

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



**DIAGNOSTICO DE LUES POR AGLUTINACION
DE ESPIROQUETAS**

116

MARIA JOSEFINA REMEDIOS GARCIA AVENDAÑO

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1974



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.

CLAS. Tesis
ADQ. 1974
FECHA
PROC. M. I. ~~115~~ 115



A MIS PADRES

El, que con su inmenso cariño y tenaz esfuerzo hizo posible mi carrera.

Ella, que encauzó mi vida espiritual y moral, y me enseñó el amor al estudio

A MIS TIOS

Ing. Químico Manuel García Carmona y

Tivi Campos de García, a quienes tanto debo

A MI MAESTRA

Q.F.B. Magdalena Acosta Segura, que me dedicó paciencia y comprensión en la realización de mi Tesis.

Al Doctor Santiago Fraga Ortega, Jefe del Laboratorio del Hospital Juárez de la S. S. A., quien orientó los primeros pasos de mi vida profesional.

PRESIDENTE Prof. Magdalena Acosta Segura
VOCAL Prof. Carmen Reyna Bordes
SECRETARIO Prof. Ernestina Ballesteros Rueda
1er SUPLENTE Prof. Socorro Cao Romero Martínez
2° SUPLENTE Prof. Dea Coronado Perdomo

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: HOSPITAL JUAREZ

S. S. A.

SUSTENTANTE María Josefina Remedios García Avendaño

ASESOR Q.F.B. Magdalena Acosta Segura

SUPERVISOR TECNICO Dr. Santiago Fraga Ortega

INDICE

Introducción	1
Capítulo I - Generalidades	3
Capítulo II - Respuésta inmune frente a la infección Luética	10
Capítulo III - Diferentes métodos para el diagnóstico de Lues	13
Capítulo IV - Material y métodos	27
Capítulo V - Resultados y discusión	37
Capítulo VI - Resumen y conclusiones	40
Bibliografía -	43

INTRODUCCION

La Sífilis, a pesar de su antigüedad, de los variados métodos de diagnóstico y del sinnúmero de investigaciones médicas que se han realizado con miras a combatirla, sigue siendo en la actualidad una enfermedad muy extendida en todo el mundo.

Con los estudios hechos a partir de estadísticas obtenidas en varios países, nos damos cuenta que el padecimiento ha presentado incrementos considerables relacionados con momentos históricos críticos. Un ejemplo de ello, son los datos que existen relacionados con la guerra de Vietnam, los cuales muestran que el 28% de la población militar presentaba la enfermedad (Navy Times, -- 1967)⁷.

Es de importancia clínica particular, el hecho de que esta enfermedad en sus primeros estadios, suele pasar inadvertida, lo -- cuál implica en primer término, que si no se descubre y se trata tempranamente, evolucionará llegando a causar lesiones invalidantes e incluso mortales hasta en un 5 a. 10% de los infectados¹²; y en segundo, que debido a la ignorancia de su existencia, se propaga fácilmente, sobre todo en lugares donde existe mayor promiscuidad.

Desde 1906, en que Wassermann efectuó los primeros ensayos serológicos para el diagnóstico de la sífilis, se han venido -- proponiendo infinidad de pruebas encaminadas a este fin; todas ellas han sido aplicadas a diferentes poblaciones, proveyéndonos de datos estadísticos de especial interés. Sin embargo, - existe aún un problema sobre el que se sigue investigando y profundizando, que es el de la especificidad: a pesar de que -- existen tantas pruebas que contribuyen al establecimiento del diagnóstico, un resultado positivo en la mayoría de ellas no puede ser tomado como cierto. Es generalmente recomendable - en estos casos positivos, que se efectúen otras pruebas adicionales, además de tomarse en cuenta también los datos clínicos para concluir un diagnóstico final.

Por todo lo anterior, es interesante y actual el problema del diagnóstico de lúes; todas las técnicas desarrolladas con este fin, han sido estudiadas y comparadas unas con otras, existiendo extensa bibliografía al respecto.

El objetivo del presente trabajo es el de valorar y comparar, los resultados obtenidos en la prueba de Aglutinación de Espiroquetas de Roemer y Schliptkoter considerada como una prueba específica, ya que se usan espiroquetas como antígeno. Esta - prueba se valoró paralelamente con la reacción de floculación en placa del VDRL.

CAPITULO I

GENERALIDADES

RESURGIMIENTO DE LAS ENFERMEDADES VENEREAS

Examinando esquemas mundiales relacionados con el porcentaje de sífilíticos en diversos países, se puede apreciar claramente, como a través de los años se han venido presentando períodos tanto de aumentos muy marcados como de disminución de la casuística, y se ha podido comprobar, como los períodos de resurgimiento están relacionados generalmente con acontecimientos bélicos o catastróficos. (Fig. 1)

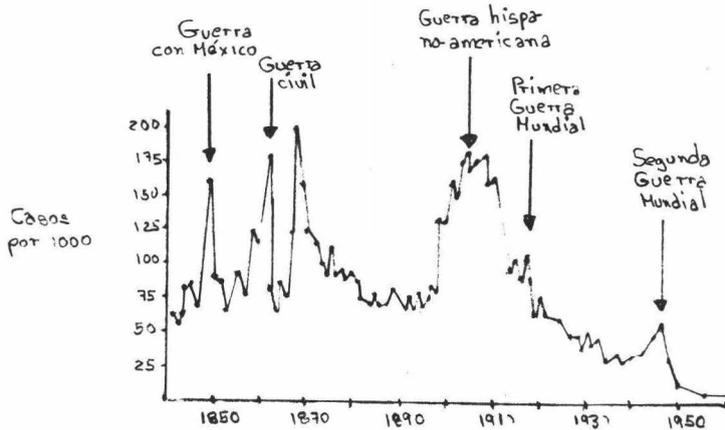


Fig. 1. Evolución de las enfermedades venéreas en la Armada de los Estados Unidos desde 1840 a 1960.

