadas".

La evolución de las treponematosi y el tratamiento -- por medios terapéuticos adecuados alteran la cantidad de reagina o ésta desaparece llegando la reacción a ser negativa. Es -- así que algunos treponematosos clínicamente reconocibles, bien sea por evolución espontánea o por efecto del tratamiento, pueden ser reagina negativos. En promedio de cada 100 treponematosos en cualquier periodo, tratados o no tratados, sólo 85 dan -- resultados positivos, lo que constituye la "sensibilidad", de las reacciones con antígenos no treponémicos.

La elección de un método para pruebas de sífilis debe basarse en la sensibilidad y la especificidad satisfactorias, -- debe ser reproducible y de fácil ejecución. Varios estudios han demostrado que la reacción de VDRL en lámina cumple con los anteriores requisitos y es por lo tanto la reacción más extendida en el mundo y adoptada oficialmente en los laboratorios de Salu

bridad de la República de México y como reacción básica en la medicina institucional IMSS e ISSSTE, así como prácticamente en la totalidad de los laboratorios privados.

En caso de evolución espontanea, después de dos años, los mecanismos inmunológicos hacen que los treponemas sean aniquilados o reducidos a un mínimo quedando sólo en los tejidos - muy diferenciados escasos en células mesenquimatosas formadoras de anticuerpos. Disminuye por ello el título de reagina lenta y espontáneamente, pero a veces transcurre el resto de la vida -- sin que llegue a desaparecer por completo, a este fenómeno se le conoce como "seroresistencia".

Las indicaciones para el uso de las reacciones con an tígenos treponémicos son:

- 1.- Diferenciar las reacciones "falsas positivas" de las causadas por las treponematosis.
- 2.- Establecer un diagnóstico en un enfermo con evidencia clínica de la enfermedad pero que por el tiempo transcurrido o por el tratamiento da reacciones negativas a las pruebas no treponémicas; en general las reacciones con antígenos treponémicos permanecen reactivas mucho mayor tiempo que las reacciones con antígenos no treponémicos, en el caso de FTA prácticamente no se modifica el resto de la vida.

MATERIAL Y METODOS

Se tomaron muestras de sangre de 40 pacientes con lepra comprobada, que concurren a consulta al Centro Dermatológico Pascua; y de 40 pacientes, internos en el Hospital de Enfermedades Pulmonares de Huipulco con tuberculosis evolutiva y bacterioscopía al Ziehl-Neelsen positiva. Con el suero obtenido de estas muestras se efectuaron en cada uno la prueba de VDRL y la de FTA - ABS.

MATERIAL PARA LA PRUEBA DE VDRL. (Venereal Disease Research Laboratory).

- 1.- Rotador mecánico, ajustable a 180 rpm, que circunscriba círculos de 4 cm de diámetro en un plano horizontal.
- 2.- Aparato para hacer anillos de parafina de aproximadamente 15 mm de diámetro.
- 3.- Aguja hipodérmica.
- 4.- Placas de 5 x 7 cm, con 12 anillos de parafina o cerámica de aproximadamente 15 mm de diámetro,
- 5.- Jeringa de 5 ml .
- 6.- Frasco de vidrio de 30 ml, con tapón esmerilado o de plástico, boca angosta, de aproximadamente 35 mm de diámetro, de fondo interior plano.
- 7.- Pipetas de 1 ml.

REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE VDRL:

ANTIGENO.

El antígeno para este ensayo es una solución alcohólica conteniendo 0.03% de cardiolipina, 0.9% de colesterol y canti

dad 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, y 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 las pipetas. Desechar cualquier frasco de antígeno en que haya ocurrido la precipitación.

COMO PREPARAR EL SUERO

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

COMO PREPARAR LA SOLUCION SALINA

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

Formaldehido neutro	0.5 ml
Fosfato sódico secundario ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).	0.093 g
Fosfato potásico primario (K_2PO_4).	0.170 g
Cloruro sódico	10.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

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

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

COMO PREPARAR LAS PLACAS

Usar placas de vidrio (5 x 7 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 enjuagados, y entonces preparadas 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.

COMO PREPARAR LA EMULSIÓN DE ANTIGENO.

1.- 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.

2.- 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 tarde 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.

3.- Soplar por la pipeta para expeler la última gota del antígeno sin que la pipeta toque la solución salina.

4.- Continuar girando el frasco por 10 segundos más.

