



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DE SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA "DR DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ"
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA"
INFECTOLOGÍA

**PREVALENCIA DE SÍFILIS EN PACIENTES CON
DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR VIH EN EL
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA CMN "LA RAZA"
DE MARZO 2012 A MARZO 2013**

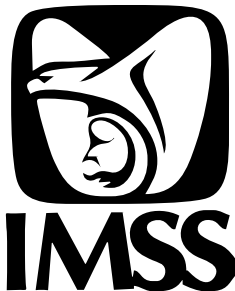
TESIS QUE PRESENTA

DR. EDUARDO BECERRIL VARGAS

PARA OBTENER EL DIPLOMA
EN LA ESPECIALIDAD EN

INFECTOLOGÍA

ASESOR: DR. ALBERTO CHAPARRO SÁNCHEZ



MÉXICO D.F.

AGOSTO 2013



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.

HOJA RECOLECTORA DE FIRMAS

DOCTOR

ELFEGO BAUTISTA CORTÉS

CORDINADOR CLÍNICO DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD

HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA “DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ”

CENTRO MÉDICO NACIONAL “LA RAZA”

DOCTOR

ALBERTO CHAPARRO SÁNCHEZ

INFECTOLOGÍA

MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE INFECTOLOGÍA ADULTOS

HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA “DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ”

CENTRO MÉDICO NACIONAL “LA RAZA”



IMSS

REGISTRO NACIONAL DE TESIS DE ESPECIALIDAD

Delegación	2 NORTE	Unidad de Adscripción	HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA "DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ"	
Autor				
Apellido Paterno	BECERRIL	Materno	VARGAS	Nombre
Matricula	99387549	Especialidad	INFECTOLOGÍA	
Fecha Grad.	2014	No. de Registro	R-2013-3502-97	

Título de la tesis:

PREVALENCIA DE SIFILIS EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR VIH EN EL HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA CMN "LA RAZA" DE MARZO 2012 A MARZO 2013

Resumen:

La sífilis, enfermedad sistémica causada por el *Treponema pallidum*. Previo a la pandemia del VIH, se logró el control. Sin embargo durante la década pasada, en EU y países Europeos, se reportó un incremento hasta del 50% en el número de casos. Esta nueva epidemia se caracteriza por tasas altas de coinfección con VIH, el 16% de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y el 28% de los hombres con sífilis tienen una coinfección con VIH. Incrementa el riesgo de transmisión y contagio del VIH. En México se ha reportado una disminución de casos, en el mismo periodo. No existen estudios epidemiológicos.

OBJETIVO. Conocer la frecuencia de infección por sífilis en pacientes con VIH atendidos en el Hospital de Infectología CMN La Raza durante el periodo de marzo de 2012 a marzo de 2013

MATERIAL Y METODOS. Estudio retrospectivo, observacional, descriptivo, transversal.

Incluyó pacientes atendidos en el servicio de infectología del Hospital de Infectología CMN "La Raza", durante el periodo de marzo del 2012 a marzo del 2013, con VIH, a los cuales se realizó prueba anticuerpos antitreponema. Se realizó recolección de datos de los expedientes, un análisis descriptivo, se obtuvieron medianas, frecuencias y porcentajes. La frecuencia de coinfección se calculó con la proporción de pacientes con VDRL, anticuerpos antitreponema positivos y manifestaciones clínicas. Se realizó el análisis estadístico con el paquete estadístico SPSS 21.

RESULTADOS: Se encontró una seroprevalencia de anticuerpos antitreponema positivos del 26.7%. De ellos el 20.3% tuvieron VRDL reactivo. De los cuales 18.8% se diagnosticó con sífilis en cualquiera de sus etapas. El mayor número de casos se diagnosticó en etapas latentes.

Palabras Clave: 1) Sífilis 2) VIH 3) ANTICUERPOS ANTITREPONEMA 4) VRDL

Contenido: Páginas 123 Ilustraciones 23

Tipo de Investigación: Clínica

Diseño de estudio: Retrospectivo, trasversal

Tipo de estudio: Observacional

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres:

Alejo Becerril Fuentes

María del Carmen Vargas Reyes,

por su amor, apoyo, confianza, comprensión y por estar ahí en cada momento importante
de mi vida.

A mis hermanos

Rodrigo Becerril Vargas

Ivonne Becerril Vargas

por ser mis amigos y la motivación de mi vida.

Gracias al Dr Alberto Chaparro Sánchez, asesor de este proyecto.

CONTENIDO

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	49
JUSTIFICACIÓN	50
PREGUNTA GENERAL	51
OBJETIVO GENERAL	52
HIPÓTESIS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	54
CRITERIOS DE SELECCIÓN DEL ESTUDIO	66
METODOLOGÍA	67
RECURSOS	68
CONSIDERACIONES ÉTICAS	69
BIBLIOGRAFÍA	101
ANEXOS	
1 CRONOGRAMA	108
2 HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	109
3 CONSENTIMIENTO INFORMADO	112
4 ANEXO 1	113
5 ANEXO 2	112

RESUMEN

PREVALENCIA DE SIFILIS EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR VIH EN EL HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA CMN “LA RAZA” DE MARZO 2012 A MARZO 2013

DR EDUARDO BECERRIL VARGAS

DR ALBERTO CHAPARRO SÁNCHEZ

La sífilis, enfermedad sistémica causada por el *Treponema pallidum*. Previo a la pandemia del VIH, se logró el control. Sin embargo durante la década pasada, en EU y países Europeos, se reportó un incremento hasta del 50% en el número de casos. Esta nueva epidemia se caracteriza por tasas altas de coinfección con VIH, el 16% de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y el 28% de los hombres con sífilis tienen una coinfección con VIH. Incrementa el riesgo de transmisión y contagio del VIH. En México se ha reportado una disminución de casos, en el mismo periodo. No existen estudios epidemiológicos.

OBJETIVO

Conocer la frecuencia de infección por sífilis en pacientes con VIH atendidos en el Hospital de Infectología CMN La Raza durante el periodo de marzo de 2012 a marzo de 2013

MATERIAL Y METODOS

Estudio retrospectivo, observacional, descriptivo, transversal.

Incluyó pacientes atendidos en el servicio de infectología del Hospital de Infectología CMN “La Raza”, durante el periodo de marzo del 2012 a marzo del 2013, con VIH, a los cuales se realizó prueba anticuerpos antitreponema. Se realizó recolección de datos de los expedientes, un análisis descriptivo, se obtuvieron medianas, frecuencias y porcentajes. La frecuencia de coinfección se calculó con la proporción de pacientes con VDRL, anticuerpos antitreponema positivos y manifestaciones clínicas. Se realizó el análisis estadístico con el paquete estadístico SPSS 21.

RESULTADOS.

Se encontró una seroprevalencia de anticuerpos antitreponema positivos del 26.7%. De ellos el 20.3% tuvieron VRDL reactivo. De los cuales 18.8% se diagnosticó con sífilis en cualquiera de sus etapas. El mayor número de casos se diagnosticó en etapas latentes.

**PREVALENCIA DE SIFILIS EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR
VIH EN EL HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA CMN “LA RAZA” DE MARZO 2012 A
MARZO 2013.**

Hospital de Infectología

Centro Médico Nacional “La Raza”

Instituto Mexicano del Seguro Social

INTRODUCCIÓN

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son un problema de salud pública. Incrementan el riesgo de adquisición y transmisión del VIH a través de distintos mecanismos que modifican la susceptibilidad y contagiosidad del huésped. Se ha descrito mayor frecuencia de algunas ITS en pacientes infectados por el VIH^{1,2}.

En muchos países desarrollados, los éxitos en prevención y control de la sífilis se alcanzaron a principios y mediados de 1990, lográndose su control³. Sin embargo, durante los primeros años del Siglo XXI, la incidencia de esta enfermedad presentó un incremento, afectando principalmente a HSH^{4,5}.

La situación epidemiológica en la mayoría de los países de la Unión Europea mostró un descenso progresivo de las ITS hasta principios de la década de los años noventa. Esta tendencia, que coincidió con la expansión de la epidemia VIH/SIDA, se atribuyó entre otros factores, a cambios en los comportamientos sexuales de riesgo en respuesta a las campañas de prevención del VIH realizadas durante estos años. Sin embargo, a partir de 1996 se presentó un incremento de los casos de sífilis y otras ITS en varios países del norte y oeste de Europa, se han descrito numerosos brotes en ciudades norteamericanas

y europeas que afectaron principalmente a jóvenes, HSH, contactos heterosexuales con prostitución y consumidores de drogas⁶.

Se estiman 12 millones de personas infectadas cada año por sífilis. Se distribuye en todo el mundo, siendo en países en vías de desarrollo la principal causa de úlceras genitales. La mayoría de los casos se presentan en el África subsahariana y sureste Asia⁷.

En los últimos años, en México, el Sistema Nacional de Salud, ha reportado una disminución aparente de los casos de sífilis, contrario a los hallazgos de encuestas serológicas, las cuales demuestran la existencia de grupos de alto riesgo portadores del *Treponema pallidum* y de VIH y otras ITS. Lo cual indica la existencia de un enorme subregistro⁸.

1. SIFILIS. DEFINICIÓN Y AGENTE CAUSAL

La sífilis es una enfermedad de transmisión sexual altamente contagiosa, con una amplia variedad de manifestaciones sistémicas, las cuales alternan con periodos asintomáticos, fases de latencia⁹. Causada por la espiroqueta *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*, pertenece a una familia de bacterias en forma de espiral, el Spirochaetaceae (espiroquetas), relacionada con otros treponemas patógenos causantes de enfermedades no venéreas.^{10, 11}

1.1 *T. Pallidum*.

T. pallidum es un parásito obligado. La mayoría de los casos de sífilis se adquiere a través del contacto sexual, directo con las lesiones de personas con sífilis activa primaria o

secundaria. El riesgo de contagio del 50%. Otras formas de contagio, transfusiones y accidentes de laboratorio son menos frecuentes. Es capaz de atravesar la placenta y provocar infección al feto¹².

1.2 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA

T. pallidum es una bacteria miembro de la familia Spirochaetaceae, género Treponema, el cual está conformado por cuatro especies patógenas y seis no patógenas; las especies patógenas son:

T. pallidum subespecie *pallidum* que causa la sífilis venérea;

T. pallidum subespecie *endemicum*, que causa la sífilis endémica o bejel;

T. pallidum subespecie *pertenue* que produce el pian.

Las especies no patógenas se encuentran en la flora normal del tracto digestivo, tracto genital y cavidad oral.

El *T. pallidum* tiene una estructura única, al igual que otras espiroquetas tiene forma de espiral o helicoidal sumamente fina, de 6 a 15 mm de largo y 0,1 a 0,2 mm de ancho (figura 1. A). Formadas por una membrana externas y citoplásmica, como parte de su estructura contienen una capa delgada de peptidoglucanos, flagelos periplásmico, también conocidos como endoflagella, localizados en el espacio periplásmico, los cuales se extienden desde los extremos al centro del organismo. El filamento flagelar está compuesto por una cubierta y una estructura central la cual contiene 4 polipéptidos principales. Otros componentes son los filamentos citoplasmáticos o fibrillas citoplasmáticas, en forma de cinta de 7,0 a 7,5 nm de ancho, los cuales se encuentran a lo

largo del organismo debajo de la membrana citoplasmática y paralelo a los flagelos periplásmico; su función es desconocida (figura 1)^{13,14}.

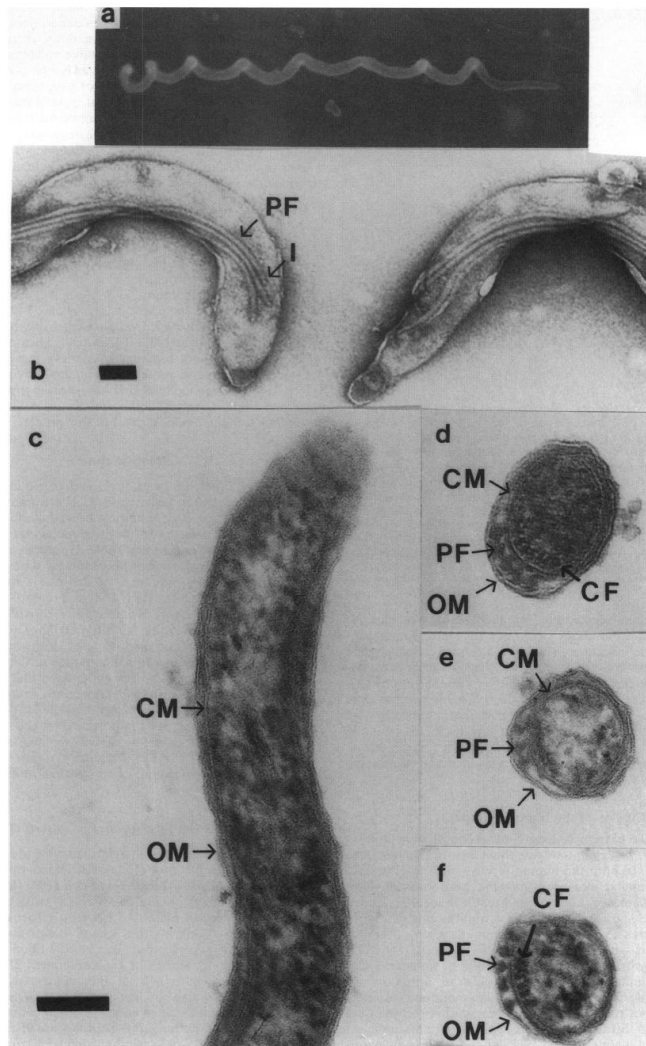


Figura 1. Morfología de *T. pallidum* subespecie. *pallidum*. (A) Microscopía electrónica de barrido muestra la forma de espiral. (B) puntas de dos organismos. Los puntos de inserción (I) de flagelos periplásmico (PF) se encuentran cercanos a los extremos. (C a F) Microscopía electrónica de secciones ultrafinas, muestran la membrana externa (OM), la membrana citoplasmática (CM), los flagelos periplásmico (PF), y la ubicación de los filamentos citoplasmáticos (CF).

El *T. pallidum* se caracteriza por tener una pared celular flexible, rodeando la pared se encuentran microfibrillas. Tapizando a la pared celular y a los endoflagelos, se encuentra

la membrana externa, similar a la estructura de las bacterias Gram Negativas. Esta membrana contiene la mayoría de las proteínas integrales y abundantes lipoproteínas. Se ha demostrado, que a diferencia de otras espiroquetas y bacterias Gram negativas, el *T. pallidum* expresa menor cantidad de proteínas en la superficie de la membrana externa, solo contiene 70 proteínas intramembranas por nm^2 , las cuales tienen tamaño similar, lo que sugiere la escasa diversidad de proteínas (figura 2). La baja expresión de proteínas de membrana, permite evadir la respuesta inmune y explica la persistencia de este microorganismo por largos períodos de tiempo^{15,16,17}.

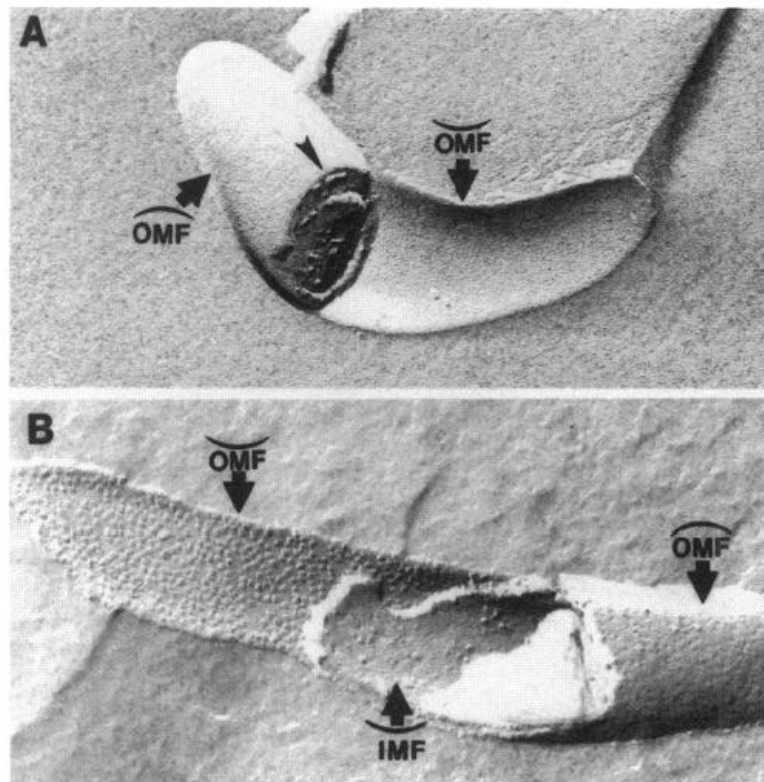


Figura 2. La baja densidad de proteína intramembranas en el membrana externa de *T. pallidum subsp pallidum* (A) en comparación con *Spirochaeta aurantia* (B), demostrado por fractura microscópica por congelación de electrones. Escasas partículas son visibles en la cara interna (OME) y la cara exterior (OMF) de la membrana externa de *T. pallidum*, mientras que una serie casi confluyente de partículas se observan en el exterior membrana de *Spirochaeta aurantia*. Flagelos periplásmico señalados con la punta de la flecha en una cara de fractura a través de la célula de *T. pallidum*.