Un hecho de suma importancia y que es necesario evaluar especialmente, es el mostrado por las estadísticas, en donde se ve que a pesar de la clara disminución de casos que se inició a partir de 1950, recientemente hay un considerable aumento. (Fig. 2)

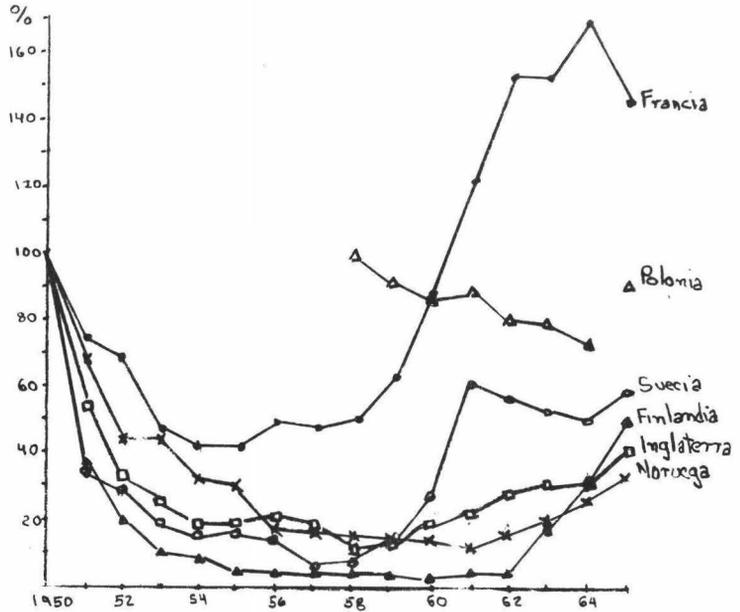


Fig. 2. Casos de infecciones sifilíticas reportados en seis países europeos desde 1950 hasta 1960. Tomando como 100% los casos de 1950.⁷

La trasmisión de la sífilis se lleva a cabo principalmente por contacto sexual, y más raramente por otros contactos. Así, la

conducta sexual influenciada por los cambios religiosos, culturales, morales, etc., está relacionada con los altibajos de la incidencia.

Resulta interesante, analizar brevemente algunos de los aspectos que han tenido que ver con el incremento reciente, aunque cabe aclarar que los datos a nuestro alcance no son siempre, absolutamente válidos, dado que algunos países han prestado poca atención a la recopilación sistemática de los datos; y a que se ha comprobado que por cada caso declarado de sífilis, se diagnostican y se tratan por médicos particulares tres casos más, que no se declaran a las autoridades sanitarias, lo cuál hace imposible una evaluación precisa de la incidencia. Sin embargo, a pesar de las limitaciones expuestas, tal información proporciona una ayuda valiosa a la epidemiología de la enfermedad.

a) Aspectos médicos y de salud pública

En primer lugar analizaremos la influencia que la penicilina ha tenido en tales cambios, siendo éste un punto muy extenso, debido a que dicho antibiótico ha contribuido tanto a disminuir como a incrementar la incidencia de la enfermedad.

Recién descubierta la penicilina, se utilizó en gran escala, no solo para combatir la sífilis, sino otras infecciones, por lo tanto fue el factor primordial que explica uno de los más grandes descensos que se observan en las gráficas después de la Segunda Guerra Mundial. Esto indica que el antibiótico en cuestión es efectivo en el tratamiento contra la infección luética. Sin embargo, como no sólo fue usado por personas con la enfermedad diagnosticada, sino por muchos infectados por otros tipos de bacterias, cabe la sugerencia de que muchos luéticos todavía sin síntomas aparentes se trataron, sin saberlo, contra la sífilis. Esto es, que el decaimiento en el porcentaje de luéticos en la época mencionada se explica en parte como debido al uso extenso y al abuso de la penicilina.

Se puede considerar además el hecho de que los adelantos médicos en el combate contra la sífilis han contribuido al aumento de casos, pues el miedo a la infección que era considerada peligrosa y de largo tratamiento, ha desaparecido gracias al conocimiento de que la terapéutica antisifilítica es fácil y eficaz.

b) Cambios económicos, sociales y de conducta.

Anteriormente se había expuesto ya, el hecho evidente, de que en momentos históricos reconocidos como críticos, bien sean bélicos o catastróficos, hay un indiscutible aumento en el número de individuos luéticos. Analizando un poco más detenidamente el hecho, e intentando identificar causas concretas, con el fin de dar una explicación al fenómeno, nos encontramos con que es importante considerar el estado psicológico del soldado, que sale de su Patria, dejando en ella lo que es suyo, para enfrentarse a una situación de incertidumbre y desesperanza, que lo afecta moral y psicológicamente y le orilla a entregarse irracionalmente a prácticas sexuales sin considerar las graves consecuencias del contagio; éste obviamente, es propiciado por las condiciones económicas que caracterizan las guerras.

Aclarado el incremento de la casuística sifilítica y para continuar dando explicación a los altibajos del fenómeno observado, cabe abordar ahora la fase de descenso característica en los períodos (tardíos) de la postguerra; es natural, que durante este período, en la mayoría de los países, las -

inversiones económicas individuales y colectivas, sean utilizadas, en pro de la reconstrucción y de la rehabilitación, combatiéndose entonces por consecuencia natural, las causas principales que determinan la transmisión luética.