5.- Añadir 4.1 ml de solución salina amortiguada con una pipeta de 5.0 ml.

6.- Tapar el frasco y agitar vigorosamente durante 10 segundos, de manera que el contenido del frasco choque alternativamente con el fondo y el tapón.

7.- La emulsión del antígeno está ahora lista para usarse. Esta cantidad (5.0 ml) es suficiente para efectuar aproximadamente 250 reacciones serológicas.

8.- Para preparar de una sola vez una cantidad doble de emulsión de antígeno, emplear un frasco de 30 ml y usar cantidades dobles del antígeno y de la solución salina. Si se necesita más emulsión del antígeno, hacer varias mezclas separadas que

pueden combinarse y usarse en la reacción.

COMO ENSAYAR LA AGUJA USADA CON LA EMULSION ANTIGENICA

El número de partículas del 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 de 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 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.

ENSAYO PRELIMINAR DE LA EMULSION ANTIGENICA

Cada preparación de la emulsión antigénica debe ser examinada cuidadosamente, ensayandola con sueros positivos y ne

gativos conocidos. Añadir una gota de la emulsión antigénica a 0.05 ml de cada suero y proceder del modo descrito bajo REACCION 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.

REACCION CUALITATIVA CON SUERO

1.- Con una pipeta depositar 0.05 ml del suero inactivado en un círculo de parafina de la placa.

2.- Añadir una gota (1/60 ml) de la emulsión antigénica a cada círculo con suero.

3.- Agitar las placas por cuatro minutos, con movimiento rotatorio (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.

4.- 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.

COMO LEER E INTERPRETAR LOS RESULTADOS DE LAS REACCIONES

Las reacciones se deben leer microscópicamente, con un objetivo a seco débil (10 X), a una amplificación de 100 X (ocular 10 X). 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

Sin grumos o con leve grado de aspereza	NEGATIVO	(N)
Grumos pequeños	POSITIVO DEBIL	(PD)
Grumos medianos y grandes	POSITIVO	(P)

Una cantidad excesiva de reagina 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 bastante uniforme, y la experiencia demostrará la diferencia entre esta reacción y las reacciones a típicas en las cuales aparecen grumos grandes y/o pequeños mezclados con las partículas del 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 que con el suero sin diluir, se considera esa como el resultado del en-

sayo. 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 traspasarlo 0.1 ml al segundo tubo.

REACCION CUANTITATIVA CON SUERO

Las reacciones cuantitativas se efectuan 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 REACCION 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 6 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 6 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 REACCION CUALITATIVA CON SUERO.

COMO LEER E INTERPRETAR LAS REACCIONES CUANTITATIVAS

1.- Las reacciones se leen microscópicamente a un aumento de 100 X de la manera descrita para el procedimiento cualitativo.

2.- Se reportan los resultados en términos de la mayor dilución serológica que produce una reacción positiva franca (NO POSITIVA DEBIL).

MATERIAL PARA LA PRUEBA DE FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Anti-
body Absorption Test on Serum).

- 1.- Incubadora, ajustable a 35^o-37^oC.
- 2.- Microscopio de fluorescencia con condensador de campo oscuro
- 3.- Papel absorbente
- 4.- Lápiz con punta de diamante (opcional)
- 5.- Plantilla, usado para grabar círculos de 1.0 cm de diámetro interior sobre laminillas de vidrio (opcional)
- 6.- Tabla para colocar las laminillas
- 7.- Cámara húmeda. Colocar un papel humedecido en la cubierta de la cámara para colocar las laminillas.
- 8.- Asa bacteriológica de platino, estandar de 2 mm, calibre 26
- 9.- Aceite de inmersión de baja fluorescencia (Cargille tipo A)
- 10.- Laminillas para microscopio de 1 x 3 pulgadas, aproximadamente de 1 mm de espesor.
- 11.- Cubreobjetos
- 12.- Cubetas de vidrio o plástico con portaplacas removible.

REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE FTA-ABS

ANTIGENO DE TREPONEMA PALLIDUM

a) El antígeno para la prueba de FTA-ABS es una suspensión - de *T. pallidum* (cepa Nichols) extraída de tejido testicular de conejo. El extracto debe contener un mínimo de 30 organismos -- por campo a seco débil. El antígeno puede conservarse de 6^o a - 10^oC ó liofilizado.

b) Conservar el antígeno liofilizado a 6^o-10^oC y rehidratarlo para usarlo de acuerdo a las instrucciones adjuntas.

c) Descartar la suspensión de antígeno si desarrolla conta--

minación bacteriana o si no muestra la reactividad apropiada - con los sueros control.