1.3 FISIOLOGÍA

T. pallidum es un parásito obligado de los seres humanos, es una de las pocas bacterias patógenas que no han sido cultivadas continuamente in vitro. Se utilizan cultivos en testículos de conejos con fines de investigación y diagnóstico. Por mucho tiempo se pensó que era un anaerobio obligado. Sin embargo, es considerado en la actualidad como un organismo microaerófilico, debido los trabajos de Fieldsteel et al. en 1982, quienes lograron el crecimiento de los organismos en cultivos de células epiteliales de conejo en condiciones microaerófilicas. Para su desarrollo requiere un pH de 7.2 a 7.4 y temperaturas de 30 a 37 °C^{18,19}.

Por su naturaleza fastidioso y lento crecimiento in vivo e in vitro, reproducción en 230 h, indican que puede tener limitaciones y requisitos metabólicos aún no identificados^{19,20}.

Es totalmente capaz de metabolizar glucosa y sintetizar DNA, RNA, y proteínas. En el estudio de Gherardini et al. proporciona evidencia de su capacidad para sintetizar al menos algunos aminoácidos²¹.

Es posible que el *T. pallidum* sea dependiente de células huésped para la protección contra los radicales de oxígeno, debido a que la bacteria necesita oxígeno para su metabolismo, pero es altamente sensible a sus efectos tóxicos²¹.

Su motilidad es característica, consiste en una rápida rotación sobre su eje longitudinal.

1.4 GENOMA

El genoma está constituido por un cromosoma único, de forma circular que contiene 1,138,006 de pares de bases. *T. pallidum* posee uno de los genomas más pequeños dentro de los procariotas.

Contiene 52.8% de C-G. Se han identificado 1.041 marcos de lectura abiertos, que representa el 92,9% del ADN genómico total. Pocos de los genes de *T. pallidum* parecen ser específicos de grupo espiroqueta (5%)²².

1.5 POLIPÉPTIDOS DEL *T. pallidum*

Con la finalidad de estandarizar la nomenclatura de los polipéptidos identificados en *T. pallidum* se han desarrollado varias nomenclaturas. Una de las más usadas, utiliza el prefijo TnP (de *T. pallidum* Nichols) seguido de la masa molecular que posee cada una; el gen que codifica cada polipéptido será: *tnp* (en letras minúsculas y cursivas), por ejemplo el polipéptido TnP47 es expresado por el gen *tnp47*. Existe otra denominación para los 12 genes de *T. pallidum* identificados, a los que se le asigna una letra mayúscula correlativa después del prefijo tpr (*T. pallidum repeat*) tprA, tprB, tprC, y así sucesivamente hasta tprL. La familia tpr se divide en subfamilias I, II, y III, correspondiendo a la subfamilia I tprC, D, F, I; a la subfamilia II tprE, G, J; y a la subfamilia III tprA, B, H, K, L. Esta clasificación está en relación a la homología del ADN.

También se ha designado a los polipéptidos flagelares, así tenemos los siguientes polipéptidos flagelares: TpN37a, TpN34.5, TpN33, TpN30, TpN29, y TpN27.5, que están subdivididos en clase A y clase B en función a la secuencia N-terminal o C-terminal de sus aminoácidos. Así TpN37a es una flagelina tipo A, mientras que TpN34.5, TpN33 y TpN30 son las flagelinas FlaB1, FlaB2 y FlaB3, respectivamente.

A las proteínas integrales de la membrana externa se les denominó TROMP (*Treponemal rare outer membrane proteins*), y son un grupo de unas 20 proteínas denominadas principalmente en función a su masa molecular, son las que le dan la virulencia al *T. pallidum* y funcionan como porinas, adhesinas y varias de ellas también como

hemolisinas. Las principales proteínas de la membrana externa son las que tienen 17, 28, 31, 45 y 65 kDa de peso molecular. También son conocidas como Tromp1 (31 kDa.), Tromp2 (28 kDa), Tromp3 (65 kDa) y TmpA (45 kDa). De estas proteínas, son exclusivas de la membrana externa, las de 28 kDa, 31 kDa, y 65kDa, ya que las de 17 kDa y 45kDa también se encuentran en la membrana interna. Las lipoproteínas identificadas son: TpN47, TpN44.5, TpN39, TpN35, TpN29-35, TpN24-28, TpN17 y TpN15. Existen otras proteínas importantes como TpN60 (GroEL o antígeno común) que representa el 6% del total de proteínas del *T.pallidum*, TpN60 presenta reacción cruzada inmunológica con proteínas similares de una gran variedad de bacterias^{23,24}.

1.5 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS POLIPEPTIDOS DEL *T. pallidum*

2.5.1 Proteínas flagelares

Los flagelos periplásmico o endoflagella son, actualmente, los componentes estructurales más conocidos del *T. pallidum*. Los filamentos de los flagelos de la mayoría de las bacterias consisten en polímeros de una sola subunidad polipeptídica^{25,26}.

En contraste, el filamento endoflagelar de *T. pallidum* sub sp. *pallidum* se compone de múltiples polipéptidos dispuestos en una capa externa con un núcleo central. Una composición de proteína similar y ultraestructural se ha descrito en el resto de los *Treponemas* spp²⁷.

Se han descrito 6 polipéptidos flagelares, que corresponde a TpN37a, TpN34.5, TpN33, TpN30, TpN29, y TpN27.5. Se subdividen en clase A y clase B, con base a la secuencia de aminoácidos N terminal, la secuencia génica y su función inmunógena^{28,29}.

TpN37 ha sido clasificados como clase A , mientras que los polipéptidos B son TpN34.5, TpN33 y TpN30 y se nombran FlaBI, FlaB2, y FlaB3, respectivamente.

Estructuralmente tiene un diámetro de 17 nm y se extienden dentro del espacio periplásmico. Dos a cuatro endoflagella se originan en cada extremo. Son de forma helicoidal, una vez liberados de la célula. Cockayne et al. mostraron por inmunomicroscopía que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra FlaA reaccionado con flagelos intactos pero su afinidad o reacción se ve reducida el perder la cubierta externa^{13,14}.

TpN29 y TpN27.5 son dos polipéptidos hallados en algunos treponemas sin embargo su función aun es desconocida.

1.5.2 Composición y ultraestructura de la membrana externa y citoplasmática

La membrana externa del *T. pallidum* ha sido objeto de múltiples estudios de investigación debido a bajo potencial inmunogénico en el organismo. De igual modo la membrana citoplasmática, como sitio de transporte oxidativo y fosforilación, es de interés debido a la compleja fisiología de dicha espiroqueta. Sin embargo aún se desconoce la composición y el contenido proteico de las mismas. Como mencionamos previamente, la membrana externa del *T. pallidum* expresa una baja cantidad de proteínas transmembrana y de tamaño similar, a diferencia de otros treponemas y la mayoría de las enterobactias, por ejemplo *E. coli* exhibe una matriz casi confluyente (6.000 a 10.000 partículas por nm²) de proteínas intramembranas de tamaños diversos. Se cree que dicha escases de proteínas de membrana externa, permiten a la bacteria, evadir la respuesta inmune, debido a la baja reactividad de los anticuerpos y células involucradas en la respuesta inmune^{15,16,17}.

Varias proteínas de unión a fibronectina han sido descritos, algunos de los cuales son propuestos para ser localizada en la superficie y la implicada en la unión de *T. pallidum* a células de mamífero. La genes que codifican dos de estas proteínas, P1 y P2, han sido clonados en *E. coli*. Una de las proteínas de unión a fibronectina (P1) que parece ser la misma que TpN83, es probable que sirva de receptor de fibronectina de superficie. P2 también se ha descrito. Se requieren estudios adicionales para determinar las ubicaciones estructurales de estas proteínas y sus papeles funcionales^{29, 30, 31,32}.

1.5.3 Otros Polipéptidos del *T. pallidum*

Tpnl9, antígeno 4D o también conocido como TPF1 fue una de las primeras proteínas de *T. pallidum* clonados en *E. coli*. La molécula nativa 4D tiene una Mr de -190.000 y consta de un estructura anular 6 nm de diámetro, formada de un polímero de 10 subunidades de 19 kDa idénticos. La secuencia de aminoácidos contiene dos residuos de cisteína, presumiblemente implicadas en la formación de enlaces disulfuro. El anillo estructural de 4D se asemeja al menos superficialmente la de las chaperones GroES, pero no hay similitud de secuencia entre las dos proteínas. Aunque se ha propuesto que se localizan en la superficie, no parece ser una proteína de membrana. Aún se desconoce su función^{33, 34, 35, 36,37}.

TpN60, GroES ó antígeno común, es una de las principales proteínas, tiene un peso de 60-kDa, de las proteínas más abundantes en *T. pallidum*, que representa 6% del contenido total de proteínas. Presenta una reacción cruzada inmunológica con proteínas similares en una amplia variedad de bacterias. Tiene una estructura en anillo.

Estructuralmente, antigénicamente y debido a la similitud de aminoácidos, es homóloga a la proteína GroEL del *E coli*, proteína de choque involucrada en la conservación de proteínas. A pesar de ello el *T. pallidum* parece carecer de una respuesta de choque térmico, debido a una amplificación significativa de TpN60 y a otras proteínas a temperaturas elevadas; hallazgos que correlaciona con la falta de sitios de unión y a la expresión de un promotor que permite una expresión adecuada o mejorada de las proteínas de choque^{33,35,36}.

TpN71 se expresa en cantidades importantes en *T. pallidum*, también es catalogada como proteína de choque. La expresión de este grupo de proteínas es 3 veces mayor en el *Treponema* que en el *E coli*.

La ausencia de respuesta de choque térmico pudiera explicar la naturaleza fastidiosa del *Treponema pallidum*.

1.5.4 Filamentos citoplasmáticos

La evidencia indica que los filamentos citoplasmáticos de *T. pallidum* se componen del polipéptido TpN83. Se componen de un único polipéptido con un Mr de 82000. Parece probable que TpN83 es la subunidad de los filamentos citoplasmáticos de *T. pallidum*. La función de estas estructuras aún no se conoce, pero su estrecha yuxtaposición a los flagelos periplásmicos sugiere que puedan servir para la motilidad³⁷.

1.5.5 Proteínas de unión a penicilina

Las proteínas de unión a penicilina parecen estar asociados con la membrana citoplasmática y están probablemente involucradas en la síntesis de peptidoglucanos³⁸.

1.5.6 Las proteínas extracelulares.

Stamm et al. encontraron 4 polipéptidos de bajo peso molecular. Estos polipéptidos de 10.000, 14.000, 15.500, y 17000, fueron radiomarcados en presencia de metionina; su incorporación fue bloqueada por la adición de cloranfenicol, mostrando que las proteínas fueron sintetizadas por treponemas en el sitio de infección de las células huésped. Las proteínas extracelulares estaban presentes en cantidades muy pequeñas pero eran claramente demostrables por radioinmunoprecipitación en el suero del conejo con anti-T. También se han encontrado en humanos pequeñas cantidades. En la actualidad se desconoce la función de estas proteínas identificadas, sin embargo, es posible que dichas proteínas posean actividades enzimáticas o son factores implicados en la invasión o patogénesis³⁹.

2 RESPUESTA INMUNE A LAS PROTEÍNAS DEL *T. pallidum*

El suero humano normal contiene pequeñas cantidades de anticuerpos reactivos contra los antígenos TpN47, TpN33 y TpN30 del *T. pallidum*. En la sífilis primaria y secundaria activa se encuentran anticuerpos de tipo IgM e IgG contra *T. pallidum*, pero IgM disminuye en los estadios tardíos y después del tratamiento^{40, 41}.

Mediante WB de antígenos reconocidos por el suero sífilítico, se ha demostrado que el grado de reactividad es proporcional a la duración de los síntomas. En un modelo en

conejos de la infección por *T. pallidum*, se ha observado la presencia de linfocitos reactivos en el bazo, 3 a 6 días después de la infección. Esta alta respuesta específica al antígeno se mantiene desde el décimo día hasta los 2 años después de la infección, y correlaciona con la infiltración mononuclear progresiva en el sitio primario de la infección. En el sexto día hay respuesta celular a las proteínas de 37 y 30 kDa, en el décimo día hay respuesta a las de 35, 33 y 14 kDa, esta respuesta se mantiene hasta el séptimo mes. En humanos la aparición de células periféricas reactivas a *T. pallidum* ocurre durante la sífilis tardía. Mediante electroforesis de alta resolución SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*), se ha demostrado que el *T. pallidum* posee unos 30 antígenos y mediante electroforesis bidimensional se ha demostrado la presencia de cerca de 60 antígenos, de estos de mayor importancia por su utilidad diagnóstica son las de 47, 37, 35, 33, 30, 17 y 15 kDa^{40,41,42}.

En modelos humanos in vivo, mediante inoculación intradérmica de lipoproteínas de *T. pallidum*, se analizaron las células de las ampollas producidas mediante citometría de flujo, para determinar el infiltrado celular dentro de la dermis. Se observó que las células T reclutadas presentaban marcadores fenotípicos Th1. Mediante marcadores de diferenciación celular (CD83, CD1a), moléculas coestimuladoras (CD80/CD86), y receptores de quimocinas (CXCR4 y CCR5), se determinó que el contenido de las ampollas eran células dendríticas, particularmente una población monocitos altamente activada. En resumen, estos estudios demuestran que los lipopéptidos treponémicos tienen una gran capacidad de inducir inflamación como la que se encuentra en las lesiones de la sífilis temprana, estos agonistas reclutan un infiltrado celular que son puente entre la inmunidad innata y la adquirida^{40, 41}.

Otros investigadores estudiaron biopsias de lesiones sífilíticas primarias y secundarias, mediante técnicas de RTPCR (*reverse transcriptase-PCR*) e inmunohistoquímica, demostrando que el infiltrado celular es predominantemente de macrófagos y en segundo lugar de linfocitos, estos linfocitos son principalmente CD4+ en chancros y CD8+ en lesiones de sífilis secundaria. Las células que infiltran ambos tipos de lesiones contienen ARNm para citocinas Th1, interleucina- 2 (IL-2), interferón gama (IFN- γ), e interleucina-12 (IL-12)^{40,41}.

Mediante WB, se ha observado que las muestras de suero de pacientes con sífilis secundaria y latente tienen anticuerpos reactivos para la mayoría de polipéptidos: TpN47, TpN44.5a, TpN37, TpN34.5, TpN33, TpN30, TpN17 y TpN15. Esta reactividad va disminuyendo en el suero de los pacientes no tratados con sífilis latente tardía (más de 2 años); sin embargo, en sífilis tardía se mantiene alguna reactividad para anticuerpos de tipo IgG. Cuando el tratamiento de la sífilis es exitoso, se observa una disminución gradual de los anticuerpos anti-*T. Pallidum*, particularmente la respuesta para anticuerpos de tipo IgM. En conejos se ha observado que la presencia de anticuerpos contra el antígeno de 45 kDa. (TmpA), correlaciona con resistencia a reinfección por *T. pallidum*.

En cuanto a la familia de genes *tpr*, su heterogeneidad y el hecho que no todas las cepas de *T. pallidum* expresen el mismo repertorio de genes se cree que contribuye a la evasión inmunológica y a la persistencia del *T. pallidum*; además se ha demostrado que las diferentes cepas de *T. pallidum*, expresan repertorios diferentes para proteínas *tpr*. En cuanto a *tprK* se ha observado que es blanco para anticuerpos opsonizantes, por lo que se sugeriría que la inmunización con *tprK* recombinante podría tener cierto efecto protector

^{39, 40,41}.

3. MANIFESTACIONES CLINICAS E HISTORIA NATURAL DE LA SÍFILIS

Las manifestaciones clínicas de la sífilis se dividen en primaria, secundaria, latente y etapa terciaria.

Después de la inoculación y penetración de las mucosas o piel, el *T. pallidum* se multiplica, en un periodo de 2-6 semanas (3 semanas promedio) aparece la lesión inicial. Comienza como una pápula indolora cuya superficie se necrosa y forma una lesión ulcerada, indurada, bien delimitada (chancro), en la cual hay gran cantidad de treponemas. Solo un tercio de los casos de sífilis primaria se presenta con estas lesiones características^{42, 43,44}

Esta etapa a menudo pasa desapercibida, especialmente en las mujeres y HSH; en los que las lesiones aparecen en áreas difíciles de visualizar. Es común la presencia de adenopatías regionales y puede estar asociada con síntomas sistémicos. La etapa primaria tiene una duración variada, de 3 a 90 días.^{45, 46,47}

En la mayoría de pacientes coinfectados por el VIH y sífilis, presentan lesiones de mayor tamaño, profundas y numerosas, así como mayor tiempo de duración.^{42, 43.}

La resolución de las lesiones y eliminación de treponemas son atribuidos a mecanismos mediados por células inmunes. Que promueven la fagocitosis por los macrófagos, los cuales son activados por citocinas liberadas por Linfocitos T. Sin embargo, a pesar de la destrucción de miles de treponemas por dicha respuesta, algunos sobreviven y causan infección crónica^{46, 48}

La sífilis secundaria es resultado de la multiplicación y diseminación de los treponemas. Se produce entre 4 y 10 semanas, 6 meses promedio, después de la curación de la lesión primaria^{46, 47}.