La prostitución, problema vigente en nuestra sociedad actual, - siempre ha sido considerada, como una de las fuentes principales de infecciones venéreas; sin embargo, es un fenómeno que - se resiste extraordinariamente a la extinción. A través de - las diferentes épocas por las cuales ha atravesado la humanidad, la prostitución, considerada por algunos autores como el oficio más antiguo, no ha podido ser eliminada, por el contrario, permanece haciendo estragos de graves consecuencias.

En los últimos años, se ha visto un gran incremento de las enfermedades venéreas entre los adolescentes debido al relajamiento de las costumbres.

Los movimientos de población que se llevan a cabo en gran escala, como el turismo, la migración de los trabajadores, etc., - también contribuyen a la diseminación de la sífilis.

El control de la natalidad que actualmente está llevando a cabo millones de mujeres mediante procedimientos anticonceptivos

ha favorecido las actividades sexuales que llevan al contagio.

CAPITULO II

RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCION LUEITICA

El estudio de la evolución de la sífilis, tanto en pacientes en los diversos estadios de la enfermedad, como en algunos casos de animales infectados experimentalmente, permite afirmar sin lugar a dudas, que en ella juega un importante papel la inmunidad.

Se sabe que existen dos tipos de anticuerpos diferentes en el suero de un paciente sifilítico ¹¹. Uno de ellos, el primero en aparecer es la comunmente llamada "reagina", por no ser un anticuerpo específico, que guarda íntima relación con las gammaglobulinas del plasma (IgG e IgM) y que interviene en las pruebas diagnósticas de fijación de complemento y de flocculación. Ellas aparecen en la sangre del enfermo de tres a seis semanas después de la aparición de la lesión primaria, pudiendo ser demostrables por largo tiempo. Y aunque no confieren inmunidad, su determinación en el paciente es de gran ayuda al clínico, para darse una idea de la efectividad del tratamiento, ya que son afectados por la terapéutica.

La acción de la "reagina" se dirige contra la cardiolipina en los tejidos del huésped productor de anticuerpos. Probablemente sea un autoanticuerpo formado en respuesta a la cardiolipina que se libera de células huéspedes durante la infección.

Además de las "reaginas", demostrables en un período relativamente precoz, el organismo sintetiza también anticuerpos específicos contra las proteínas del germen, aunque en la mayoría de los casos solo permiten el diagnóstico serológico a partir del segundo estadio de la enfermedad¹.

Estos anticuerpos llamados antitreponémicos, pueden actuar como: anticuerpos inmovilizantes, fijadores de complemento, -- aglutinantes, etc.

La demostración de tales anticuerpos puede realizarse con --- Treponema Pallidum cepa Nichols, así como también con Treponema de Reiter, que contiene un componente antigénico común con el T. Pallidum. Estas pruebas treponémicas, entre las que mencionaremos especialmente la de inmovilización de los treponemas de Nelson (TPI), la de fluorescencia (FTA), la de aglutinación de espiroquetas según Roemer y Schlipkoter y la fijación del complemento, desempeñan un papel importante, sobre todo en los

casos en que con los reactivos lipóidicos se obtienen resultados positivos, dudosos o en las pruebas que no concuerdan con la clínica.

CAPITULO III

DIFERENTES METODOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LUES

Además de la historia clínica, el diagnóstico de la sífilis depende en gran parte de los datos del laboratorio. A continuación analizaremos brevemente las pruebas que en el laboratorio se usan con este fin.

METODOS DIRECTOS

Examen en campo obscuro 8,13

Principalmente en el período primario, cuando aparece la lesión llamada chancro y ocasionalmente en el secundario de lesiones cutáneas y gomas, la infección se puede diagnosticar por la investigación directa del Treponema, mediante el examen de las secreciones en fresco en microscopio con condensador de campo obscuro.

El material para estudio se toma por raspado de las lesiones, aunque algunos autores recomiendan que éstas sean exprimidas, y debe ser examinado inmediatamente.

La estructura de espiral regular a modo de sacacorchos, los movimientos lentos rotatorios para adelantar y retroceder y las inclinaciones laterales ayudan en la identificación del Treponema Pallidum.

El resultado negativo del examen en campo obscuro no excluye necesariamente el diagnóstico de sífilis, ya que las lesiones presentes en estadios tardíos pueden contener relativamente pocos organismos.

Método de Fontana Tribondeau³

El microorganismo puede identificarse directamente también haciendo impregnaciones de las secreciones extendidas en un portaobjetos, para ello existen diferentes métodos, de los cuales el más usado es el de impregnación argéntica de Fontana Tribondeau y en general consiste en aumentar el grosor del microorganismo depositando en su superficie sales de plata.

La técnica es la siguiente:

1. Hacer el frotis y sin fijarlo.
2. Lavar gota a gota con líquido de Rouge.
3. Lavar con alcohol, gota a gota e incendiar las últimas gotas sobre el portaobjetos.

4. Cubrir con ácido tánico al 5%, calentando suavemente sin que se deseque.
5. Lavar abundantemente con agua.
6. Cubrir con nitrato de plata amoniacal, calentando hasta emisión de vapores.
7. Lavar abundantemente con agua.
8. Secar y examinar.

Las espiroquetas toman un color cafe obscuro o negro en un campo amarillo.