ABSORBENTE PARA FTA-ABS

a) El absorbente es un producto estandarizado preparado de - cultivos de treponemas Reiter. Este puede conservarse en estado líquido o liofilizado.

b) Conservar el absorbente y rehidratarlo si se encuentra lio filizado de acuerdo con las instrucciones adjuntas.

GLOBULINA ANTI-HUMANA MARCADA CON FLUORESCENCIA (CONJUGADO)

a) El conjugado debe ser de calidad aprobada para la prueba - de FTA-ABS. Cada nuevo lote de conjugado se debe probar para de terminar su título y verificar y que no da reacciones inespecíficas su reactividad estandar.

b) Conservar el conjugado liofilizado a 6° - 10° C. Rehidratar el conjugado en cantidades repartidas en alicuotas no menores - de 0.3 ml y conservarlos a -20° C o menos. Para propósitos prácticos, un conjugado con título de 1:400 o mayor puede diluirse 1:10 con amortiguador salino de fosfato (que contiene mertiolato en concentración de 1:5000) antes de guardarse.

c) Cuando el conjugado se descongela para usarse, no se vuel va a congelar pero puede conservarse a 6° - 10° C y puede usarse - mientras muestre reactividad satisfactoria con pruebas controles

d) 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.

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS (PBS), pH 7.2 \pm 0.1

Fórmula por litro:

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

Se pueden preparar varios litros y conservarse en un frasco "Pyrex" o de polietileno. Determinando el pH de cada lote de PBS preparado para la prueba de FTA-ABS. El PBS fuera del rango de pH de 7.2 \pm 0.1 debe descartarse.

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 y enjuagando la pipeta. La solución de Tween 80 al 2% debe tener un pH 7.0-7.2. Verificar el pH periódicamente, pues la solución se puede volver ácida. Esta solución mantiene bien en refrigeración; descartarla si se desarrolla precipitado o si cambia el pH.

MEDIO DE MONTAJE

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

ACETONA (R. A.)

COMO PREPARAR LAS PLACAS DE ANTIGENO DE T. PALLIDUM

1.- Homogenizar la suspensión de antígeno bien con una pipeta que contenga un bulbo de hule y absorbiendo y expeliendo la suspensión de la pipeta por lo menos 10 veces para romper los acúmulos de treponemas y asegurar una distribución uniforme de treponemas. Determinar por examen en campo oscuro que los treponemas están adecuadamente distribuídos antes de hacer las placas para la prueba de FTA. Se puede requerir una mezcla adicional.

2.- En placas limpias, 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.

3.- Extender una asada de antígeno de T. pallidum en cada círculo usando un asa de platino estandar de 2 mm calibre 26.- La experiencia con lotes individuales del antígeno pueden indicar que cantidad de antígeno, si mayor o menor, se deben extender en cada círculo. Dejarlas secar al aire por lo menos 15 minutos.

4.- Fijar las extensiones en acetona por 10 minutos y dejarlas secar enteramente al aire (No se deben fijar más de 60 laminillas con 200 ml de acetona). Conservar las extensiones fijadas con acetona a -20°C o menos. Las extensiones fijadas y congeladas pueden usarse indefinidamente, con tal que se obtengan resultados satisfactorios con los controles. No se deben volver a guardar en congelación las placas que ya se han sacado.

COMO PREPARAR LOS SUEROS

Nota: La contaminación bacteriana o un exceso de hemólisis pue-

den ocasionar que los sueros no sean satisfactorios para la - - prueba.

1.- Calentar los sueros de prueba y los controles a 56°C por 30 minutos antes de la prueba.

2.- Los sueros ya calentados previamente deberan calentarse por 10 minutos a 56°C el día de la prueba.

CONTROLES

Conservar y usar los sueros controles de casas comerciales de acuerdo con las instrucciones adjuntas. Incluyendo los siguientes controles en cada prueba que se corra:

1.- Control Reactivo (4+)

Suero reactivo o una dilución del suero Reactivo que muestra fuerte fluorescencia (4+) cuando se diluye 1:5 en el absorbente.

a) Usando una pipeta de 0.2 ml y midiendo de la parte inferior de la pipeta, añadir 0.05 ml de suero control Reactivo en un tubo que contenga 0.2 ml de PBS. Mezclar bien, por lo menos 8 veces.

b) Usando una pipeta de 0.2 ml y midiendo de la parte inferior de la pipeta, añadir 0.05 ml de suero control Reactivo en un tubo que contenga 0.2 ml del absorbente. Mezclar bien, por lo menos 8 veces.