En la población general, esta etapa se superpone a la etapa de la sífilis primaria hasta en un 30 %. Sin embargo, en los pacientes coinfectados por VIH, la superposición se encuentra hasta en un 75%^{43,44}.

Se manifiesta por una amplia gama de signos y síntomas clínicos. La sífilis secundaria se caracteriza por lesiones dérmicas y/o linfadenopatía generalizada asociados a síntomas sistémicos. Puede simular otras condiciones dermatológicas. En el 50 al 80% de los casos se presenta una dermatosis macular de 5-10mm de color rojo o lesiones de color cobre, diseminadas que afecta característicamente palmas y plantas^{43, 44}.

La sífilis puede tomar muchas formas por ejemplo escamosas que asemejan a la psoriasis, pero nunca vesicular. Es frecuente la afección a mucosas, la cual se manifiesta con placas mucosas en la cavidad oral. En el tracto genital se presentan como condilomas planos. La alopecia es otra de las manifestaciones en esta etapa^{43, 44}.

La sífilis secundaria, sin tratamiento, evoluciona a un período denominado sífilis latente, etapa asintomática y diagnosticada sólo a través de pruebas serológicas. La sífilis latente se divide en precoz (primer año de la infección) o bien latente tardía o sífilis latente de duración desconocida. La utilidad de dicha clasificación radica en que los pacientes en etapas tempranas son potencialmente infecciosos, debido a que el 25% presentan recurrencia de manifestaciones. El 75% de las recaídas se presentan durante el primer año. Muchos pacientes permanecerán en fase latente indefinidamente. Hasta el 25% de los pacientes con sífilis no tratada eventualmente desarrollarán manifestaciones terciarias de sífilis.⁹

La sífilis terciaria o tardía es rara, se presenta en un tercio de los pacientes, 20 a 40 años después de la primoinfección^{9, 49}. Los Treponemas invaden el sistema nervioso central,

sistema cardiovascular, ojos, la piel y otros órganos, producen daño como resultado de las propiedades invasivas e inflamación.

La replicación de los treponemas en la pared de la aorta puede conducir a un aneurisma, aortitis, endocarditis.

La neurosífilis puede ser sintomática o asintomática. Se manifiesta con síntomas y signos meníngeos, meningovasculares o parenquimatosos. La infección por VIH puede estar asociada con un mayor riesgo de complicaciones neurológicas.

La sífilis gomosa o sífilis tardía benigna, puede conducir a complicaciones graves, dependiendo de la localización de la lesión. Los gomas pueden afectar cualquier órgano. En la piel se manifiesta como úlceras. Pueden desarrollarse en cualquier momento posterior al primer año de la infección, sin embargo son más comunes a los 15 años⁸. Durante esta fase la transmisión por contacto sexual no ocurre y la vertical ocurre raramente. Los hombres tiene mayor riesgo en comparación con mujeres^{9, 47}.

Son pocos los datos disponibles sobre efectos de la sífilis en la progresión de la infección por VIH. Se ha demostrado que disminuye transitoriamente el recuento de CD4 (por apoptosis) en pacientes infectados por el VIH^{51,52}. Sin embargo, se desconoce si estos cambios son diferentes de las de los pacientes sin coinfección por VIH. Afecta la historia natural del VIH, es importante tener presente que un descenso inexplicable de CD4 e incrementos de carga viral puede ser secundario a sífilis u otras ITS asintomáticas^{53, 54}.

4. EPIDEMIOLOGÍA

El mayor número de casos reportados de sífilis se alcanzó en los años 1940 y 1950, sin embargo gracias a campañas de prevención, el uso de penicilina, detección de casos y la localización de contactos condujo a una disminución significativa en la incidencia de sífilis

primaria y secundaria durante las décadas siguientes (de 66,9 a 3,9 casos por cada 100.000 personas entre 1947 y 1956). Las tasas han mostrado picos y valles cada 10 años. Es claro que los cambios en el comportamiento y las prácticas sexuales han jugado un papel importante. A finales de 1970 y principios de 1980, una de esas epidemias afectó principalmente a HSH. Con la aparición del VIH, su alta mortalidad así como la disminución de prácticas sexuales de riesgo entre HSH, la sífilis afectó principalmente a personas heterosexuales en la década de 1980 y principios de los 90s. La incidencia disminuyó a mediados de 1990, alcanzando las tasas más bajas durante el 2000 (de 2,1 casos por cada 100.000 personas)^{55, 56,57}.

El resurgimiento de la sífilis primaria y secundaria en EU, comenzó a finales del 2000. Actualmente los HSH representan el 65% de todos los casos. Esta nueva epidemia se caracteriza por tasas altas de coinfección con VIH, se estima que el 16% de todos los pacientes y el 28% de los hombres infectados con sífilis tienen coinfección con el VIH. La incidencia de sífilis muestra variación entre los grupos raciales y étnicos. En 2004 la tasa de sífilis entre Afroamericanos fue 9,0 casos por 100 000 habitantes, seis veces mayor que la tasa entre los sujetos no hispanos, con una tasa 1,6 casos por 100 000 habitantes en blancos.^{54, 56,57}

Las poblaciones urbanas son más afectadas, debido a la alta concentración de HSH. En California, se reportó un incremento del 700% en los casos, entre 1999 y 2005, el 80% en HSH. El 60% de los HSH con sífilis también están infectados por el VIH, y se estima que en las principales ciudades 20% al 50% de los HSH con sífilis tiene infección por VIH

El riesgo de transmisión del VIH es una preocupación particular en la actual epidemia de sífilis debido a que incrementa 5 veces el riesgo de transmisión del VIH y un alto

porcentaje de HSH que han estado involucrados en brotes recientes están coinfectados con VIH.

Al igual que en EU las tasas de sífilis cayeron a su niveles más bajos en muchos países de la Unión Europea (UE) a principios de 1990. A pesar de aumentos sustanciales de sífilis en Rusia. En 1995, con excepción de Alemania, se registraron menos de 300 casos de sífilis en países de la UE La transmisión endémica era rara, la mayoría de las infecciones se diagnosticaron entre inmigrantes procedentes de países con alta prevalencia.^{55, 56,57}

A partir de 1996, la sífilis ha vuelto a tener un aumento en muchos países del norte y el oeste de Europa, en Dinamarca, los casos de sífilis aumentaron un 50% entre 1999 y 2002; en Bélgica entre 2000 y 2002 se registró un aumento de 3,5 veces en el número de casos diagnosticados por laboratorio. En Austria, el número de casos de sífilis aumentó constantemente de 124 en 1993 a 420 en 2002, con un 70% de los casos reportados en Viena. Otros grandes centros urbanos como Londres, Dublín, Berlín, París y Rotterdam mostraron gran aumento de sífilis durante el mismo periodo, sobre todo entre las poblaciones de HSH. Los aumentos en el Reino Unido fueron inicialmente observados en las grandes ciudades y luego avanzó a los suburbios y zonas rurales.^{55, 56,57}

En México, durante 1998 y 2000, la Secretaría de Salud de México registró 1,732 y 1,824 casos anuales de sífilis adquirida (tasa de 1.82 por 100,000 habitantes), estas cifras, parecerían indicar que la sífilis es un padecimiento poco frecuente en este país, pero, al revisar varios estudios de investigación realizados por el Instituto Nacional de Salud Pública, en diversos grupos de la población mexicana se observó: En 1,371 hombres quienes solicitaron diagnóstico de VIH en el CONASIDA en 1992, se encontró una prevalencia de anticuerpos séricos contra *T. pallidum* del 15.1%. En diversas encuestas

seroepidemiológicas efectuadas en sexoservidoras mexicanas, entre 1992 y 1999, se registró una positividad variable del 6.4% al 16.2%.⁸

En las usuarias de los servicios de ginecología y planificación familiar de la ciudad de México y de Cuernavaca, Mor. en 1994-1995, la prevalencia de anticuerpos treponémicos fue en 1.1% a 2.5%. Esta información indica la existencia de un enorme subregistro de los casos infectados⁸.

Las personas con riesgo mayor de padecer sífilis son los varones homosexuales jóvenes, las sexoservidoras, los trabajadores migrantes, los usuarios de drogas endovenosas y las muchas personas promiscuas que viven en los barrios céntricos de las grandes urbes de México; estos grupos de riesgo alto, suelen tener coexistencia de la infección por VIH con sífilis activa y otras ITS.

Existen pruebas seguras de que la sífilis primaria y el herpes genital, que cursan con úlceras genitales, pueden ser un factor de riesgo importante para la adquisición y transmisión del VIH, por esta razón, es recomendable en todos los enfermos sifilíticos realizar serológica para detección de VIH y repetir las pruebas después del tratamiento. Se debe insistir en la necesidad de realizar la investigación epidemiológica del enfermo, y de todos sus contactos sexuales y hacerles un seguimiento a largo plazo⁸.

Las tasas de incidencia y de mortalidad por sífilis en México han tenido un descenso aparente, en contraste con el resultado de las encuestas nacionales seroepidemiológicas y de las tendencias mundiales, que indican un repunte de los casos nuevos y de los brotes epidémicos, principalmente entre los grupos de riesgo alto⁸.

5. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la sífilis es un desafío, la presentación clínica puede imitar otras condiciones infecciosas o no infecciosas. Además, el agente causal, *Treponema pallidum*, no se puede aislar en cultivos convencionales. Por lo tanto, la serología ha sido el método de elección para el diagnóstico de sífilis. Las pruebas aprobadas para el diagnóstico de sífilis se dividen en 4 categorías^{58, 59,60}:

1. DETECCIÓN DIRECTA DEL *T. pallidum*
2. PRUEBAS NO TREPONEMICAS
3. PRUEBAS TREPONÉMICAS
4. DETECCIÓN DIRECTA DE ANTÍGENOS, UTILIZADOS EN INVESTIGACIÓN Y COMO CRITERIOS PARA LA EVACUACIÓN DE OTRAS PRUEBAS

1 DETECCIÓN DIRECTA

1.1 INOCULACIÓN EN ANIMALES.

Es el método más antiguo para la detección de infección por *T pallidum*. Esta técnica probablemente ofrece el método más sensible para detectar treponemas y se utiliza como el estándar de oro para la medición de la sensibilidad de otros métodos, ejemplo: PCR. Cualquier tipo de muestra puede ser útil para la infección en conejos. Se recomienda la inoculación inmediata de la muestra, en un tiempo menor a 1 hora o mantener en congelación en nitrógeno líquido o a temperaturas por debajo de 2788 °C. Numerosas especies de animales se han utilizado para mantener treponemas o

determinar su infectividad. Sin embargo, no todos los animales presentan signos visibles de infección o pruebas serológicas reactivas.

El conejo es el más útil, debido a que presenta una lesión primaria en el sitio de inoculación, la infección en los tejidos perdura durante toda la vida del animal y puede ser transferido de un animal a otro utilizando tejidos como ganglios linfáticos o los testículos. Se recomienda la inoculación de la muestra a través de dos vías, intratesticular o intradérmica. Sin embargo los conejos pueden ser infectados vía ocular, intravenosa o escrotal.

El período de incubación es inversamente proporcional al tamaño del inóculo en los conejos. En los laboratorios en los que se utiliza la administración intratesticular, se observa, generalmente, a los 7 días el desarrollo de una orquitis, en caso de presentar datos de orquitis, se realiza vigilancia clínica cada 2 días. Si no existe desarrollo de orquitis se recomiendan realizar pruebas serológicas a los 18 y 30 días. Si las pruebas se reportan reactivas, se deben obtener muestras de linfáticos del animal y se recomienda la inoculación en un segundo conejo como prueba confirmatoria de la infección. Si las pruebas serológicas se reportan no reactivas a los 18 y 30 días, se recomiendan realizar pruebas serológicas al día 60 y 90.

Si al día 90 no hubo desarrollo de orquitis y las pruebas inmunológicas se reportan no reactivas, se reporta como *Treponema pallidum* no detectado en material de lesión o en muestras de líquido cefalorraquídeo.

La sensibilidad es del 100% si el tamaño del inóculo es mayor de a 23 treponemas y los pacientes no han recibido tratamiento^{58, 59}.

1.2 MICROSCOPIA DE CAMPO OSCURO

Tradicionalmente es el método más rápido y más directo para el diagnóstico de sífilis, ya que permite visualizar de forma directa la espiroqueta en las lesiones.

Actualmente, la microscopía de campo oscuro y las pruebas de FTA se utilizan comúnmente para detectar *T. pallidum*.

La observación al microscopio se debe realizar de manera inmediata posterior a la toma de muestra. Así también es importante saber diferenciar el *T pallidum* de otras espiroquetas saprófitas morfológicamente similares, cuyo hábitat son mucosas y genitales.

Es de gran utilidad para el diagnóstico de sífilis primaria, secundaria, recaídas y en la sífilis congénita temprana, etapas en las cuales existe un gran número de microorganismos en las lesiones (ejemplo: chancro, condiloma lata).

Se considera una muestra adecuada, al líquido seroso libre de eritrocitos y residuos de tejidos o puede ser material obtenido por aspiración; las lesiones pueden limpiarse con solución salina, sin jabón o detergentes, sólo si estuviera contaminada. Puede ser necesario realizar una abrasión leve de la lesión, para obtener fluido seroso, el cual se coloca directamente en una laminilla, debe ser observada durante los primeros 20 minutos posteriores a la obtención de la muestra, ya que el *Treponema pallidum* es muy sensible al oxígeno, calor, cambios de pH y desecación. Las muestras de cavidad oral o mucosa anal pueden estar contaminadas por espiroquetas no patógenas, por lo que no se recomienda este método.

Las muestras de cérvix ó mucosa vaginal, deben ser obtenidas mediante una exploración instrumentada, previo aseo con solución salina, se recomienda realizar un

raspado con gasas y pinzas, hasta obtener un fluido seroso, el cuál debe ser recogido con una pipeta y posteriormente colocar en un portaobjetos.

La iluminación para la microscopía de campo oscuro se obtiene cuando los rayos de luz golpean el objeto en el campo en un ángulo oblicuo y los rayos se reflejan desde el objeto. Por lo tanto, el objeto aparece iluminado contra un fondo oscuro. Debido a que las muestras deben ser leídas inmediatamente, la preparación del microscopio debe ser realizado previo a la toma de muestra. Dicho ajuste se realiza con cepas no patógenas o con muestras obtenidas de las encías

T. pallidum es un organismo delicado, en forma de sacacorchos, espirales uniformes, profundas y rígidos. La longitud de los el organismo es de 6 a 20 mm, el ancho es de 0,10 hasta 0,18 mm. La longitud onda del espiral es de 1,0 a 1,5 mm, y la profundidad de espiral es de 0,5 a 0,7 mm. El movimiento característico de *T. pallidum* es hacia adelante y hacia atrás con un movimiento de rotación sobre su eje longitudinal. La rotación puede estar acompañado por una suave flexión, torsión u ondulación del organismo de lado a lado. Cuando se encuentra con partículas grandes, el treponema puede rodearlo, doblarse o distorsionar su forma, sin embargo recupera su forma original. Los organismos que se confunden fácilmente otros treponemas patógenos *T. pallidum subsp. pertenue*, *T. pallidum subsp. endemicum*, y *T. carateum*.

Los resultados positivos en el examen de campo oscuro es específico e inmediato de la sífilis. En la sífilis primaria permite realizar el diagnóstico semanas antes a la positividad de las pruebas serológicas. Sin embargo, un resultado negativo por microscopía de campo oscuro no excluye el diagnóstico.

La sensibilidad de esta prueba es cercana al 80%. La experiencia y un adecuado entrenamiento son necesarios para hacer un diagnóstico preciso. Un observador no entrenado puede ser engañado por artefactos como fibras de algodón^{58, 59}.

1.3 PRUEBA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES DIRECTOS (DFA-TP)

Esta prueba detecta y ayuda a diferenciar las diferentes especies de treponemas patógenos de las treponemas no patógenas, identificando diferentes especies por una reacción de antígeno-anticuerpo específico.

Otra ventaja de esta prueba, sobre la microscopía de campo oscuro, debido a la especificidad de los anticuerpos, es que puede utilizarse para muestras de lesiones orales, rectales e intestinales.

Sin embargo, presenta una de sus desventajas importantes es su incapacidad para diferenciar entre treponemas patógenos.

Se requiere para realizarla un microscopio de fluorescencia equipado con un condensador de campo oscuro y de un conjunto de filtros.

Para la obtención de muestras se sugiere una técnica similar a la descrita en la de microscopía electrónica. Una vez obtenida la muestra se recomienda secar a temperatura ambiente fijarla con acetona o metanol al 100%, durante 10 min y 10 segundos respectivamente o fijar con calor. Los frotas son teñidos con globulina antihumana de conejo marcada con fluoresceína (FITC), las cuales se obtienen mediante absorción de suero humano o de conejo.

Los resultados se informan de la siguiente manera:

- Treponemas, inmunológicamente específicos para *T. pallidum*, se observaron por inmunofluorescencia directa".

- Treponemas" no fueron observados por inmunofluorescencia directa".

Al igual que el examen de campo oscuro, un resultado negativo no excluye el diagnóstico de la sífilis ya que la capacidad de demostrar *Treponema* spp. puede verse afectada por las condiciones de la lesión o de la muestra. Sin embargo, la sensibilidad de la DFA-TP se acerca 100% cuando se examinan las lesiones frescas^{58,59,60}.