PRUEBAS SEROLOGICAS

Para una revisión general de estos métodos, los podemos clasificar en dos grandes grupos, de acuerdo con el tipo de antígeno que se emplea en su realización.

1. Antígeno lipoídico. En este grupo tenemos las técnicas que se fundamentan en los fenómenos de floculación y fijación del complemento.
2. Antígeno treponémico. Donde encontramos las pruebas de inmovilización del treponema, aglutinación, hemaglutinación, fijación del complemento e inmunofluorescencia.

PRUEBAS EN LAS QUE SE UTILIZA ANTIGENO LIPOIDICO

Para la realización de estas pruebas, fueron utilizados primero extractos acuosos de tejidos sifilíticos humanos como antígenos, pero pronto se comprobó que podían emplearse con el mismo resultado extractos alcohólicos de tejidos normales de animal. Sin embargo, desde que Pangborn en 1945 aisló la cardiolipina, los antígenos empleados en el serodiagnóstico de lúes, suelen contener, cardiolipina, lecitina y colesterol en proporciones adecuadas. Aunque no se ha descartado totalmente el empleo de antígenos preparados a base de extractos de tejidos animales.

a) Reacciones de floculación.

El fundamento de estas pruebas es la reacción visible que producen las "reaginas" al combinarse con los componentes del antígeno.

Estas reacciones han sido ampliamente adoptadas, porque los antígenos son de fácil obtención, las técnicas son sencillas y muestran una correspondencia aceptable con los datos clínicos.

a-1) Reacciones de floculación a la cardiolipina.

Todas las pruebas que a continuación se mencionan se

parecen en lo fundamental, diferenciándose principalmente en lo que se refiere a los detalles técnicos; la composición del antígeno es básicamente la misma; una mezcla de cardiolipina, colesterol y lecitina en cantidades que varían ligeramente de una técnica a otra y que vienen preparadas comercialmente bastando solo con diluirlas en un amortiguador adecuado.

Prueba de Kline³

Prueba de Mazzini^{1,3}

Prueba de microfloculación según VDRL^{6,1,3}

En estas pruebas se emplea como material biológico suero inactivado o líquido cefalorraquídeo que no deben contener partículas en suspensión.

Se llevan a cabo en placas excavadas, en cuyas cavidades se depositan pequeños volúmenes (generalmente 0.05ml) de problema y se añade un volumen determinado de antígeno, se agitan constantemente durante aproximadamente -- cuatro minutos y se hace la lectura al microscopio con el objetivo de poco aumento (X 100).

Cuando no hay floculación o ésta es sumamente débil, se reporta negativa, cuando aparecen pequeños acúmulos o una floculación franca se consideran como reacciones positivas y si se desea hacer su cuantificación se procede a diluir seriadamente el suero o el líquido cefalorraquídeo y a repetir la reacción con cada dilución para obtener el título.

Son las técnicas que se utilizan en la mayoría de los laboratorios en la actualidad, las ventajas son la rapidez y sencillez de su realización, el empleo de poco material y equipo sencillo y una aceptable sensibilidad y especificidad. El éxito de estas reacciones consiste en el uso de pipetas o bien agujas hipodérmicas perfectamente calibradas, con el fin de que siempre se utilicen los mismos volúmenes tanto de problema como de antígeno.

Prueba de reaqinas en suero no calentado (USR)¹

Prueba rápida de la reagina plasmática (RPR)^{9,3}

Prueba del plasmacrito (PCT)^{1,3}

El material biológico es suero sin inactivar (USR) o - plasma.

Prueba de Hinton³

En este caso usamos como material biológico suero descomplementado.

La técnica consiste en mezclar en un tubo de Hinton (11.25 x 10 mm) 0.5 ml. de problema con el mismo volumen de antígeno, agitar e incubar a 37°C durante 16 horas. La lectura se realiza macroscópicamente, observando los tubos frente a una fuente luminosa, reportando negativas las muestras de los tubos que presentan una suspensión homogénea y positivas aquellas en cuyos tubos se observan flóculos.

La reacción puede hacerse cuantitativa probando en la misma forma diluciones seriadas del problema.

a-2) Reacciones de fijación del complemento.

El fenómeno de fijación del complemento fue aplicado al serodiagnóstico de lúes por Wassermann, y existen muchas modificaciones a esta técnica original, sin embargo, solo mencionaremos la de Kolmer que es la más utilizada.

Prueba de Kolmer^{1,2}

Se utilizan como antígenos los extractos alcohólicos de corazón de ternera o soluciones de cardioplipina con lecitina y colesterol.

La prueba consiste básicamente en mezclar en tubos, diluciones del suero problema descomplementado con determinada cantidad del

antígeno y una cantidad de complemento titulado con toda exactitud, agitar e incubar de 4 a 6°C durante 12 horas para la criofijación del complemento. Posteriormente incubar a 37°C durante 30 minutos y añadir el sistema hemolítico, constituido por el amboceptor anticarnero también titulado y glóbulos rojos de carnero, lavados y ajustados a una concentración determinada, prolongando la incubación hasta que el control del sistema hemolítico muestre lisis total.

Los resultados se interpretan de acuerdo con el siguiente razonamiento: Si los eritrocitos de carnero no se hemolizan, significa que el complemento está ligado al complejo antígeno-anticuerpo y la reacción es positiva. Cuando la reacción es cuantitativa, el título será el tubo de mayor dilución que no presente hemólisis.

Todas las pruebas de fijación del complemento son algo complicadas y es esencial que se sigan estrictamente los procedimientos indicados, que los reactivos se estandaricen cuidadosamente y que se corran testigos: sueros comprobados negativos y positivos, control del sistema hemolítico, del poder anticomplementario del suero y del antígeno y control de glóbulos rojos.