2.- Control Mínimo Reactivo (1+)

Una dilución del suero Reactivo que demuestra un grado mínimo de fluorescencia reportado como Reactivo, para usarlo como estandar de la lectura.

El suero control Reactivo (4+) se puede usar para este control cuando se diluye con PBS de acuerdo con las instrucciones.

3.- Suero control Inespecífico

Un suero inespecífico que se sabe que muestra una reactividad inespecífica de 2+ en la prueba de FTA a una dilución de -- 1:5 o mayor en PBS.

a) Usando una pipeta de 0.2 ml y midiendo de la parte inferior de la pipeta, añadir 0.05 ml de suero control Inespecífico en un tubo que contenga 0.2 ml de PBS. Mezclar bien, por lo menos 8 veces.

b) Usando una pipeta de 0.2 ml y midiendo de la parte inferior de la pipeta, añadir 0.05 ml de suero control Inespecífico en un tubo que contenga 0.2 ml del absorbente. Mezclar bien, por lo menos 8 veces.

4.- Control de uniones Inespecíficas

a) Extensiones de antígeno tratadas con 0.03 ml de PBS

b) Extensiones de antígeno tratadas con 0.03 ml del absorbente.

Nota: Los controles #1, #3 y #4 se incluyen con propósito de -- controlar los reactivos y las condiciones de la prueba. El control #2 (suero control Mínimo Reactivo (1+)) se incluye como un estándar de lectura. Si se observa una disminución gradual de -- la fluorescencia en los controles reactivos en un periodo de -- tiempo, esto puede indicar un deterioro de los sueros control, -- reactivos o de la fuente luminosa.

ILUSTRACION DE UN PATRON DE CONTROLES

	REACCION
Control Reactivo:	
a) dilución 1:5 con PBS	R4+
b) dilución 1: con absorbente	R(4+-3+)

Control Mínimo Reactivo (1+):	R1+
Suero control Inespecífico:	
a) dilución 1:5 con PBS	R(2+-4+)
b) dilución 1:5 con absorbente	N
Control de uniones inespecíficas:	
a) antígeno, PBS y conjugado	N
b) antígeno, absorbente y conjugado	N

Las pruebas en las cuales no se obtengan estos resultados de los controles no se deben considerar satisfactorios y no se deben reportar los resultados.

PRUEBA FTA-ABS EN SUEROS

- 1.- Identificar las laminillas previamente preparadas numerándolas en los extremos.
- 2.- Numerar los tubos correspondientes a los sueros control-que se van a probar y colocarlos en una gradilla.
- 3.- Preparar las diluciones con absorbente y/o PBS de los sueros controles Reactivo (4+), Mínimo Reactivo (1+) e Inespecífico, de acuerdo con las instrucciones.
- 4.- Pipetear 0.2 ml de absorbente en un tubo de ensaye para cada suero que se prueba.
- 5.- Usando una pipeta de 0.2 ml y midiendo de la parte inferior de la pipeta, añadir 0.05 ml del suero problema calentado en el tubo de ensaye correspondiente y mezcle 8 veces.
- 6.- Cubrir las extensiones de antígeno correspondientes con 0.03 ml de las diluciones de los sueros Reactivo (4+), Mínimo Reactivo (1+) e Inespecífico.

7.- Cubrir las extensiones de antígeno correspondientes con 0.03 ml de PBS y 0.03 ml del absorbente para los controles de uniones inespecíficas a y b, respectivamente.

8.- Cubrir las extensiones de antígeno correspondientes con 0.03 ml de las diluciones de los sueros problema.

9.- Para evitar la evaporación colocar las laminillas en una cámara húmeda.

10.- Colocar las laminillas en una incubadora a 35°-37°C por 30 minutos.

11.- Procedimiento para lavar las laminillas:

a) Colocar las laminillas en los porta placas con PBS corriente durante aproximadamente 5 segundos.

b) Colocar las laminillas en una cubeta conteniendo PBS por 5 minutos.

c) Agitar las laminillas metiéndolas y sacándolas del PBS por lo menos 10 veces.

d) Usando PBS fresco, repetir los pasos b y c.

e) Enjuagar las laminillas en agua destilada corriente por aproximadamente 5 segundos.