1.4 DFAT-TP.

El uso de la prueba de DFA-TP ha sido ampliado para incluir la tinción de secciones de tejido (DFAT-TP). Una combinación de la prueba y colorantes de tejidos se pueden utilizar para examinar una biopsia para la búsqueda de treponemas.

Para realizar la prueba de DFAT-TP, la biopsia de tejido o pieza quirúrgica, se fijan durante 24h formalina al 10%, posteriormente se realiza la inclusión en parafina. Se cortan bloques de 2 mm de espesor, se pone al portaobjetos. La desparafinación se realiza con tripsina o hidróxido de amonio (NH₄OH), se realiza la tinción con FITC conjugado con anticuerpos y se realiza la observación al microscopio de la muestra. Alcanza una sensibilidad del 100%⁵⁸

2. PRUEBAS NO TREPONÉMICAS

A diferencia de la mayoría de las bacterias, *T. pallidum* no pueden ser fácilmente aislados o mantenidos en cultivos celulares por generaciones sostenida. Además, no hay durante fases latentes y finales una fuente del espécimen disponible, ya que las lesiones están ausentes. Por lo tanto, las pruebas serológicas son de gran utilidad en dichas etapas de la

sífilis. Las pruebas serológicas se clasifican en dos categorías, no treponémicas o treponémicas. En la actualidad se disponen de 4 pruebas no treponémicas:

- Laboratorio de Investigación en Enfermedades Venéreas (VDRL)
- Reagina Plasmática Rápida (RPR)
- La prueba del rojo de toluidina en suero no calentado (TRUS)
- Prueba de reagina en suero no calentado (URS)

Pueden utilizarse como pruebas cualitativas para escrutinio inicial o como pruebas cuantitativas para seguimiento del tratamiento. Las cuatro pruebas se basan en un antígeno compuesto por una solución de alcohol que contiene cantidades medidas de cardiolipina, colesterol, y suficiente lecitina purificada para producir una reactividad estándar.

Las pruebas no treponémicas (reagina) miden inmunoglobulina IgG e IgM, material liberado de las células infectadas, lipoproteínas y cardiolipinas liberados por las bacterias. Los anticuerpos anticardiolipinas se producen por otras enfermedades no treponémicas. Una prueba reactiva no confirma la infección por *T. pallidum*.

Las pruebas no treponémicas cualitativas se utilizan para medir la presencia o ausencia de anticuerpos, sin dilución de la muestra de suero del paciente. A diferencia de las previas, en las pruebas cuantitativas se hacen diluciones seriadas hasta alcanzar el punto final, en el que la muestra aún es reactiva.

Las pruebas no treponémicas, son utilizadas como escrutinio debido a sus bajos costos, alta disponibilidad y son necesarias para valorar respuesta a tratamiento.

Dentro de las limitaciones son la falta de sensibilidad en casos de sífilis primaria y en etapas avanzadas de la enfermedad (sífilis terciaria) así como la posibilidad de resultados

falsos positivos por fenómeno de prozona. El fenómeno o reacción de prozona ocurre en el 1-2% de los casos de pacientes con sífilis secundaria. Este fenómeno se presenta cuando hay anticuerpos en exceso haciendo incompleta o bloquea la reacción normal antígeno-anticuerpo. Inicialmente, estas muestras de suero fuertemente reactivas pueden mostrar una reacción o reactividad débil o en raras ocasiones reacciones atípicas de aspecto granuloso en suero sin diluir. A partir de diluciones 1:16 en muestras con alta carga antigénica se obtienen reacciones óptimas, adecuadas y fácilmente detectables.

La incidencia de reacciones falsas positivas depende del tipo de prueba realizada y del tipo de población en estudio. Con base al tiempo estos resultados pueden dividirse en falsos positivos agudos, con un tiempo menor de 6 meses o crónicos cuando persisten por más de 6 meses. Falsos positivos agudos se han asociado con:

- Infecciones por virus de hepatitis
- Mononucleosis infecciosa.
- Neumonías de etiología viral
- Infección por virus de varicela
- Infección por sarampión
- Paludismo.
- Inmunizaciones
- Embarazo

Reacciones falsos positivos crónicas se han asociado con:

- Enfermedades del tejido conectivo: Lupus eritematoso sistémico.

- Enfermedades asociadas con anomalías de inmunoglobulina,
- Adicción a los narcóticos
- El envejecimiento
- Lepra
- Cáncer.

Los títulos en reacciones positivas falsas suelen ser bajos. Esto es especialmente cierto para las personas que se inyectan drogas ilegales. Más del 10% de los consumidores de drogas intravenosas tienen falsos positivos resultados de la prueba con títulos de 1:8.

El valor predictivo de las pruebas no treponémicas se incrementa cuando se combina con un prueba treponémica reactiva. Por lo tanto, cuando la no treponémicas se utilizan como pruebas de detección en una población de bajo riesgo, todos resultados reactivos deben ser confirmados con una prueba treponémica. Los resultados de las pruebas no treponémicas también debe interpretarse de acuerdo con la etapa de la sífilis que se sospecha^{58,59}.

2.1 Pruebas no treponémicas microscópicas

La prueba de VDRL yUSR se clasifican como pruebas microscópicas debido a que la reacción antígeno-anticuerpo debe ser visto con un microscopio de luz. En el examen microscópico, los liposomas formados por la emulsión de cardiolipina-colesterol-lecitina son apenas visibles.

Es una reacción de floculación, donde el antígeno utilizado está compuesto por colesterol, lecitina y cardiolipina. Esta prueba no treponémica mide anticuerpos antilipídicos; IgG e IgM, los cuales son formados por el huésped en respuesta al material lipídico liberado de

las células huésped dañadas en la infección por TP y material lipídico de la superficie celular treponémica.

El antígeno de VDRL es una solución alcohólica con 0,03% de cardiolipina, 0,9% de colesterol y 0,21% +/- 0,01% de lecitina. Todos los días debe prepararse el antígeno el cual solo es útil 8 horas posterior a su preparación, se sugiere realizar dicha preparación a temperatura ambiental (23-29°C)

Se realiza de manera inicial una prueba cuantitativa, mediante la administración del suero calentado en un anillo de 14mm de la placas, posteriormente se añade 1 gota de suspensión del antígeno, preparado previamente. A continuación la placa se coloca sobre un agitador rotatorio y se gira por 4 a 6 min a 180 rpm. Realizando la lectura en un microscopio.

El reporte de las pruebas se realiza de la siguiente manera

REACTIVO: formación de flóculos medianos o grandes.

DÉBIL REACTIVO: pequeños flóculos.

NO REACTIVO: ausencia de floculación o ligeramente rugoso.

Todas las muestras de suero que muestran algún grado de reactividad o rugosidad deben ser cuantificadas. La prueba cuantitativa es realizado de una manera similar a la prueba cualitativa, excepto que se realizan diluciones seriadas de las muestras de suero con solución salina 0.9%. Los resultados cuantitativos se expresan como la mayor dilución que da un reactivo.

La prueba de VDRL en liquido cefalorraquídeo (LCR) es de utilidad diagnóstica. El VDRL-LCR se lleva a cabo de una manera similar a la de la prueba con suero, excepto el

tamaño de la gota de antígeno para la prueba de LCR es de 10 ml, se gira durante 8 minutos. Falso positivo de esta prueba son poco frecuentes.

El antígeno de prueba USR es el antígeno VDRL estabilizado por la adición de EDTA. Por lo que no es necesaria la preparación diaria del antígeno. Se añade cloruro de colina para eliminar la necesidad de calentar el suero. Al parecer, la adición de cloruro de colina mejora la reactividad del antígeno. La técnica es similar a la del VDRL^{58,59}.

2.2 PRUEBAS NO TREPONÉMICAS MACROSCÓPICAS.

RPR

En esta prueba, se le agregan partículas de carbón al antígeno para facilitar la visualización de la floculación.

TRUST

Esta prueba difiere de la anterior en que se agregan partículas de pintura pigmentada al antígeno. En ambas pruebas, las partículas quedan atrapadas en el complejo antígeno-anticuerpo formado con el suero⁵⁸.

3. PRUEBAS TREPONÉMICAS

Actualmente se realizan tres pruebas:

FTA-ABS

FTA-ABS doble coloración

MHA-TP.

Estas pruebas se basan en la detección de anticuerpos dirigidos contra componentes treponémicos. Las pruebas treponémicas se utilizan sobre todo para verificar la reactividad en las pruebas no treponémicas. Las pruebas treponémicas también pueden utilizarse

para confirmar el diagnóstico de sífilis cuando existe sospecha diagnóstica con prueba no treponémica no reactivo, como ocurre en etapas tardías de sífilis.

Sin embargo son costosas y su proceso requiere de técnicas más complejas y no son de utilidad para valorar la respuesta al tratamiento. El 85% de las personas tratadas con éxito las pruebas siguen siendo reactiva durante años o de por vida.

No se recomiendan como prueba de tamizaje, debido a que el 1% de la población tendrá resultados falsos positivos. Sin embargo una prueba reactiva es altamente específica.

Los resultados falsos positivos se presentan en sujetos con como lupus discoide o lupus asociado a fármacos. También se han presentado en adultos mayores. Las pruebas la hemaglutinación raramente dan resultados falsos positivos, se reportan en menos del 1%. Se ha reportado en casos de mononucleosis infecciosa, especialmente en pacientes con niveles altos de anticuerpos heterófilos y en otras condiciones como colagenopatías, usuarios de drogas y lepra^{58,59}.

3.1 FTA-ABS.

Es una técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizada como ensayo confirmatorio para sífilis. El suero del paciente, el cual es diluído 1:5 en sorbente (un extracto de cultivo de *Treponema phagedenis*, treponema Reiter), es colocado sobre un círculo de una placa que contiene fijado *T. pallidum* subespecie *pallidum*. Si el suero del paciente contiene anticuerpos anti *T. pallidum* - IgG e IgM- estos se unirán a los treponemas. A continuación se agrega un antigamma humana marcada con isotiocianato de fluoresceína que se unirán a estos anticuerpos y como resultado se observará, con microscopía de fluorescencia , espiroquetas con morfología típica fluorescente de color verde limón.

Una modificación de la prueba de FTA-ABS estándar es el FTA-ABS prueba de doble tinción. La técnica de doble tinción FTA-ABS emplea tetrametilrodamina marcado con isotiocianato, IgG anti-humana y una contratinción anticuerpos marcado con FITC⁵⁸.

3.2 MHA-TP.

Hemaglutinación pasiva de eritrocitos sensibilizados con un antígeno es un método muy simple para la detección de anticuerpos. El antígeno usado en el procedimiento es formalinizados, los eritrocitos de carnero son sensibilizados con material de *T. pallidum* (cepa Nichols). El suero del paciente se mezcla primero con un diluyente hecha de treponemas no patógenos Reiter, absorbentes y otros estabilizadores. El suero se coloca a continuación en un pocillo de una placa de microtitulación con eritrocitos sensibilizados de oveja. El suero que contiene anticuerpos reacciona con estas células para formar una capa de células aglutinadas en la placa de microtitulación. Se utiliza un control para la reactividad no específica. Los resultados se presentan como reactivo, no reactivo, o no concluyentes⁵⁸.

4. PRUEBAS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENOS, UTILIZADOS EN LA ACTUALIDAD PARA INVESTIGACIÓN Y COMO CRITERIOS DE REFERENCIA PARA LA EVALUACIÓN DE OTRAS PRUEBAS

4.1 PRUEBAS RÁPIDAS: INMUNOCROMATOGRAFÍA

Muchas de las pruebas rápidas se basan en la técnica de inmunocromatografía. Son membranas de nitrocelulosa donde se colocan péptidos recombinantes de *T. pallidum*

(como los de 47, 17 y 15 kDa.) en líneas separadas y antiglobulina IgG marcada con partículas de oro coloidal, mediante fuerzas capilares las partículas unidas a los analitos migran lateralmente a las denominadas zonas de captura (que es donde estas partículas se unen a los ligandos inmovilizados en la tira). El procedimiento es sencillo, se utiliza suero del paciente según instrucciones del fabricante y el resultado se obtiene en pocos minutos. Esta prueba es del tipo de pruebas point of care o pruebas rápidas, aquellas que se realizan a la cabecera del paciente, y que no requieren personal con entrenamiento en laboratorio, ni equipos sofisticados, pero si deben ser realizadas por personal médico o enfermeras, siguiendo estrictamente las instrucciones para su proceso y las normas de bioseguridad. Además se debe corroborar todos los resultados positivos con pruebas confirmatorias.

En ensayos realizados con este tipo de pruebas con 353 y 291 pacientes respectivamente, se demostró que esta prueba es más sensible que RPR y que tiene sólo 1,4% de resultados falso-positivos. Más recientemente se realizó otro ensayo con 567 pacientes, que demostró sensibilidad y especificidad mayor del 95%. El inconveniente de usar este tipo de pruebas, además de elevados costos, es el incurrir en errores por no ser realizadas correctamente^{58,60}.

4.2 ENZIMOINMUNOENSAYOS (EIA)

La primera vez que se utilizó este tipo de pruebas para el diagnóstico de la sífilis fue en 1975. Los EIA pertenecen al grupo de las pruebas treponémicas. Actualmente existen muchas enzimoimmunoensayos comerciales para la detección de anticuerpos

antitreponémicos IgG, IgM o ambos (IgG-IgM), éstos han mejorado en sensibilidad y especificidad con el uso de proteínas recombinantes, como TpN15, TpN17 y TpN47. El uso de anticuerpos treponémicos totales (IgG-IgM) es particularmente importante como tamizaje, sobre todo cuando los volúmenes de trabajo son altos, por ser susceptibles de automatización.

Se recomienda que el tamizaje para sífilis se realice con una combinación de RPR y TPHA o sólo con EIA, la decisión de qué pruebas se usarán se toma en función a costos y volúmenes de trabajo, no se recomienda realizar tamizaje con una sola prueba no treponémica por la alta posibilidad de obtener resultados falso-positivos. Una vez obtenido un resultado reactivo en las pruebas de tamizaje, éste debe confirmarse con una prueba treponémica diferente a la usada inicialmente; además de una prueba no treponémica cuantitativa o semicuantitativa (Ej. si se usó EIA como tamizaje, se usará TPHA más una prueba no treponémica, como RPR o VDRL).

Se debe considerar la realización adicional de una prueba de enzoinmunoensayo específica para anticuerpos treponémicos de tipo IgM en función al título obtenido en la prueba no treponémica y al cuadro clínico. Los anticuerpos IgM para *T. pallidum* indican una infección reciente y/o activa, aunque un resultado negativo no excluye la necesidad de tratamiento, éstos son detectables después de 2 semanas de adquirida la infección, mientras que los anticuerpos de tipo IgG son detectables después de 4 a 5 semanas. La sensibilidad para anticuerpos IgM es de 93% para sífilis temprana, 85% para sífilis secundaria y 64% para sífilis latente. Los anticuerpos antitreponémicos de tipo IgM declinan después del tratamiento, pero no rápidamente, por lo que el monitoreo para respuesta al tratamiento se realiza con RPR o VDRL, observándose una disminución del

título de 4 veces en 3 a 4 meses y de 8 veces en 6 a 8 meses, volviéndose no reactivos después de un año en la sífilis primaria, y después de 2 años en la sífilis secundaria.

El seguimiento con RPR o VDRL debe hacerse hasta el año, si el paciente se mantiene asintomático y no reactivo, con controles a los 3, 6 y 12 meses. En el caso de la sífilis latente, el 95% es no reactivo después de 2 a 4 años. En unos pocos pacientes el título se vuelve estacionario, esto no indica necesariamente falla del tratamiento, pero debe hacerse seguimiento a fin de buscar compromiso neurológico. Si durante el seguimiento el título de RPR o VDRL se incrementara 4 veces o más, indicaría reinfección, en casos de reinfección la sensibilidad de los anticuerpos antitreponémicos de tipo IgM disminuye.

En sífilis congénita, la determinación de anticuerpos treponémicos de tipo IgM es de gran utilidad. Su presencia en el suero del neonato se considera diagnóstico presuntivo de sífilis congénita, aunque la prueba negativa no descarta esta posibilidad, y debe repetirse todos los meses durante los tres primeros meses de vida, así como también debe realizarse RPR o VDRL. Las causas de resultados falso-negativos son: por infección tardía durante el embarazo, por supresión de IgG en el neonato por altos niveles de IgG materna y por un sistema inmune poco desarrollado del recién nacido. Las pruebas no treponémicas deben negativizar a los 3 a 6 meses de recibido tratamiento. En casos de transferencia pasiva de anticuerpos al neonato, la prueba de anticuerpos treponémicos de tipo IgG, debe estar negativa a los 6 meses del nacimiento^{58,60}.