PRUEBAS EN LAS QUE SE UTILIZA ANTIGENO TREPONEMICO

Es muy frecuente en el serodiagnóstico de la sífilis, obtener

reacciones falsas positivas, ya que existen ciertas enfermedades (tablal) en que aparecen anticuerpos antilipoídicos, que darán este tipo de reacciones; esto ha estimulado a los investigadores en este campo al estudio y desarrollo de técnicas más específicas para el diagnóstico definitivo de la sífilis, basándose en la detección de anticuerpos que estén directamente relacionados con el agente causal de la infección, Treponema Pallidum.

AFECCION	PORCENTAJE
Paludismo	90-100
Lepra	60
Inmunización por DPT en niños	20
Mononucleosis infecciosa	20
Lupus eritematoso diseminado	16-20
Linfogranuloma venéreo	20
Vacuna antivariólica	20
Hepatitis infecciosa	10
Periartritis nudosa	10
Artritis reumatoide	5-7
Fiebre reumática	5-6
Neumonía neumocócica	2-5
Resfriado común, embarazo, hemorragia	menos del 1

Tabla 1. Porcentaje aproximado de reacciones falsas positivas y de reacciones dudosas en afecciones no sifilíticas. Según Moore y Mohr (1952)³.

Otros autores mencionan además la tuberculosis, y algunas virosis tales como rubeola y sarampión.

La prueba de inmovilización del treponema de Nelson y Mayer -- (1949) fue la culminación de estas investigaciones, es una prueba altamente específica; sin embargo, desafortunadamente su realización queda reservada a muy pocos laboratorios, ya que las dificultades para mantener las cepas de treponema vivas no permiten su empleo generalizado. Por esta razón se han intentado numerosas modificaciones empleando antígenos treponémicos, Cepa Nichols muertos: Prueba de hemaglutinación, prueba de anticuerpos treponémicos por inmunofluorescencia después de absorber -- los anticuerpos de grupo (FTA-ABS), y treponemas no patógenos cepa Reiter y sus extractos: Prueba de aglutinación de espiroquetas, Prueba de fijación del complemento con la proteína de Reiter.

Prueba de inmovilización de los Treponemas (TPI)

Se funda en la propiedad de los anticuerpos luéticos (inmovilinas) de inhibir los movimientos propios de los treponemas. Para su realización se emplean treponemas de la Cepa Nichols,

obtenidos de testículos de conejo infectado.

El suero de los pacientes, así como los controles tanto positivos como negativos, son sometidos a dilución e incubados a 35°C. A continuación se hacen observaciones en microscopio con condensador de campo obscuro, para determinar el número de treponemas inmóviles, comparando con los controles.

Prueba de hemaglutinación para los anticuerpos de T. Pallidum (TPHA) 14

El antígeno utilizado en esta prueba se prepara a partir de Treponema Pallidum (cepa Nichols) con el cuál se sensibilizan eritrocitos de carnero endurecidos con formol. Las reacciones inespecíficas, debidas tanto a reacciones serológicas cruzadas (otros treponemas) como a antígenos no treponémicos se evitan mediante un tratamiento previo del suero con una substancia absorbente.

El procedimiento consiste en mezclar en una placa de plástico -excavada para hemaglutinación diluciones del suero absorbido y la misma cantidad de una suspensión de eritrocitos de carnero sensibilizados con el antígeno treponémico, dejando la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas. El suero que de una reacción positiva a la dilución de 1:80 se considera positivo.

Es una prueba sencilla, cuya especificidad y sensibilidad son muy aceptables, además del bajo costo de su realización, sin embargo no se ha generalizado por no contarse con antígenos - comercializados.

Investigación de anticuerpos treponémicos por inmunofluorescencia (FTA)^{3,6}

Esta prueba se funda en la demostración de los anticuerpos ligados a la superficie del T. Pallidum, cepa Nichols usando globulina antihumana, obtenida en conejo, marcado con fluoresceína. Para su realización se hace un frotis con T. Pallidum, cepa Nichols que se fija mediante acetona, después se cubre con el suero del paciente a una dilución de 1:200, se coloca en una cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos, posteriormente se lava, se cubre con el suero antihumano conjugado con fluoresceína, incubando nuevamente en las mismas condiciones, se lava se monta con glicerina amortiguada y se observa al microscopio fluorescente, bajo luz ultravioleta. En los casos positivos fluorescen los treponemas recubiertos de anticuerpos.

Prueba de absorción de los anticuerpos treponémicos por inmunofluorescencia (FTA-ABS)^{1,3}

Este método cuyo fundamento es el mismo que el de la prueba FTA, difiere en que primero se absorbe el suero problema con un extracto de Treponema de Reiter lisado por radiaciones ul-

trasónicas y que se conserva liofilizado, al cuál se le designa como "medio de absorción". Esta absorción elimina los anticuerpos de grupo, con lo que se consigue una reacción específica posterior con la cepa Nichols del T. Pallidum.

En estas pruebas de inmunofluorescencia es de relevante importancia el uso de controles desde los fuertemente positivos hasta los positivos inespecíficos.

Según Bradford (1965), Tuffanelli y colaboradores (1967) y muchos otros, es la prueba treponémica más específica de que se dispone actualmente; debe usarse siempre que sea posible con el fin de distinguir entre la sífilis y las falsas reacciones positivas.