12.- Secar cuidadosamente las laminillas con papel absorbente para quitar todas las gotas de agua.

13.- Diluir el conjugado a su título en PBS que contenga - - Tween 80 al 2%.

14.- Cubrir cada extensión con aproximadamente 0.03 ml del conjugado diluido. Extenderlo uniformemente con una varilla de vidrio sobre la preparación de antígeno.

15.- Repetir los pasos 9, 10, 11 y 12.

16.- Montar las laminillas inmediatamente poniéndoles una pe-

queña gota del medio de montaje sobre cada extensión y un cubre objetos.

17.- Examinar las laminillas tan pronto como sea posible. Si es necesario retardar la lectura guardarlas en la oscuridad y leerlas en las 4 horas siguientes.

18.- Usando iluminación de luz de tungsteno en el microscopio localiza r un campo de la preparación donde se observen treponemas.

19.- Estudiar las extensiones usando iluminación de un arco de mercurio y un objetivo seco de alto poder. Una combinación de filtro excitador BG 12, de no más de 3 mm de espesor (azul), y un filtro de barrera OG 1 (o su equivalente) (amarillo), se ha encontrado que es satisfactoria para el trabajo de rutina.

20.- Usando la laminilla control de Mínimo Reactivo (1+) como un estandar 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>Reporte</u>
2+ a 4+	Moderado a fuerte	Reactivo (R)
1+	Equivalente a control <u>Mínimo Reactivo (1+)</u>	Reactivo (R)
1+	Débil, pero definido, menos que control <u>Mínimo Reactivo</u> . . .	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 ini

cialmente da lectura de 1+ y al volver a probarlo da 1+ o mayor, la prueba se reporta como Reactiva. Todos los demás resultados al volver a hacer la prueba se reportan como Límite (Border). - No es necesario repetir la prueba a los sueros que no presentan fluorescencia.

VARIACIONES A LA PRUEBA DE FTA-ABS

Se tomaron muestras de sangre a 25 personas con sífilis comprobada y cuya prueba de FTA-ABS resultó positiva. Se corrieron simultaneamente con estos mismos sueros:

- 1) Prueba de FTA-ABS variando la temperatura de incubación a -- 56°C y el tiempo de incubación a 5 minutos, en los pasos 10 y - 15 del método descrito anteriormente.

- 2) Prueba de FTA-ABS variando la temperatura de incubación a temperatura ambiente y el tiempo de incubación a 24 horas, en los pasos 10 y 15 del método descrito anteriormente.

Por otro lado se hizo un estudio comparativo en el -- suero de otros 20 pacientes con sífilis comprobada y se corrieron 2 laminillas de cada uno por el método original de FTA-ABS hasta el paso 15.

- 3) Con la primera serie de laminillas se hizo la observación montándolas con fluido de montaje como lo indica la técnica original.

4) Con la segunda serie de laminillas se hizo la observación en seco, sin cubreobjetos y sin fluido de montaje.

RESULTADOS

VARIACIONES A LA TECNICA DE FTA-ABS:

30 min. 37° C	5 min. 56° C	T.A. 24 horas
1.- 1+	Neg	2+
2.- 1+	Neg	2+
3.- 1+	Neg	2+
4.- 1+	Neg	3+
5.- 1+	1+	2+
6.- 1+	1+	1+
7.- 1+	1+	4+
8.- 2+	Neg	2+
9.- 2+	1+	3+
10.-2+	1+	4+
11.-2+	1+	3+
12.-3+	2+	4+
13.-3+	1+	4+
14.-3+	3+	3+
15.-3+	2+	4+
16.-3+	4+	3+
17.-3+	3+	4+
18.-3+	2+	4+
19.-3+	2+	3+
20.-3+	1+	4+
21.-4+	4+	4+
22.-4+	1+	4+
23.-4+	1+	4+
24.-4+	3+	4+
25.-4+	3+	4+

En la incubación de 5 minutos a 56° C: Disminuye la intensidad de la fluorescencia en 72% de los casos; la intensidad es igual en 24% y aumenta en 4%.

En la incubación de 24 horas a temperatura ambiente:-

Aumenta la intensidad en 64% de los casos; la intensidad es igual en 36% y disminuye en 0%.

VARIACIONES A LA TECNICA DE FTA-ABS:

Observación en seco y con fluido de montar.