4.3 INMUNOBLOT: WESTERN BLOT

El inmunoblot o enzimoimmunoensayo de membrana es un método que consiste en transferir proteínas (mediante aplicación directa o electrotransferencia por electroforesis), a una membrana sintética. Por razones históricas cuando la transferencia es a un gel de electroforesis de alta resolución (como el SDS-PAGE o electroforesis bidimensional), se llama WB. Las membranas sintéticas pueden ser de nitrocelulosa o nylon, éstas luego se cortan en tiras y se incuban con la muestra del paciente, en el WB se usa un segundo anticuerpo marcado con una enzima y sustrato o con material luminiscente. El WB combina capacidad de resolución de las proteínas en un gel (electroforesis), con la especificidad de esta proteína con su anticuerpo (reacción antígeno-anticuerpo). Mediante WB se logra la identificación de un antígeno específico mediante anticuerpos monoclonales o policlonales, por una reacción cromogénica o luminiscente; es importante destacar que este método es altamente sensible, ya que detecta cantidades muy pequeñas de antígeno. El resultado es la detección de una o más bandas. Mediante WB para *T. pallidum* mediante anticuerpos tipo IgM, IgG, o ambos se puede detectar los antígenos más relevantes como TpN15, TpN17, TpN37, TnP45, TmpA, y TpN47(14,19). El WB de tipo IgM es de gran valor para la confirmación de sífilis congénita. Al igual que sucede con el FTA-ABS y debido a que podrían haber reacciones cruzadas con otras espiroquetas u otros microorganismos como *Borrelia* debe ser interpretado cuidadosamente en zonas donde la enfermedad de Lyme es endémica, también en casos de infección por VIH, o en casos de lupus eritematoso sistémico, otras enfermedades autoinmunes, embarazo y ancianidad. Para evitar estos falso-positivos el criterio diagnóstico es considerar negativo la existencia de menos de tres bandas y positivo

cuando hay tres o más bandas presentes. Con estos criterios la sensibilidad y especificidad para esta prueba es bastante mayor que FTA-ABS, llegando según diferentes estudios a 99-100%^{58,60}.

4.4 INMUNOENSAYO LINEAL (LIA)

Este método es un inmunoblot, muy similar al WB, la diferencia es que no se produce electrotransferencia de los péptidos recombinantes, si no que se adosan directamente a manera de líneas paralelas a una membrana de nitrocelulosa o nylon que se protege con una cubierta plástica. Los antígenos presentes son tres proteínas recombinantes (TpN47, TpN17, TpN15) expresadas mediante inserción de secuencias de ADN en *Escherichia coli*, obtenidas mediante reacción en cadena a la polimerasa (PCR), además de un péptido sintético (TnpA), que se purificó mediante HPLC reversa (cromatografía líquida reversa de alta resolución). Para su interpretación, la tira posee un control negativo y tres controles positivos de IgG, que se valoran desde una cruz o débil (1+) a tres cruces o fuerte (3+), con lo cual la prueba es semicuantitativa. La prueba se considera reactiva cuando hay más de dos bandas presentes e indeterminada cuando sólo hay una banda. Como prueba confirmatoria tiene la ventaja, que no presenta reacciones falso-positivas, descritas para WB y FTA-ABS. Según diferentes estudios se reporta una sensibilidad de 99,6 a 100% y especificidad de 99,3 a 99,5% para esta prueba⁶⁰.

4.5 INMUNOFLUORESCENCIA DE SUPERFICIE (SIFA)

La inmunofluorescencia de superficie (SIFA) es una técnica compleja en la que el suero inactivado del paciente se coloca en una suspensión de treponemas. La suspensión es obtenida de testículos de conejos infectados con *T. pallidum*, a una concentración de 10⁸ bacterias/mL, antes de iniciar la prueba se debe comprobar que la motilidad de los treponemas sea del 100%. Luego se incuba la suspensión a 37°C en anaerobiosis y se observa la viabilidad de los treponemas en microscopía de campo oscuro. Esta prueba se considera válida, si la motilidad se ha conservado en 99%. La suspensión luego se centrifuga y se diluye a una concentración final de 10⁷ bacterias/mL. Se coloca en lámina portaobjetos, se deja secar y se fija. Luego, se le añade un conjugado de antiinmunoglobulina total de conejo con fluoresceína y se debe observar fluorescencia brillante. La SIFA fue comparada con WB y demostró una especificidad del 100%⁶⁰.

4.6 REACCIÓN EN CADENA A LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy rápida, que permite a partir de una sola copia de una molécula de ADN obtener miles de copias. Por lo tanto, resulta ser una técnica muy útil en las estrategias de clonación y también de detección, sobre todo cuando la cantidad de la muestra es escasa. Esta técnica aprovecha las características de la replicación del ADN, es decir que a partir de un pequeño cebador, la polimerasa, puede proseguir la síntesis de una cadena. Se debe contar con dos cebadores adecuados, uno para cada cadena. Por la posición de estos cebadores, al cabo de una serie de secuencias de replicación, se obtiene la amplificación de una molécula de

ADN correspondiente al tramo que va desde uno de los cebadores al otro. Por lo tanto, se obtienen muchas moléculas idénticas. Los cebadores suelen ser cortos, de 15 a 20 bases y en la reacción se mezclan con la muestra de ADN a ser amplificada. Al comenzar la reacción, la muestra de ADN de doble cadena debe ser desnaturalizada calentándola a 95°C y luego enfriada para permitir la hibridación con los cebadores. La siguiente etapa consiste en la síntesis a partir de los cebadores de cada una de las cadenas de ADN por la polimerasa, utilizando nucleótidos agregados a la mezcla de reacción. Este ciclo de desnaturalización, hibridación y síntesis se repite muchas veces y por tanto se amplifica, puesto que en cada nuevo ciclo se dispone de más cantidad de ADN molde. Como el ADN tiene que ser desnaturalizado por calor para iniciar cada nuevo ciclo, se emplea una polimerasa que resiste el calor (denominada Taq polimerasa, aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*).

El PCR para *T. pallidum* utiliza cebadores diseñados a partir de fragmentos de ADN del gen TpN47. Se puede realizar a partir de muestras, como líquido amniótico, suero neonatal y LCR neonatal, aunque también se puede usar en sangre y tejidos; permite detectar de 1 a 10 treponemas por muestra. Como método que puede detectar *T. pallidum* en pequeñas cantidades de LCR es extremadamente valioso, especialmente para determinar la efectividad del tratamiento en neurosífilis. Un inconveniente es determinar si el ADN encontrado pertenece a una pequeña cantidad de microorganismos persistentes o es ADN de organismos muertos. Sin embargo, en modelos animales se ha podido determinar que después del tratamiento exitoso la eliminación de ADN de microorganismos muertos de *T. pallidum* es a los 15 a 30 días.

También se ha diseñado una prueba de RT-PCR (reverse transcriptase-PCR). RT-PCR es la prueba más sensible para detección y cuantificación de ARNm (ARN mensajero). Debido a que los ribosomas son críticos para la función celular e interaccionan con un gran número de otras moléculas, incluyendo el ARN mensajero y el ARN de transferencia (tARN), las secuencias de las moléculas de ARNr están notablemente conservadas a través de la evolución. Además, las secuencias de los genes que codifican para el ARNr se encuentran dentro de las más altamente conservadas. La comparación de las secuencias del ARNr 16S ha facilitado la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables, como es el caso del *T. pallidum*. En cuanto a la metodología de este análisis, el ARNr 16S es secuenciado utilizando una modificación de la técnica de dideoxinucleótidos, en la que cebadores complementarios conocidos de las regiones conservadas del ARNr 16S son elongados utilizando una transcriptasa inversa. Las pequeñas cadenas de ADN producidas pueden ser amplificadas mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o por clonación, y después secuenciadas mediante un proceso automatizado por electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta prueba es más sensible que el PCR para ADN, ya que detecta la presencia de hasta un solo microorganismo de *T. pallidum*. Las pruebas de PCR, aunque costosas, son particularmente útiles en las infecciones del SNC y tienen una sensibilidad mayor al 95% y una especificidad mayor al 99%^{58,60}.

5.1 ALGORITMO DIAGNÓSTICO E INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS

Tradicionalmente, se realizan pruebas no treponémica. Si es reactivo, se realiza una prueba no treponémica confirmatoria. Este algoritmo ha demostrado un rendimiento fiable en correlacionar el estado de la enfermedad. Sin embargo, el algoritmo tradicional tiene

limitaciones significativas, incluido el uso de un análisis de detección que carece de especificidad, requiere operación manual y es subjetivo⁵⁷.

Debido a estas limitaciones, muchos laboratorios clínicos han implementado un algoritmo de detección inverso para la prueba de sífilis. En el algoritmo inverso, se realiza un prueba treponémica automatizada. Las muestras que son reactivas son confirmadas por pruebas no treponémicas, que ayuda en la interpretación del estado de la enfermedad y tratamiento. Este algoritmo tiene varias ventajas, incluyendo el uso de un método de proyección que detecta anticuerpos específicos contra *Treponema spp.* Además las pruebas treponémicas pueden automatizarse y así obtener resultados más confiables. Otra de las ventajas es que los laboratorios de referencia pueden procesar gran cantidad de muestras.

Sin embargo dicha detección a la inversa puede crear confusión entre los médicos y pacientes, debido principalmente a la identificación de pacientes con resultados discordantes, treponémicas reactivas con pruebas no treponémicas no reactivas. En la mayoría de estos casos, los resultados reflejan pasado, sífilis tratada con éxito; o ser un resultado falso positivo y en aquellos pacientes con sífilis temprana o tardía/latente, durante el cual la sensibilidad de las pruebas es baja.

Los CDC ha publicado algunas sugerencias para la gestión de diagnóstico para los médicos que reciben estos resultados discordantes:

- Antecedentes de sífilis previamente tratada, prueba no treponémicas no reactivo, indica que la infección activa es improbable.

- Para las personas sin antecedentes de tratamiento, el CDC recomienda realizar prueba treponémica en segundo lugar. Si la prueba de TP-PA es no reactiva, y el paciente no tiene síntomas o comportamientos de riesgo para sífilis, el médico puede descartar infección por sífilis
- Prueba treponémica reactiva, los médicos deben discutir la posibilidad de infección y ofrecer tratamiento a los pacientes que no han sido tratados previamente. Estos pacientes no suelen ser infecciosos (a menos que la historia o examen físico sugiere lo contrario) y deben ser tratados para la infección latente tardía.

Se recomienda realizar prueba serológica para sífilis en las siguientes situaciones:

- Sospecha de enfermedad (por ejemplo, pacientes con una úlcera genital indolora compatible con un chancro sífilítico)
- Detección de poblaciones de alto riesgo (por ejemplo, pacientes que se presentan a una clínica de ITS los reclusos, las personas con múltiples parejas sexuales, HSH que se involucran en comportamientos de alto riesgo).
- Exámenes de rutina (por ejemplo, las mujeres que asisten a clínicas prenatales o planificación familiar)

Las pruebas serológicas también se recomiendan en diversos lineamientos por lo menos anualmente para todos los pacientes con VIH sexualmente activos; control más frecuente (cada tres a seis meses) en personas con múltiples parejas sexuales, que practican relaciones sexuales sin protección, sexo junto con el uso de drogas y el uso de la metanfetamina.

La justificación para realizar pruebas de detección de sífilis en pacientes asintomáticos está relacionada con la historia natural de la enfermedad. Aunque la sífilis en etapa temprana a menudo se resuelve sin tratamiento, la sífilis no tratada puede progresar a enfermedad posterior, lo cual puede causar morbilidad grave. Además, los pacientes con enfermedad insospechada, primaria o secundaria, pueden tener lesiones con gran carga treponémica, haciéndolos altamente infecciosos. Los servicios preventivos de E.U. recomiendan cribado a los HSH con prácticas sexuales de alto riesgo, sexoservidores, personas que intercambian sexo por drogas y los internos en centros penitenciarios para adultos^{61,62,63}.

El diagnóstico definitivo de la sífilis se realiza cuando las pruebas treponémicas y no treponémicas son reactivas, a menos que se descarte por la historia de tratamiento previo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La sífilis es catalogada en la actualidad una enfermedad emergente, se reportan 12 millones de casos anuales a nivel mundial. Es considerada la principal causa de úlceras genitales en países subdesarrollados e incrementa el riesgo de contagio e infección por VIH.

En nuestro país son pocos los estudios epidemiológicos y el Sistema Nacional de Salud reporta una disminución de casos, cifras que difieren con el comportamiento epidemiológico durante las últimas dos décadas en el mundo. Dicha epidemia afecta principalmente a pacientes con infección por VIH que pertenecen al grupo de HSH.

Un alto porcentaje de la población atendido en nuestro hospital pertenece al grupo de sujetos en riesgo de infección por sífilis, por lo que este estudio nos permitirá conocer el comportamiento epidemiológico, factores de riesgo y características clínicas de la sífilis en pacientes con infección por VIH.

JUSTIFICACIÓN

El contar con esta información, permitirá conocer la frecuencia de coinfección de sífilis y VIH en pacientes de nuestro medio y a su vez elaborar un plan racional de prevención, diagnóstico, tratamiento y seguimiento que permita reducir la morbi-mortalidad, así como los costos inherentes.

PREGUNTA DE GENERAL

¿Cuál es la frecuencia de infección de sífilis en pacientes con VIH del hospital de infectología CMN La Raza de marzo 2012 a marzo 2013?

PREGUNTAS ESPECÍFICAS

¿Cuál es el estadio clínico de sífilis en el cual se diagnostica a los pacientes del CMN La Raza?

¿Cuáles son los factores de riesgo para infección por sífilis en pacientes con VIH del CMN La Raza?

OBJETIVO GENERAL

Conocer la frecuencia de infección por sífilis en pacientes con VIH atendidos en el Hospital de Infectología CMN La Raza durante el periodo de marzo de 2012 a marzo de 2013.

OBJETIVOS ESPECIFICIOS

Conocer el estadio clínico de sífilis en el cual se diagnostica a los pacientes del CMN La Raza.

Conocer cuáles son los factores de riesgo para infección por sífilis en pacientes con VIH del CMN La Raza.

HIPÓTESIS

La frecuencia de sífilis en pacientes coinfectados por VIH será similar a la reportada en la literatura mundial. Se reporta una prevalencia del 16-60%

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Retrospectivo, observacional, descriptivo, transversal.

Población de estudio: Pacientes con VIH/SIDA atendidos en el servicio de Infectología adultos del Hospital Infectología del CMNR durante el periodo de marzo del 2012 a marzo del 2013, a los cuales se les realizó pruebas de escrutinio para descartar sífilis, anticuerpos antitreponemas.

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS.

VDRL.

Prueba no treponémica aplicada para determinar actividad de enfermedad por sífilis.

Técnica en anexo 1

ANTICUERPOS ANTITREPONEMA.

Prueba treponémica, determina anticuerpos totales por técnica de inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA).

Técnica en anexo 2

Tamaño de muestra:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2}$$

Donde la prevalencia es =16%

Nivel de confianza=95%

Precisión absoluta= 0.05

n=206.

Más el 20% de pérdidas=41

N=247

Variables

Dependiente

- Sífilis:

Definición conceptual: Infección sistémica, con manifestaciones diversas, causada por *Treponema pállidum*

Definición operacional: definición con base al estadio de la enfermedad infecciosa

Tipo de variable: cualitativa nominal

Unidad de variable: 1 Si 2 No

Infección por sífilis se definió:

Sífilis primaria

Descripción clínica: estadio de infección con *Treponema pallidum* caracterizado por uno o más chancros (úlceras); los chancros pueden diferir considerablemente en apariencia clínica.

- *Probable*: un caso clínicamente compatible con una o más úlceras (chancros) por sífilis primaria y una prueba serológica reactiva (no treponémica VDRL o treponémicos, anticuerpos antitreponema)
- *Confirmado*: un caso clínicamente compatible que es confirmado con el laboratorio

Sífilis secundaria

Descripción clínica: estadio de infección causado por *T. pallidum*, caracterizado por lesiones mucocutáneas localizadas o difusas, a menudo con linfadenopatías generalizadas. El chancro primario puede aún estar presente.

Clasificación de caso:

- *Probable*: un caso clínicamente compatible con un título no treponémico, VDRL igual o mayor a 4
- *Confirmado*: un caso clínicamente compatible que es confirmado con el laboratorio

Sífilis latente

Descripción clínica: estadio de infección causado por *T. pallidum* en el cual los organismos persisten en el cuerpo de la persona infectada sin causar síntomas o signos. La sífilis latente es subdividida en categorías temprana, tardía, y desconocida basada en la duración de la infección.

Clasificación de caso:

Probable: ausencia de signos o síntomas clínicos de sífilis y la presencia de uno o más de los siguientes:

- Ausencia de diagnóstico previo de sífilis, una prueba reactiva no treponémica (VDRL), y una prueba reactiva treponémica (Anticuerpos antitreponema)

- Antecedente de tratamiento para sífilis y un título actual con pruebas no treponémicas demostrando incremento cuatro veces o más del último título de pruebas no treponémicas

Sífilis latente temprana

Descripción clínica: subcategoría de sífilis latente. Cuando la infección inicial ha ocurrido dentro de los 12 meses previos, la sífilis latente es clasificada como latente temprana.

Clasificación de caso:

Probable: sífilis latente en una persona que presenta evidencia de haber adquirido la infección dentro de los 12 meses previos basado en uno o más de los siguientes criterios:

- Seroconversión documentada o incremento de 4 veces o más en el título de una prueba no treponémica durante los 12 meses previos
- Una historia de síntomas consistente con sífilis primaria o secundaria durante los 12 meses previos
- Una historia de exposición sexual con una pareja que presenta sífilis primaria o secundaria confirmada o probable o sífilis latente temprana probable (documentada independientemente de la duración menor de 1 año)
- Pruebas treponémicas y no treponémicas reactivas y pruebas de una persona cuya única exposición posible ocurrió dentro de los 12 meses previos

Sífilis latente tardía

Descripción clínica: Subcategoría de sífilis latente. Cuando la infección inicial ha ocurrido más allá de 1 año previo, la sífilis latente es clasificada como latente tardía.