Reacción de aglutinación de espiroquetas

Este método consiste en detectar en el suero anticuerpos aglutinantes de espiroquetas, los cuales se demuestran mezclando suero descomplementado y diluído 1:40 o líquido cefalorraquídeo sin ningún tratamiento previo con una suspensión de espiroquetas de la cepa Reiter muertas, después de incubar la mezcla se podrá distinguir claramente la aglutinación en los casos positivos.

Es una técnica simple y específica, en la que se utiliza poco material que discutiremos ampliamente en el siguiente capítulo.

Prueba de fijación del complemento con la proteína de Reiter⁸

En esta prueba se utiliza la técnica de Kolmer, lo que varía es la naturaleza del antígeno. En este caso el antígeno se prepara cultivando T. Pallidum cepa Reiter en un medio adecuado (modificación del líquido de Brewer al tioglicolato con suero equino). Una vez cosechados y lavados los treponemas se congelan y deshielan repetidamente y se dializan frente a solución salina. Mediante estudios comparativos se ha comprobado que las pruebas que emplean este antígeno protéico en fijación del complemento dan resultados comparables con la prueba de inmovilización del treponema.

CAPITULO IV

MATERIAL Y METODOS

A) REACCION DE MICROFLOCULACION A LA CARDIOLIPINA (VDRL)

Equipo

Agitador ajustable a 180 r.p.m. y que describa un círculo de 1.9 cm. de diámetro en el plano horizontal.

Centrífuga

Baño de agua regulado a 56°C

Material

Frascos de 30 ml. con tapón de vidrio

Pipetas de 0.1 ml., 1.0 ml. y 5.0 ml.

Gradillas

Placas excavadas

Tubos de 13 x 100

Reactivos

1. Antígeno. Es una solución alcohólica con 0.3 mg/ml. - de cardiolipina, 0.9 mg./ml. de colessterina y 2.3 mg/ml. de lecitina. El antígeno debe conservarse en el recipiente original, bien cerrado a temperatura ambiente.

2. Líquido para la dilución del antígeno.

Formaldehido neutro puro	0.5 ml.
Fosfato sódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$)	0.093 g.
Fosfato potásico (KH_2PO_4)	0.170 g.
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0 g.
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml.

El pH debe ser de 6.0 ± 0.1

3. Solución salina isotónica de NaCl al 0.85%

4. Solución de cloruro de sodio al 10%

Preparación de la suspensión del antígeno

Al preparar la suspensión del antígeno hay que seguir exactamente las instrucciones, ya que cambios leves pueden conducir a considerables variaciones; sobre todo si las diluciones no se realizan correctamente, pueden formarse suspensiones gruesas, que en ciertas circunstancias conducen a resultados falsos.

1. Verter 0.4 ml. del diluyente sobre el fondo de un frasco de 30 ml. con tapón de vidrio.

2. Añadir directamente, por goteo, 0.5 ml. de antígeno sobre el diluyente, aproximadamente en 6 segundos, moviendo el frasco en círculos de unos 5 cm de diámetro, sobre

- una superficie plana. La pipeta no debe entrar en contacto con el líquido de dilución.
3. Añadir 4.1 ml. de diluyente.
 4. Agitar unas 30 veces haciendo que la mezcla choque alternativamente con el fondo y el tapón.
 5. La suspensión del antígeno, según recomiendan los fabricantes, debe prepararse el día de trabajo, aunque se ha sabido de estudios que prueban que su estabilidad es mayor si se guarda en congelación.
 6. Antes de emplearla, hay que mezclarla cuidadosamente, lo cuál no debe realizarse por aspiración y expulsión a través de la aguja, sino agitando el frasco.
 7. La suspensión de antígeno preparada debe ser comprobada con sueros de reacción conocida (positivo, debilmente positivo y negativo). No deben utilizarse suspensiones poco sensibles.

PRUEBA VDRL EN SUERO

Suero

Los sueros problema, que no deben contener partículas en suspensión se inactivan en baño de agua a 56°C, durante 30 minutos. Los que no sean usados después de 4 horas de la inactivación, deben calentarse nuevamente a 56°C durante 10 minutos.

Método

I. Prueba cualitativa

1. Con la pipeta de 0.1 ml. se coloca sobre una de las excavaciones de la placa de vidrio 0.05 ml. de suero inactivado.
2. Con la aguja hipodérmica se añade una gota de suspensión de antígeno (0.02 ml.).
3. Se agita durante cuatro minutos.
4. La lectura se hace inmediatamente al microscopio con aumento de 100X.

Interpretación:

Positivo Conglomerados medianos y grandes

Débilmente Positivo Conglomerados pequeños

Negativo Partículas diseminadas uniformemente

Fenómeno de zona.

Con un exceso de anticuerpos se produce el llamado fenómeno de zona, consistente en la presentación de reacciones relativamente débiles con flóculos irregulares. En casos extremos, este fenómeno puede conducir a reportar reacciones débiles positivas en sueros fuertemente positivos, en estos casos se recomienda una valoración cuantitativa.

II. Prueba cuantitativa

Todos los sueros francamente positivos o con reacciones débil-

mente positivas deben ser valorados cuantitativamente para determinar su título. Para ello se procede a diluir seriadamente el suero problema de la siguiente manera:

Añadir 0.2 ml. de solución salina isotónica en una serie de tubos numerados del 1 al 6. Añadir al tubo número 1, 0.2 ml. del suero problema, mezclar perfectamente y de esta dilución, 1:2 transferir 0.2 ml. al tubo marcado con el número 2 en donde - después de mezclar perfectamente resultará el suero diluido 1:4, de esta mezcla transferir 0.2 ml. al siguiente tubo y así sucesivamente hasta la dilución 1:64 del tubo 6. Si se tiene que seguir diluyendo, se agregarán todos los tubos necesarios.