EN SECO	CON FLUIDO DE MONTAR
1.- Border	Neg
2.- 1+	Border
3.- 1+	1+
4.- 1+	3+
5.- 1+	2+
6.- 2+	1+
7.- 2+	2+
8.- 2+	1+
9.- 2+	3+
10.-2+	Border
11.-2+	4+
12.-2+	2+
13.-3+	3+
14.-3+	2+
15.-3+	2+
16.-3+	1+
17.-3+	2+
18.-3+	1+
19.-4+	4+
20.-4+	3+

En los casos observados con fluido de montar con respecto a los observados en seco: Aumenta la intensidad de la - - fluorescencia en 20% de los casos; la intensidad es igual en 25% y disminuye en 55%.

En los casos observados en seco con respecto a los observados con fluido de montar: Aumenta la intensidad de la flujo

rescencia en 55% de los casos; la intensidad es igual en 25% y disminuye en 20%.

TUBERCULOSIS

VDRL	FTA-ABS
1.- Neg	Neg
2.- Neg	Neg
3.- Neg	Neg
4.- Neg	Neg
5.- Neg	Neg
6.- Neg	Neg
7.- Neg	Neg
8.- Neg	Neg
9.- Neg	Neg
10.-Neg	Neg
11.-Neg	Neg
12.-Neg	Neg
13.-Neg	Neg
14.-Neg	Neg
15.-Neg	Neg
16.-Neg	Neg
17.-Neg	Neg
18.-Neg	Neg
19.-Neg	Neg
20.-Neg	Neg
21.-Neg	Neg
22.-Neg	Neg
23.-Neg	Neg
24.-Neg	Neg
25.-Neg	Neg
26.-Neg	Neg
27.-Neg	Neg
28.-Neg	Neg
29.-Neg	Neg
30.-Neg	Neg
31.-Neg	+
32.-Neg	Neg

33.-1:1	Neg
34.-1:1	Neg
35.-1:2	Neg
36.-1:2	Neg
37.-1:4	Neg
38.-1:4	+
39.-1:64	+
40.-1:64	+

Porcentaje de los resultados obtenidos por VDRL en tu
berculosis:

Total de casos positivos : 22.5%

Casos con título sobre 1:64 = 5%

Casos con título sobre 1:4 = 10%

Casos con título sobre 1:2 = 15%

LEPRA

VDRL	FTA-ABS	Tipo de Lepra
1.- Neg	Neg	Lepromatoso
2.- Neg	Neg	Lepromatoso
3.- Neg	Neg	Lepromatoso
4.- Neg	Neg	Lepromatoso
5.- Neg	Neg	Lepromatoso
6.- Neg	Neg	Lepromatoso
7.- Neg	Neg	Lepromatoso
8.- Neg	Neg	Lepromatoso
9.- Neg	Neg	Lepromatoso
10.-Neg	Neg	Lepromatoso
11.-Neg	Neg	Lepromatoso
12.-Neg	Neg	Lepromatoso
13.-Neg	Neg	Lepromatoso
14.-Neg	Neg	Lepromatoso
15.-Neg	+	Lepromatoso
16.-Neg	Neg	Tuberculoide
17.-Neg	Neg	Tuberculoide
18.-Neg	Neg	Tuberculoide
19.-1:1	Neg	Lepromatoso
20.-1:1	Neg	Lepromatoso
21.-1:1	Neg	Lepromatoso
22.-1:1	Neg	Lepromatoso
23.-1:1	Neg	Lepromatoso
24.-1:1	Neg	Lepromatoso
25.-1:2	Neg	Lepromatoso
26.-1:2	Neg	Lepromatoso
27.-1:4	Neg	Lepromatoso
28.-1:4	Neg	Lepromatoso
29.-1:4	Neg	Lepromatoso
30.-1:4	Neg	Lepromatoso
31.-1:4	+	Lepromatoso
32.-1:4	+	Lepromatoso

33.-1:4	+	Lepromatoso
34.-1:8	Neg	Lepromatoso
35.-1:8	+	Lepromatoso
36.-1:16	Neg	Lepromatoso
37.-1:16	Neg	Lepromatoso
38.-1:16	Neg	Lepromatoso
39.-1:16	+	Lepromatoso
40.-1:16	+	Lepromatoso

Porcentaje de los resultados obtenidos por VDRL en -
lepra:

Total de casos positivos : 55%

Casos con título sobre 1:16 = 12.5%

Casos con título sobre 1:8 = 17.5%

Casos con título sobre 1:4 = 35%

Casos con título sobre 1:2 = 40%

Casos con título sobre 1:1 = 55%

DISCUSSION

El método de los anticuerpos fluorescentes, en relación con VDRL tiene las siguientes ventajas:

- 1.- La sensibilidad de este método sobrepasa a la de VDRL
- 2.- Da un diagnóstico más específico que VDRL
- 3.- Cuando se ha adquirido el equipo necesario y se ha tenido el entrenamiento adecuado resulta rápida y sencilla.
- 4.- No se presentan los fenómenos de prozona como en las reacciones de aglutinación y precipitación.