Clasificación de caso:

- *Probable*: sífilis latente en un paciente que no presenta evidencia de haber adquirido la enfermedad dentro de los 12 meses precedentes y cuya edad y títulos no cumplen los criterios especificados para sífilis latente de duración desconocida.

Sífilis latente de duración desconocida

Descripción clínica: Subcategoría de sífilis latente. Cuando el día inicial de la infección no puede ser establecido como haber ocurrido dentro del año previo y la edad del paciente y los títulos cumplen los criterios descritos más abajo, la sífilis latente es clasificada como sífilis latente de duración desconocida.

Clasificación de caso:

- *Probable*: sífilis latente que no cumple con los criterios para sífilis latente temprana, y el paciente tiene 13-35 años de edad y presenta un título no treponémico mayor o igual a 32

Neurosífilis

Descripción clínica: Evidencia de infección en el sistema nervioso central con *T. pallidum*

Criterios de laboratorio para el diagnóstico: Una prueba serológica reactiva para sífilis y VDRL reactiva en el líquido cefalorraquídeo (LCR)

Clasificación de caso:

**Probable:* sífilis de cualquier estadio, con VDRL negativo en LCR, y ambos de los siguientes:

- Proteínas o recuento de leucocitos elevados en LCR en ausencia de otras causas conocidas de estas anomalías
- Síntomas o signos clínicos consistentes con neurosífilis en ausencia de otras causas conocidas de estas anomalías

**Confirmada:* sífilis de cualquier estadio que cumple con los criterios de laboratorio para neurosífilis

Sífilis tardía con otras manifestaciones clínicas que neurosífilis (sífilis tardía benigna y sífilis cardiovascular)

Descripción clínica: Manifestaciones clínicas de sífilis tardía diferente a neurosífilis puede incluir lesiones inflamatorias del sistema cardiovascular, piel, y hueso. Raramente, otras estructuras (como por ej., tracto respiratorio superior e inferior, boca, ojos, órganos abdominales, órganos reproductivos, ganglios linfáticos, y músculo esquelético) pueden estar comprometidos. La sífilis tardía usualmente se vuelve clínicamente manifiesta únicamente después de período de 15-30 años de infección no tratada.

Criterios de laboratorio para el diagnóstico: Demostración de *T. pallidum* en lesiones tardías por anticuerpos fluorescentes o tinciones especiales, aunque los organismos son raramente visualizados en lesiones tardías)

Clasificación de caso:

- *Probable*: anormalidades características o lesiones del sistema cardiovascular, piel, hueso, u otras estructuras con una prueba treponémica reactiva, en ausencia de otras causas conocidas para estas anormalidades, y sin anormalidades en el LCR y síntomas o signos clínicos consistente con neurosífilis
- *Confirmado*: un caso clínicamente compatible que es confirmado con el laboratorio

Comentario: El análisis del LCR para evidencia de neurosífilis es necesaria en la evaluación de la sífilis tardía con manifestaciones clínicas.

Independientes

- Edad.

Definición conceptual: Tiempo que ha vivido una persona.

Definición operativa: edad consignada en el expediente.

Tipo de variable: cuantitativa discreta.

Unidad de variable: números arábigos.

- Sexo

Definición conceptual: Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales y las plantas.

Definición operativa: sexo consignado en el expediente.

Tipo de variable: cualitativa nominal dicotómica.

Unidad de variable: 1. Femenino; 2. Masculino

- Escolaridad

Definición conceptual: Tiempo durante el que un alumno asiste a la escuela o a cualquier centro de enseñanza.

Definición operativa: Nivel de estudios

Tipo de variable: cualitativa ordinal

Unidad de variable: 1 Educación básica completa. 2. Educación básica incompleta. 3.

Bachillerato completo. 4. Bachillerato incompleto 5. Licenciatura completa. 6. Licenciatura incompleta. 4. Posgrado.

- Cuenta absoluta de Linfocitos T CD4+.

Definición conceptual: Subtipo de linfocito T que expresa la molécula CD4 en su membrana y tiene función inductora o cooperadora en la respuesta inmune (T helper).

Definición operativa: cantidad de Linfocito T CD4+ de los pacientes, al momento de realizar el estudio, consignado en el expediente.

Tipo de variable: cuantitativa discreta.

Unidad de variable: números arábigos

- Número de parejas sexuales:

Definición conceptual: Numero de personas con las que un individuo ha realizado conductas sexuales, ya sea oral, anal o vaginal.

Definición operacional: Número de personas con las que un sujeto a tenido una relación sexual

Tipo de variable: Cuantitativa discreta

Unidad de variable: números arábigos.

- Carga viral

Definición conceptual: Número de copias de RNA del VIH, en el plasma. Utilizada para el seguimiento clínico y terapéutico de los pacientes infectados con el VIH³³.

Definición Operativa: cantidad de copias de RNA/ml de suero de los pacientes.

Tipo de variable: cuantitativa discreta.

Unidad de variable: números arábigos.

- Práctica sexual protegida.

Definición conceptual: a aquella en la cual se utiliza correctamente una barrera mecánica, como el condón de látex (masculino) o de poliuretano (femenino), para evitar el intercambio de secreciones sexuales o de sangre.

Definición operativa: Uso de condón en prácticas sexuales

Tipo de variable: cualitativa nominal

Unidad de variable: 1. Siempre 2. Nunca 3. Regularmente

- Relación heterosexual:

Definición conceptual: es la relación sexual que se lleva a cabo entre dos individuos de distinto sexo.

Definición operacional: relación sexual entre personas de diferente sexo

Tipo de variable: cualitativa nominal dicotómica:

Unidad e variable 1. Si 2. No

- Relación homosexual.

Definición conceptual: relación sexual que se realiza entre dos individuos del mismo sexo.

Definición operacional: relación sexual entre personas del mismo sexo

Tipo de variable: cualitativa nominal dicotómica

Unidad de variable 1. Si 2 No

- Sujeto Insertivo:

Definición conceptual: comportamiento sexual en el cual el sujeto realiza penetración anal o vaginal en la pareja.

Definición operacional: sujeto que realiza penetración anal o vaginal

Tipo de variable: cualitativa nominal

Unidad de variable 1. Si. 2. No.

- Sujeto receptivo:

Definición conceptual: comportamiento sexual durante el cual el sujeto permite la penetración anal o vaginal.

Definición operacional: sujeto que permite la penetración anal o vaginal.

Tipo de variable: cualitativa nominal

Unidad de variable: 1. Si 2. No

- Sujeto Insertivo/receptivo:

Definición conceptual: Sujeto que realiza y permite penetración anal

Definición operacional: sujeto que permite y realiza penetración anal

Tipo de variable: cualitativa nominal

Unidad de variable: 1 Si 2 No

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES

Criterios de inclusión:

Pacientes mayores de 18 años

Pacientes de ambos sexos

Pacientes con diagnóstico de VIH

Pacientes en los que se realizó prueba de anticuerpos antitreponema

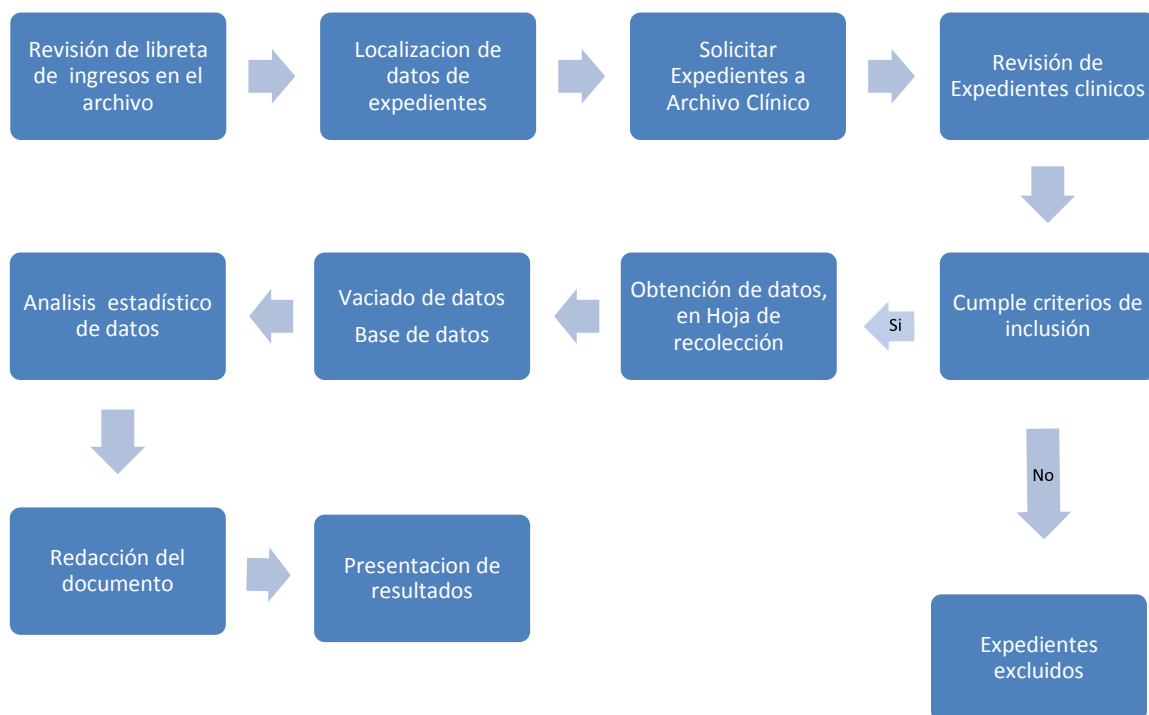
Criterios de exclusión:

Pacientes sin información clínica en el expediente que permitan estadificar la infección.

MÉTODO

Se realizó recolección de datos de los expedientes de pacientes con diagnóstico de infección por VIH atendidos en el hospital, durante el periodo de marzo 2012 a marzo del 2013.

Se realizó un análisis descriptivo mediante la obtención de medianas, frecuencias y porcentajes. La frecuencia de coinfección se calculó con la proporción de pacientes con pruebas VDRL, anticuerpos antitreponema positivos y manifestaciones clínicas compatibles con sífilis. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SPSS 21.



RECURSOS

Humanos.

Residente de Infectología.

Médico adscrito al servicio de Infectología de UMAE HI CMR.

Materiales

Computadora con paquetería Office y base de datos SPSS.

Hojas blancas.

Fotocopias.

Impresora.

Lápices, plumas.

Económicos.

Propios de la institución, no se requiere financiamiento externo.

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El protocolo se apega a la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos en materia de Investigación para la Salud, así como a las Normas del Instituto Mexicano del seguro social. Todo el proyecto siguió las normas deontológicas reconocidas por la Declaración de Helsinki, y no viola los derechos de los pacientes. El protocolo será presentado para su validación al Comité de Investigación correspondiente.

Para recabar la información se elaboró una hoja de recolección de datos ex profeso que se validó previamente, esta información está protegida y solo tienen acceso; el médico residente de infectología y los médicos asesores del proyecto, se encuentra en 1 sola computadora protegida con contraseña interna en el servicio de infectología Adultos de la UMAE HI CMR.

Resultados.

Se realizó el análisis descriptivo de los pacientes, con los siguientes resultados. La edad se encontró en un rango de los 15 a los 75 años, con una mediana 33.50 años (IQR 27-41) (Figura 3).

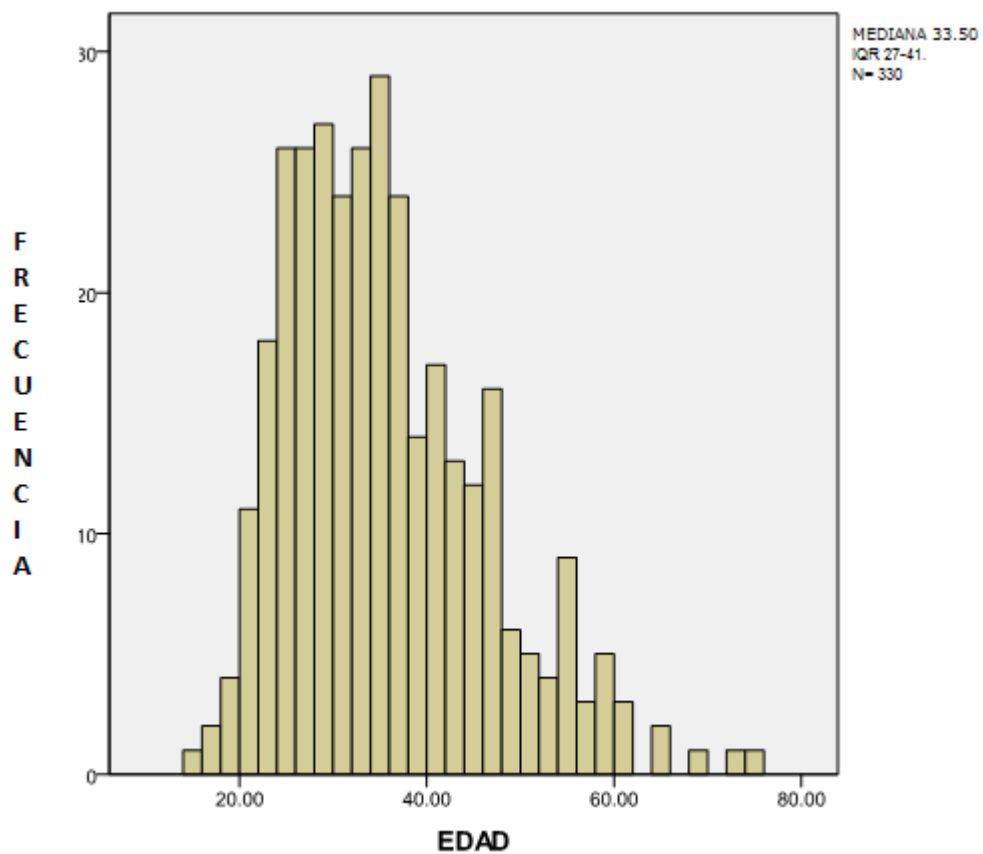


Figura3. Histograma de edad en los sujetos en estudio.

De los 330 pacientes incluidos en este estudio, 263 fueron de género masculino representando el 80.9% de nuestra población de estudio (figura 4).

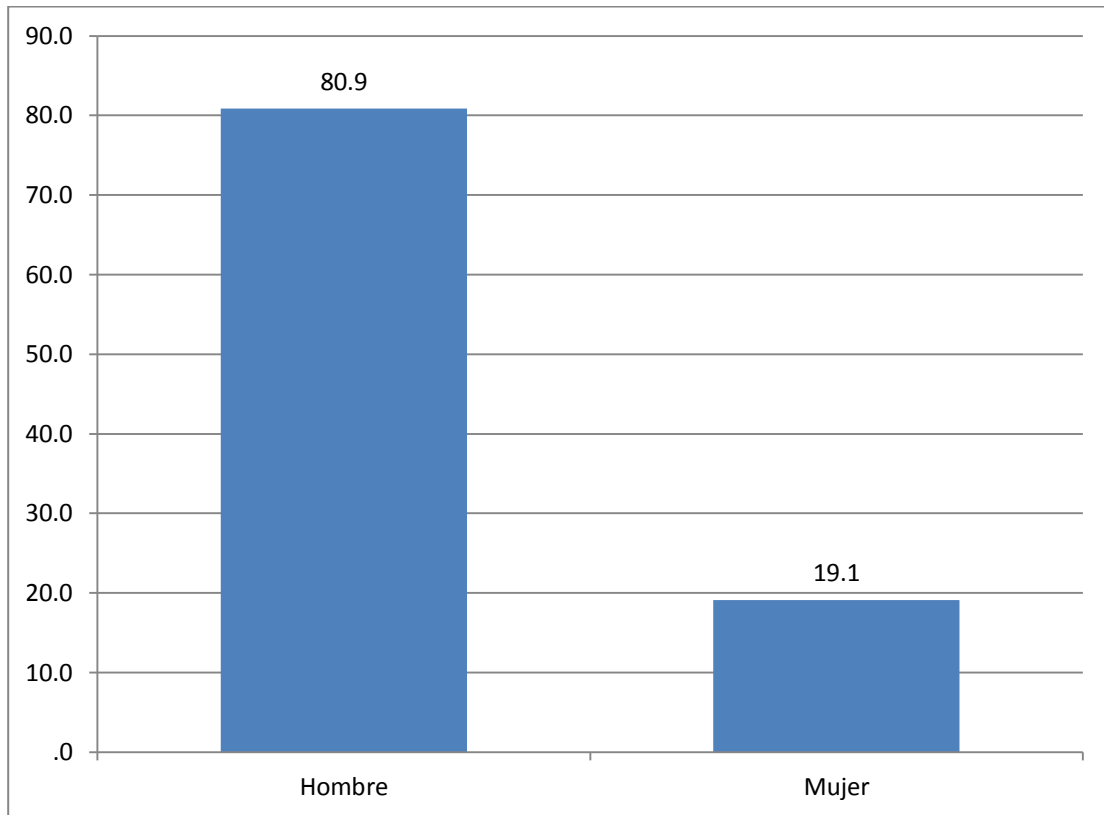


Figura 4. Distribución de los pacientes según el género.