Cada una de estas diluciones se prueba en la misma forma que se probó el suero sin diluir en la prueba cualitativa. Se considera como el título la mayor dilución del suero que proporcione un resultado positivo (no débil).

PRUEBA VDRL EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

Dilución de la suspensión de antígeno

La suspensión de antígeno preparada según se describió anteriormente se diluye a partes iguales con solución de cloruro de sodio al 10%, mezclando con ligera rotación e inclinación y dejándola reposar un mínimo de 5 minutos, pero no más de dos horas,

antes de utilizarla.

Controles

En lugar de muestras de líquido cefalorraquídeo positivas pueden utilizarse sueros positivos diluidos convenientemente en solución salina isotónica.

Líquido cefalorraquídeo

El líquido cefalorraquídeo se emplea después de centrifugación, pero sin inactivación previa, no son apropiadas las muestras turbias o que contienen sangre.

Método

I. Prueba cualitativa

1. Colocar 0.05 ml. de líquido cefalorraquídeo en una placa de vidrio.
2. Colocar también sueros control positivo, debilmente positivo y negativo, a la dosis de 0.05 ml. de cada uno.
3. Se añade a cada uno una gota de suspensión de antígeno con una aguja hipodérmica ajustada.
4. Agitar las placas de vidrio durante 8 minutos.
5. Leer inmediatamente a 100 aumentos y valorar en la misma forma que se describió para el suero.

II Prueba cuantitativa

Se procede en la misma forma que para el suero

B) REACCION DE AGLUTINACION DE ESPIROQUETAS SEGUN ROEMER
Y SCHLIPKOTER

Equipo

Centrífuga

Baños de agua regulados a 62°C y a 37°C

Material

Tubos de 13 x 100 mm

Tubos de 5 x 80 mm

Pipetas de 0.1 y 1.0 ml.

Reactivos

1. El antígeno de espiroquetas según Roemer y Schlipkoter es una suspensión de espiroquetas muertas de la cepa Reiter y se puede usar para la investigación de anticuerpos aglutinantes en suero o líquido cefalorraquídeo. Lleva como conservador formalina en una concentración de 0.005/ml.
2. Solución amortiguadora para aglutinación de espiroquetas, que contiene:
Cloruro de sodio 30 g.
Solución amortiguadora de fosfatos 15 mg pH 7 100 ml.

Agua destilada 900 ml.

Debe reposar durante algunos días antes de su empleo.

PRUEBA DE AGLUTINACION DE ESPIROQUETAS EN SUERO

1. El suero se diluye 1:40 con la solución amortiguada y se inactiva durante 30 minutos a 62°C.
2. Colocar en los tubos de 5 x 80 mm, 0.2 ml. de suero diluido e inactivado. En un tubo de control medir la misma cantidad de solución amortiguada.
3. Añadir una gota (0.04 ml.) del antígeno de espiroquetas, después de agitar perfectamente la suspensión.
4. Agitar para conseguir una mezcla homogénea de antígeno y suero.
5. Dejar los tubos durante dos horas a una temperatura de 37°C y una hora a temperatura ambiente, evitando su agitación.

Interpretación:

El resultado de la reacción se enjuicia según la intensidad de la aglutinación y el aspecto del sobrenadante.

Fuertemente positiva Aglutinación macroscópica que al término de la reacción se deposita en el fondo de los tubos formando un sedimento denso, el sobrenadante estará completamente claro.

Positiva	Aglutinación en grumos pequeños apreciables a simple vista, el líquido sobrenadante estará ligeramente opalescente. En casos dudosos se recomienda usar una lente de aumento.
Negativa	Suspensión homogénea

PRUEBA DE AGLUTINACION DE ESPIROQUETAS EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

No es necesario inactivar el líquido cefalorraquídeo y se emplea sin diluir, siguiendo los mismos pasos que se describen en la prueba en suero.

CAPITULO V

RESULTADOS

La prueba de aglutinación de espiroquetas de Roemer y Schlipkoter fue realizada en 100 muestras de sueros que habían resultado positivas a diferentes diluciones con la prueba de microfloculación en placa según VDRL y en 28 muestras que con la misma prueba resultaron negativas. Además en tres líquidos cefalorraquídeos negativos también.

Los resultados obtenidos se encuentran registrados en la tabla de la página siguiente:

NUMERO DE MUESTRAS	VDRL	AGLUTINACION DE ESPIROQUETAS
3 L.C.R.	negativo	negativo
28 sueros	negativo	negativo
4 sueros	positivo 1:1	positivo fuerte
34 sueros	positivo 1:1	positivo
7 sueros	positivo 1:1	negativo
5 sueros	positivo 1:2	positivo fuerte
16 sueros	positivo 1:2	positivo
4 sueros	positivo 1:2	negativo
2 sueros	positivo 1:4	positivo fuerte
8 sueros	positivo 1:4	positivo
1 suero	positivo 1:4	negativo
4 sueros	positivo 1:8	positivo fuerte
1 suero	positivo 1:8	positivo
1 suero	positivo 1:8	negativo
3 sueros	positivo 1:16	positivo fuerte
2 sueros	positivo 1:16	positivo
1 suero	positivo 1:32	positivo fuerte
1 suero	positivo 1:32	positivo
1 suero	positivo 1:32	negativo
3 sueros	positivo 1:64	positivo fuerte
1 suero	positivo 1:64	positivo
1 suero	positivo 1:64	negativo

DISCUSION

En la mayoría de las muestras se observó una concordancia en cuanto a resultados positivos (85%), sin embargo no se encontró concordancia en el grado de positividad, esto se explica fácilmente, ya que los anticuerpos que detecta cada prueba son distintos y aparecen en el paciente en diferentes estadios de la enfermedad. Los primeros en aparecer son las "reaginas", pero tienden a desaparecer cuando surgen los anticuerpos treponémicos.