Entre sus desventajas se encuentran:

- 1.- La inversión inicial para adquirir el equipo de fluorescencia es elevada.
- 2.- Necesita personal adecuadamente entrenado
- 3.- El elevado costo de los reactivos marcados con fluoresceína

En los 40 casos de lepra y tuberculosis estudiados se observan porcentajes de reacciones VDRL positivas similares a los reportados en la literatura. Los porcentajes son más altos en los casos de lepra.

En la lepra de tipo lepromatoso se observó con más frecuencia la positividad de la reacción VDRL, que en la de tipo tuberculoide.

En los sueros de leprosos con reacción VDRL positiva-

no se observaron títulos superiores a 1:16, sin embargo en tuberculosis se encontraron reacciones con títulos hasta de 1:64, pero no se encontraron títulos de 1:8, 1:16 y 1:32, pero si uno con título 1:4.

Los casos de tuberculosis presentaron positivas las reacciones de FTA-ABS 5 sueros y de los casos de lepra 7 enfermos dieron también reacción positiva.

Teóricamente en este estudio deberían haberse obtenido resultados negativos para la prueba de FTA-ABS aplicada a los leprosos y tuberculosos dado que es una reacción inmunológica específica, atribuimos los casos positivos obtenidos por este método a la posibilidad de antecedentes sifilíticos en estos pacientes y que no se encuentran reportados en su expediente.

Se presentaron además unos sueros con reacción negativa de VDRL y positiva de FTA-ABS, que pudo deberse a una sífilis anterior ya curada que conserva anticuerpos específicos contra el *T. pallidum* y se ha vuelto reagina negativa.

De las variaciones a la técnica con respecto al tiempo y la temperatura encontramos:

1) 5 minutos a 56°C: Algunas de las reacciones débiles positivas obtenidas por la técnica original se observan como negativas y en general la intensidad de la fluorescencia disminuye.

2) 24 horas a temperatura ambiente: Esta variación da como ventaja que la intensidad de la fluorescencia aumenta, sin embargo se requieren 48 horas para obtener los resultados y es más difícil leerlas porque las preparaciones se observan sucias.

Por otro lado, de las variaciones hechas para la observación de las laminillas en seco y con fluido de montar, se encontró:

Ambas técnicas dan resultados semejantes con respecto a la intensidad sin embargo observándolas en seco, además de no necesitar cubreobjetos ni fluido de montar se localizan con mayor facilidad los treponemas en campo oscuro con luz de tungsteno. Enseguida cambiando la luz excitadora (filtro BG 12) se observa si hay fluorescencia.

Usando fluido de montar se observó, que se eliminan algunas fluorescencias inespecíficas pero la localización de los treponemas con luz de tungsteno es más laboriosa.

CONCLUSIONES

- 1.- El método de FTA-ABS es más específico para casos de sífilis y sirve para **revelar** las reacciones falsas positivas que se presentan usando el método de VDRL, debidas a otras enfermedades.

- 2.- Se comprobó que la temperatura y el tiempo de incubación - óptimos para la prueba de FTA-ABS, son los descritos en la técnica original.