Dentro del análisis de las características demográficas se encontró que el 98.8% eran mexicanos y solo 4 tenían una nacionalidad diferente; 219 residen en el DF, representando el 66.4% siendo el Estado de México el segundo sitio de residencia en frecuencia. (Figura 5).

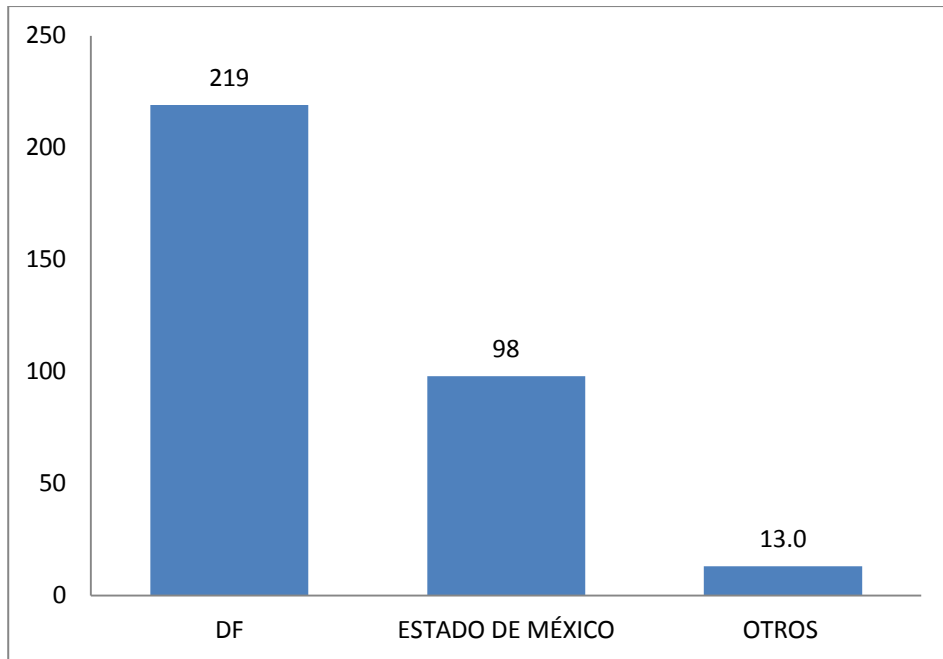


Figura 5. Población de estudio con respecto a lugar de residencia.

Respecto al estado civil, 229 sujetos son solteros (69.4%) (figura 6).

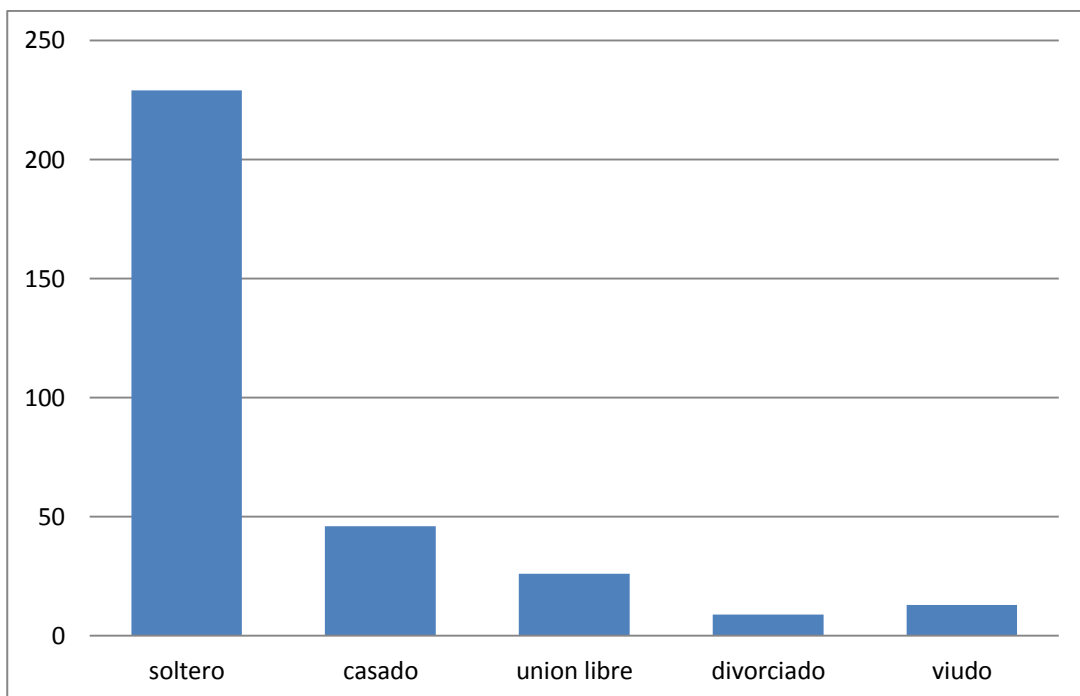


Figura 6. Estado civil de los pacientes en estudio.

De los 330 pacientes, 6 sujetos fueron analfabetas (1.8%), 38.1% tenían un nivel superior de estudios, solo se desconoció la escolaridad de 4 (figura 7).

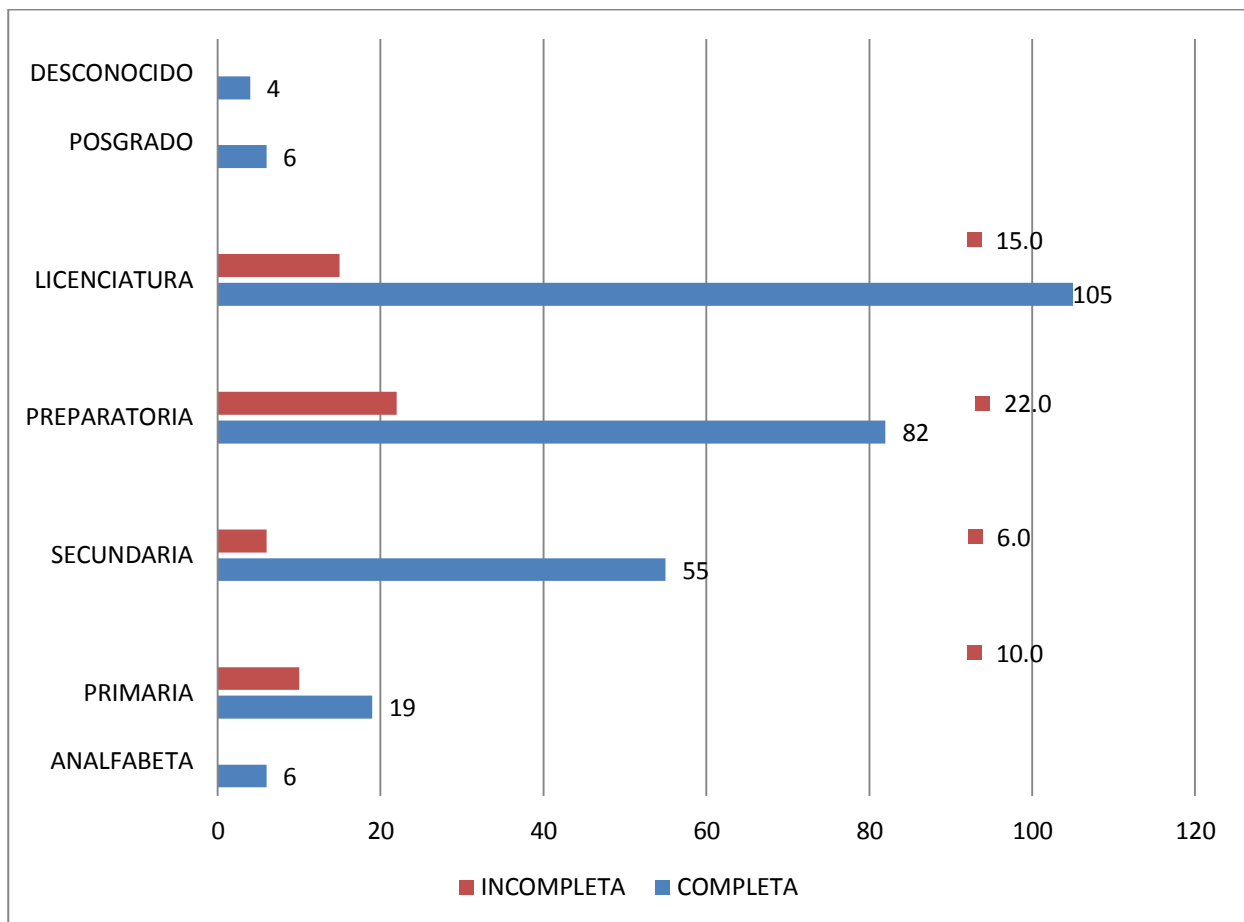


Figura 7. Nivel de estudios de la población

Respecto al comportamiento sexual, 191 sujetos pertenecieron al grupo de HSH (57.9%) siendo la población bisexual la menos frecuente (9.7%) (figura 8).

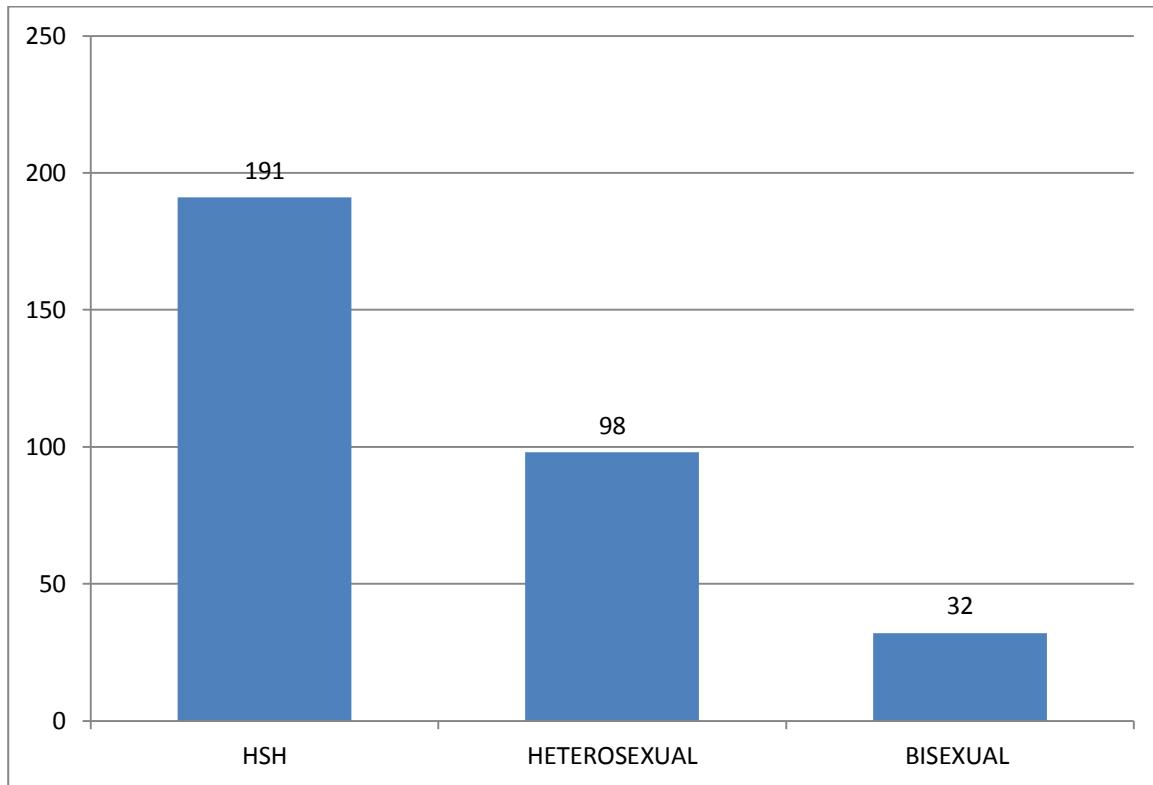


Figura 8. Preferencia sexual de la población en estudio.

La mediana de edad de inicio de la vida sexual fue de 18 años (IQR 16-19), con un rango de variación de 11 a 30 años (figura 9).

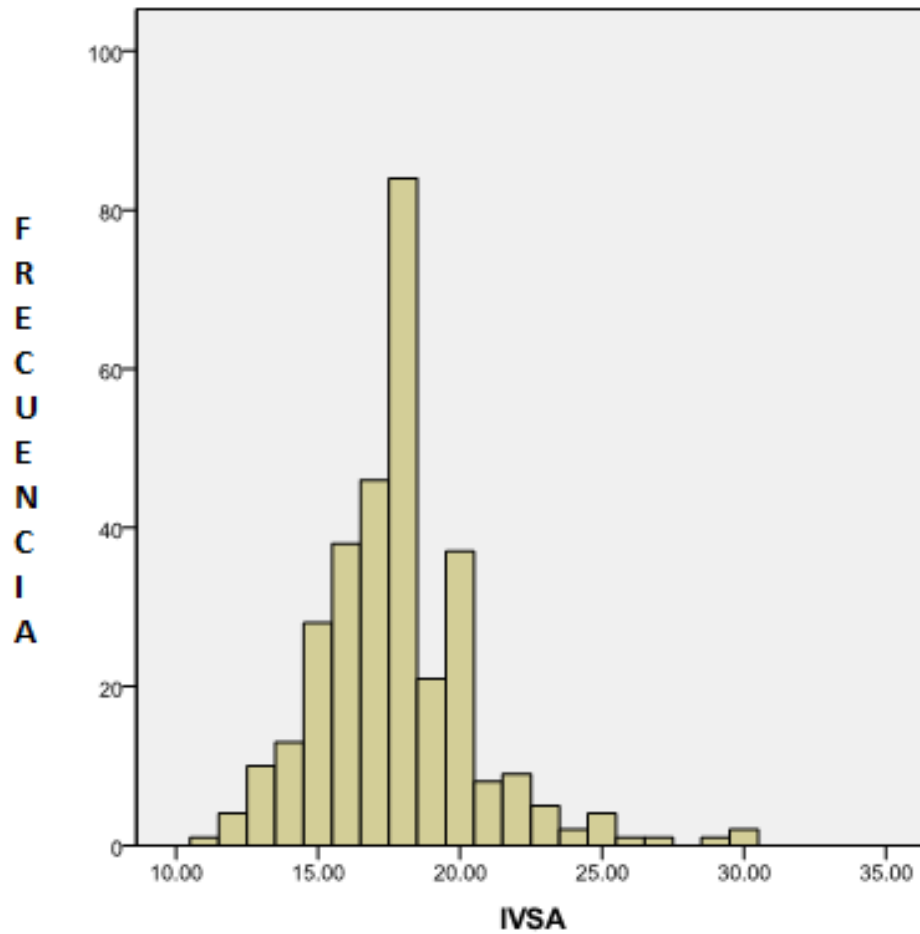


Figura 9. Edad de inicio de vida sexual de la población en estudio.

La mediana de parejas sexuales fue de 8 (IQR 3-20), el 7.8% fueron monógamos (figura 10). El 50% de los sujetos no contaban con una pareja estable y mantuvieron encuentros ocasionales. El 67% de la población desconocía el estado de salud de las personas con las que mantuvieron contacto sexual,

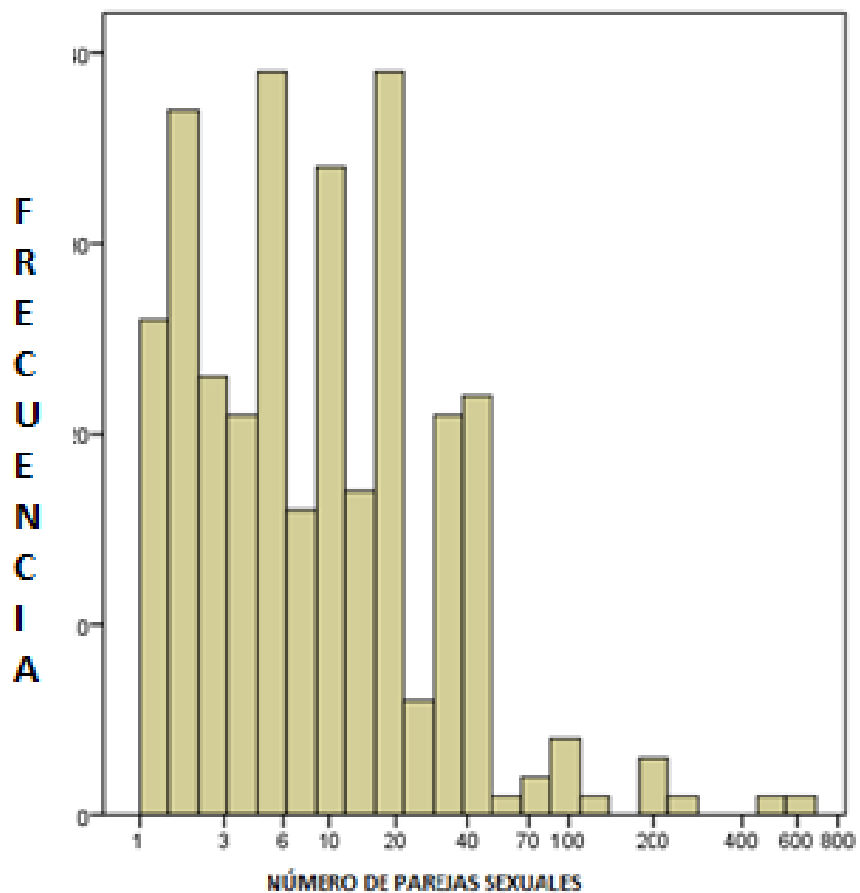


Figura 10. Número de Parejas sexuales de la población en estudio

El 74.5% utilizó de manera ocasional preservativo en sus contactos sexuales, 5.5% usaron en todos sus contactos sexuales (figura 11).