Hubo 15 muestras que a pesar de haber reaccionado positivamente en la prueba de microfloculación VDRL, dieron con la prueba de aglutinación de espiroquetas una reacción negativa. En estos casos se consultaron los expedientes encontrándose solo en uno de los casos antecedentes familiares luéticos, los otros 11 pacientes negaron que los hubiera habido. Cuatro expedientes no pudieron ser localizados. Esto demuestra una mayor especificidad en la prueba de aglutinación de espiroquetas.

CAPITULO VI

RESUMEN

1. Se hace un breve estudio sobre las causas que han determinado el incremento de luéticos observado en los últimos años, haciendo énfasis en la importancia de hacer el diagnóstico a tiempo, con el fin de evitar las complicaciones que esta infección puede producir de no ser combatida.
2. Se mencionan someramente los métodos de diagnóstico que más se han utilizado, indicando sus ventajas y desventajas.
3. Se describen detalladamente las técnicas empleadas en el estudio de las 131 muestras que se realizó en este trabajo.
4. Se reportan los resultados obtenidos, recalcando el hecho de que hubo una discrepancia entre los resultados obtenidos por los métodos empleados, lo cuál se trata de explicar.

CONCLUSIONES

1. Observando la tabla de resultados encontramos una concordancia de 85%.
2. También se puede apreciar que se encontraron 15 casos que con VDRL nos daban una reacción positiva, no siendo así - con la prueba de aglutinación de espiroquetas, y revisando después los expedientes de dichos pacientes, en los que no encontramos sintomatología ni antecedentes de lués, llegamos a la conclusión de que la prueba de aglutinación de espiroquetas es mucho más específica, lo que se explica - por el empleo de un antígeno treponémico.
3. De entre las pruebas que emplean antígenos treponémicos es la más sencilla, ya que no requiere de material especial ni de equipo complicado y se efectúa fácilmente dando un resultado de lectura macroscópica evidente.
4. Es una reacción de bajo costo, ya que el costo por prueba es de \$1.95.
5. Se considera que la prueba VDRL es muy satisfactoria como método de escrutinio y por lo demostrado en este estudio se debe complementar con la Aglutinación de espiroquetas en los siguientes casos:
 - a) En todos los casos positivos y dudosos por VDRL.
 - b) En los casos de discrepancia con la clínica

6. Por la naturaleza del antígeno empleado, cepa de Reiter, no se puede considerar que sea la más específica, ya que FTA-ABS es la prueba más específica que hay.

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

1. Ballus y Roca, M., W. Becker, H. Damaske, F. Hoyer, E. Kaiser y K. Storiko. 1971. Cuadernos de Laboratorio para el Diagnóstico Médico No. 5. Edit. Hoechst Ibérica, España, 3.
2. Bray, W.E. 1953. Sinópsis de los Métodos Bioquímicos de Laboratorio. UTEHA. 2a. Ed. México. 349.
3. Davidsohn, I. y J.B. Henry. 1973. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. SALVAT Editores S. A. 5a. Ed. España. 806, 1960.
4. Davis, B.D., R. Dubbecco, H.R. Eisen, H.S. Ginsberg y W. B. Wood, 1971. Tratado de Microbiología. SALVAT Editores S.A. 5a. Ed. España. 898.
5. Harris, A., A.A. Rosemberg and E.R. Del Vecchio. 1948. A Macroflocculation Test for Syphilis using Cardioli-pin-Lecithin Antigen. J. Vener. Dis. Inform. 29, 313.
6. Harris, A., A.A. Rosemberg and E.R. Del Vecchio. 1948. The VDRL Slide Flocculation Test for Syphilis. II. A Supplementary report. J. Vener. Dis. Inform. 29, 72.

7. Idsoe, O. and T. Guthe. 1967. The rise and fall of the treponematoses I. Ecological aspects and international trends in venereal syphilis. Brit. J. Vener. Dis. 43, 227.
8. Levinson, S.A. y R.P. Macfate. 1962. Diagnóstico Clínico de Laboratorio. Editorial El Ateneo. 2a. Ed. Buenos Aires. 781.
9. Portnoy, J., H.N. Bossak, V.H. Falcone and A. Harris. 1961. Rapid reagin test with unheated serum and new improved antigen suspension. Pub. Health Rep. 76.933.
10. Portney, J. and W. Garson. 1960. New and improved antigen suspension for rapid reagin test for syphilis. Pub. Health Rep. 75, 985.
11. Puccinelli, V. 1952. Plurality of antibodies in syphilitic serum and clinical practice. Brit. J. Vener. Dis. 28, 184
12. Robbins, S.L. 1968. Tratado de Patología. Editorial Interamericana. 3a. Ed. México. 273.
13. Topley, W.E. y G.S. Wilson. 1946. Bacteriología e Inmunidad. Editora Nacional. 2a. Ed. México. 1007.
14. Tringali, G. 1970. El test de hemaglutinación utilizando el T. Pallidum patógeno (TPHA) en comparación con otras pruebas serológicas de la sífilis. Annali Sclave. 12, 3.