- 3.- La observación de la fluorescencia es más sencilla y rápida montando las laminillas en seco.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Faget, G.M., and H. Ross: 1944, Evaluation of Positive Kolmer and Kahn Tests in Leprosy. Ven. Dis. Int., 25:133
- (2) Gollerkiri, P., B.B. Gokhda, and S.N. Radane, 1952: Some observations on the behaviour of the Wassermann and Kahn tests in leprosy and tuberculosis. Indian J. Med. Sc., 6:357
- (3) Ruge, H.: 1955, Serologic findings in leprosy and tuberculosis with Wassermann Meinicke and VDRL. Bull. W.H.O. Geneva, 13:861
- (4) Almeida, J., L. Souza Lima and R.P.S. Carvalho, 1955: The value of the quantitative complement fixation test for syphilis in leprosy. S.J. Trop. Med., 4:41
- (5) Gilbert, H., 1950: Contribución al estudio de la sensibilidad y especificidad de las reacciones de Wassermann, Kahn y Mazzini comparadas con las de Rein Bossak y VDRL. Tesis, México.
- (6) Portnoy, J., P. González and J.C. Cutler, 1953: Serologic comparative study of different tests in leprosy in Guatemala. Internat. J. Leprosy, 21:421
- (7) Trespalacios, F., y A. García Otero, 1951: Las reacciones serológicas luéticas en el suero de leprosos. Bol. Soc. Cubana Derm. y Sif., 8:19

- (8) Edmunson, W.F., R. Wocott, S. Olansky and H. Ross, 1954: A clinic-serologic study of leprosy. *Internat. J. Leprosy*, 22:440
- (9) Breña, G. y M. Malacara, 1958: Estudios serológicos en enfermos de lepra. *Dermatología, Revista Mexicana Vol. II* Nums. 1-4
- (10) Niel, G., and A. Fribourg-Blanc, 1960-1962: Quantitative Fluorescent Antibody Tests and the Serology of Cerebro - spinal Fluid.
- (11) Winter, Carrie C. and M.D. Moody, 1959: Rapid identification of specific antiserum with whole cell *Pasteurella pestis* antigen. *J. Infect. Dis.* 104:274-280
- (12) Moody, M.D., and W.L. Jones, 1963: Identification of *Coryne bacterium diptheriae* with fluorescent antibacterial reagents *J. Bacteriol.* 86:285-293
- (13) Thomason, Berenice M., W.B. Cherry, and M.D. Moody, 1957: Staining bacterial smears with fluorescent antibody, III. Antigenic analysis of *Salmonella typhosa* by means of Fluorescent antibody and agglutination reactions. *J. Bact.* 74:523-532
- (14) Sell, S.A., R.S. Sander, and W.J. Cheatman, 1963: *Hemophilus*

influenza in respiratory infection. II. Specific serological antibodies identified by agglutination and immunofluorescent techniques. *Am. J. Dis. Child.* 105:470-474

- (15)Moody, M.D., A.C. Siegel, B. Pittman, and C.C. Winter, 1963: Fluorescent antibody identification of group A streptococci from throat swabs. *Am. J. Pub. Hlth.* 53:1083-1092
- (16)Deacon, W.E., 1961: Fluorescent Antibody Methods for *Neisseria gonorrhoeae* Identification. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 24:349-355
- (17)Deacon, W.E., V.H. Falcone, and Ad. Harris, 1957: A fluorescent test for treponemal antibodies. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 96:477-480
- (18)Goldman, M., and R.E. Kissling, 1958: Fluorescent antibodies staining of smears and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 98:219-223
- (19)Vogel, R.A., and J.F. Padula, 1958: Indirect staining reaction with fluorescent antibody for detection of antibodies to pathogenic fungi. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 98:134-139
- (20)Carver, R.K. and M. Goldman, 1959: Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labelled antibody. III. The reaction

in frozen and paraffin sections. Am. J. Clin. Path.

32:159-164

- (21)Meigel, W., R. Tupath-Barsiske y G. Shierz, 1970: La prueba de inmunofluorescencia-absorción del treponema (FTA-ABS). Especificidad y sensibilidad en comparación con la prueba de inmovilización del treponema. *Das Arztliche Laboratorium*. Año 16, No. 4, Abril.
- (22)Petzoldt, Dr.: El test de absorción FTA en el diagnóstico serológico específico de la lués. *Dermatologische Klinik und Poliklinik der Universität München*
- (23)Pangborn, M.C.: A new serological active phospholipid from beef heart, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 23:1941
- (24)Heitmann, H.J.: Determinación cuantitativa de las inmunoglobulinas en la lués. *Dermatologische Klinik und Poliklinik Essen der Ruhr-Universität Boshum*.
- (25)Breña, G.: Actualización en el serodiagnóstico de la Sífilis. *Gaceta Médica de México*. Vol. 100 No. 9
- (26)Gardner, M.F. y J.L. Backhouse, 1970: Reacciones crónicas biológicas falsas positivas a las pruebas serológicas de la sífilis en donantes de sangre. *Journal of Clinical Pathology* Vol. 23, No. 6, Sept.