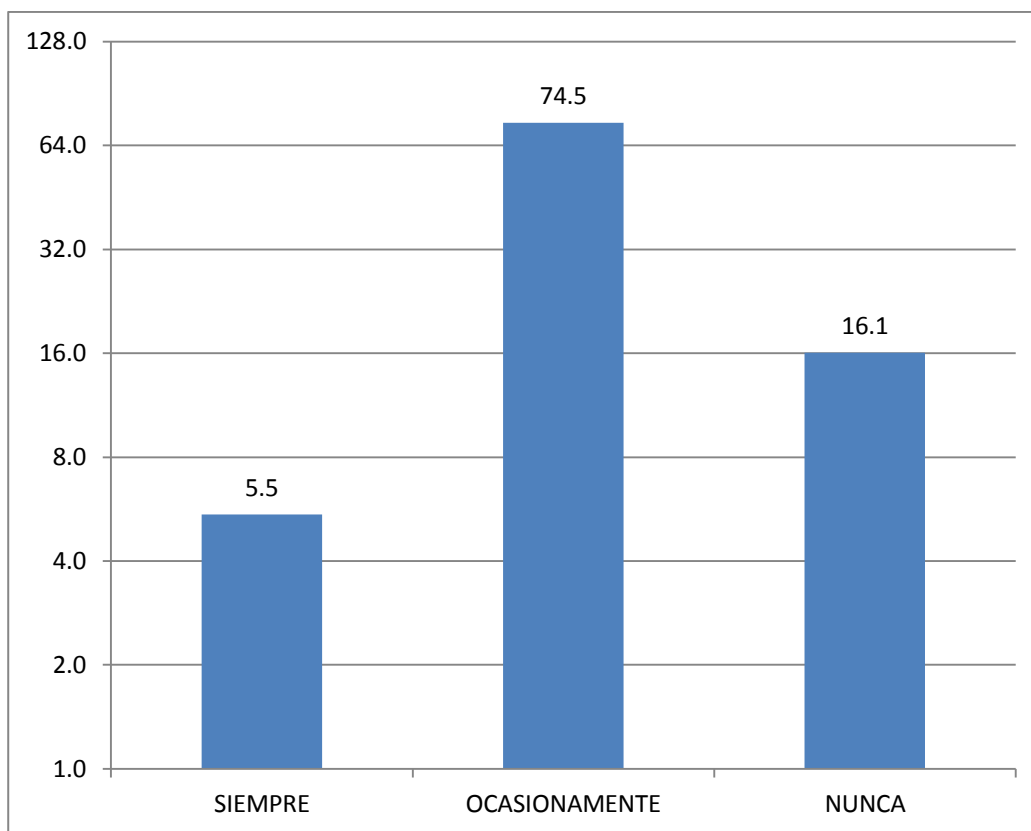


Figura 11. Frecuencia de uso de preservativo en la población.

De los 330 sujetos, 23.7% tuvieron ingesta regular de alcohol. En cuanto al consumo de drogas solo 11.7% tuvieron antecedente de consumo de drogas siendo, la cocaína y marihuana, las de mayor consumo (figura 12).

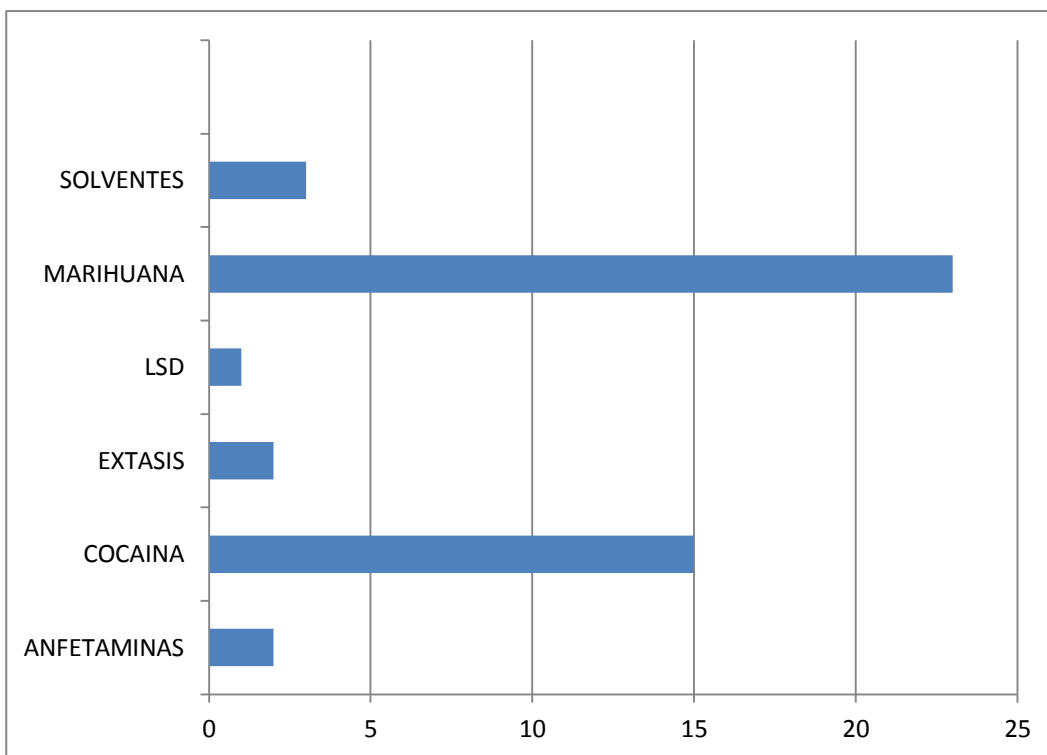


Figura 12. Drogas consumidas por la población.

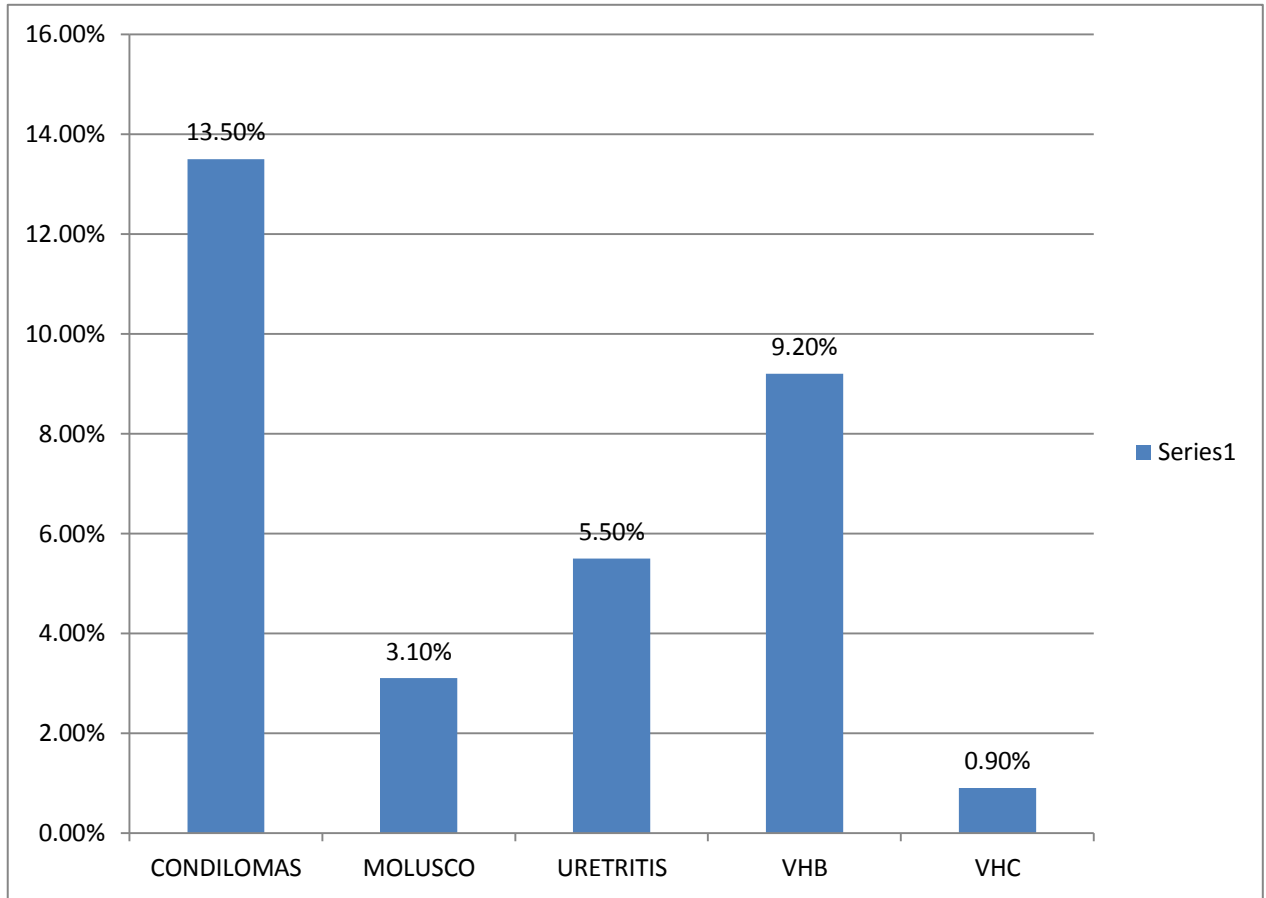


Figura 13. Prevalencia de otras infecciones de transmisión sexual en la población en estudio.

Respecto a otras ITS, se encontró que el 13.5% cursaron con infección por VPH, siendo los condilomas la presentación más frecuente. El 10 % presentó coinfección por VHB, encontrándose en menor proporción otras infecciones virales, como molusco contagioso (3.10%) y VHC (0.9%) (figura 13).

Respecto a la Infección por VIH, 204 pacientes (62%) fueron de reciente diagnóstico y el resto (38%) ya tenían diagnóstico previo (figura 14). La mediana de evolución con VIH fue 3.59años (IQR 0-5.0).

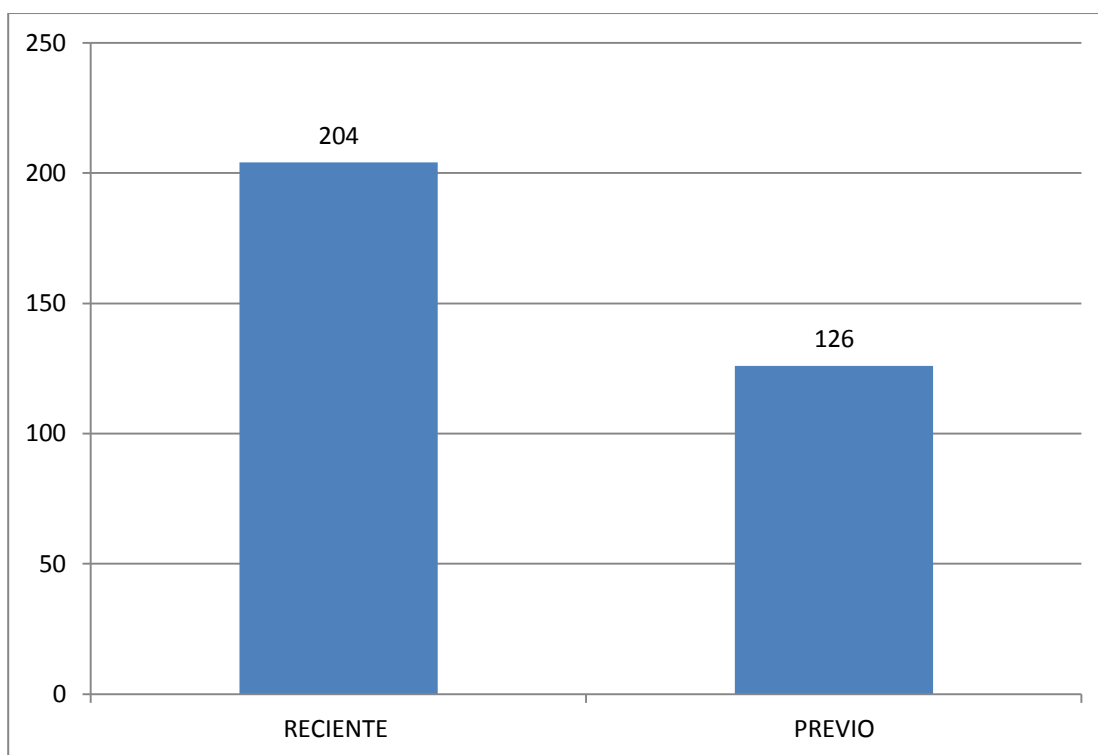


Figura 14. Número con respecto al tiempo de evolución del VIH

Respecto al estadio en que se encontraron los pacientes el 46.4% en estadio C3 de la CDC (Figura 15).

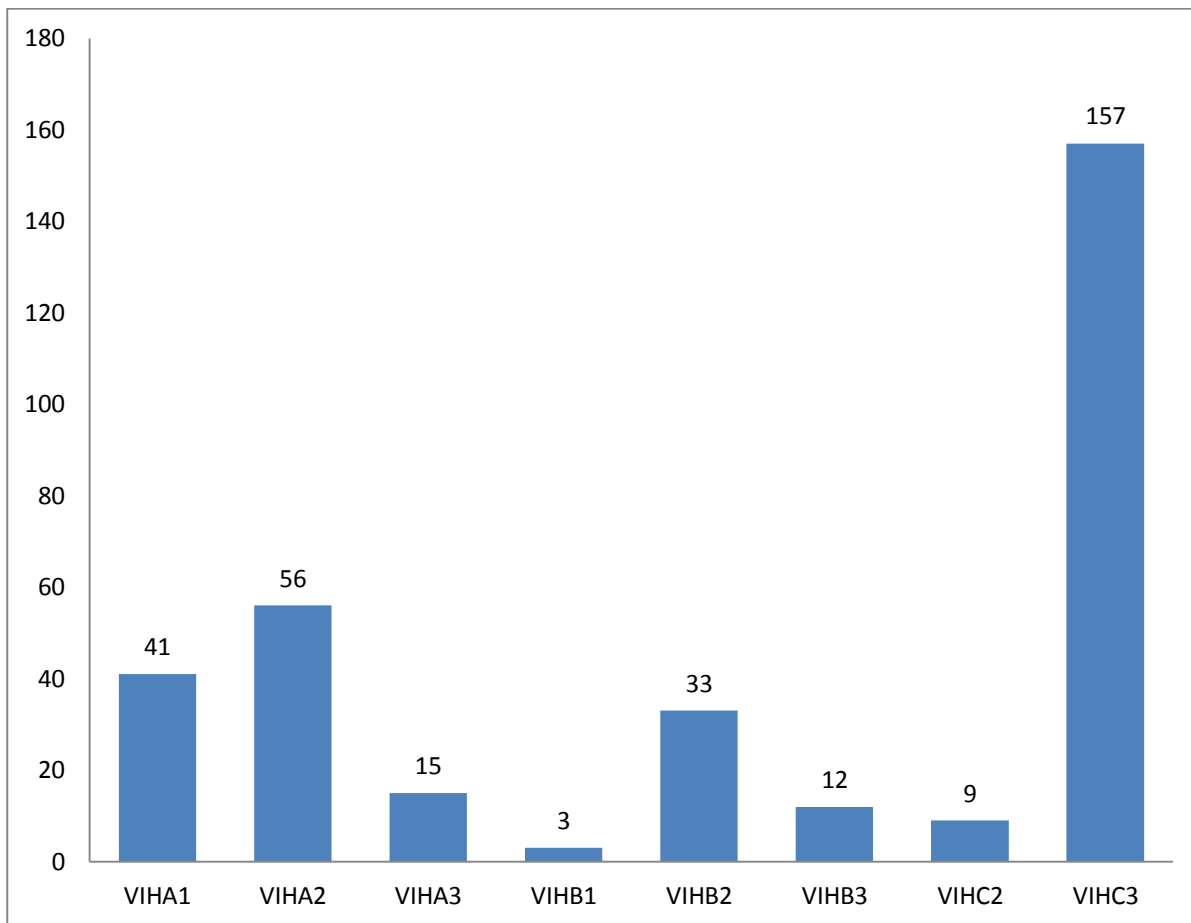


Figura 15. Estadios de infección por VIH en la población.

De los pacientes con VIH de diagnóstico reciente el 37.9% se encontraron en estadio C3.

De la población en estudio, la mediana basal de CD4 fue de 221 cel/mm³ (IQR 80-395.25), con un rango de variación de 1.00 a 1019 cel/mm³; los pacientes con VIH de reciente diagnóstico tuvieron una mediana basal de 217 cel/mm³ (IQR 64.5-382) y los sujetos con VIH C3 la mediana basal fue de 49 cel/mm³ (IQR 25-100). (figura 15 y 16).

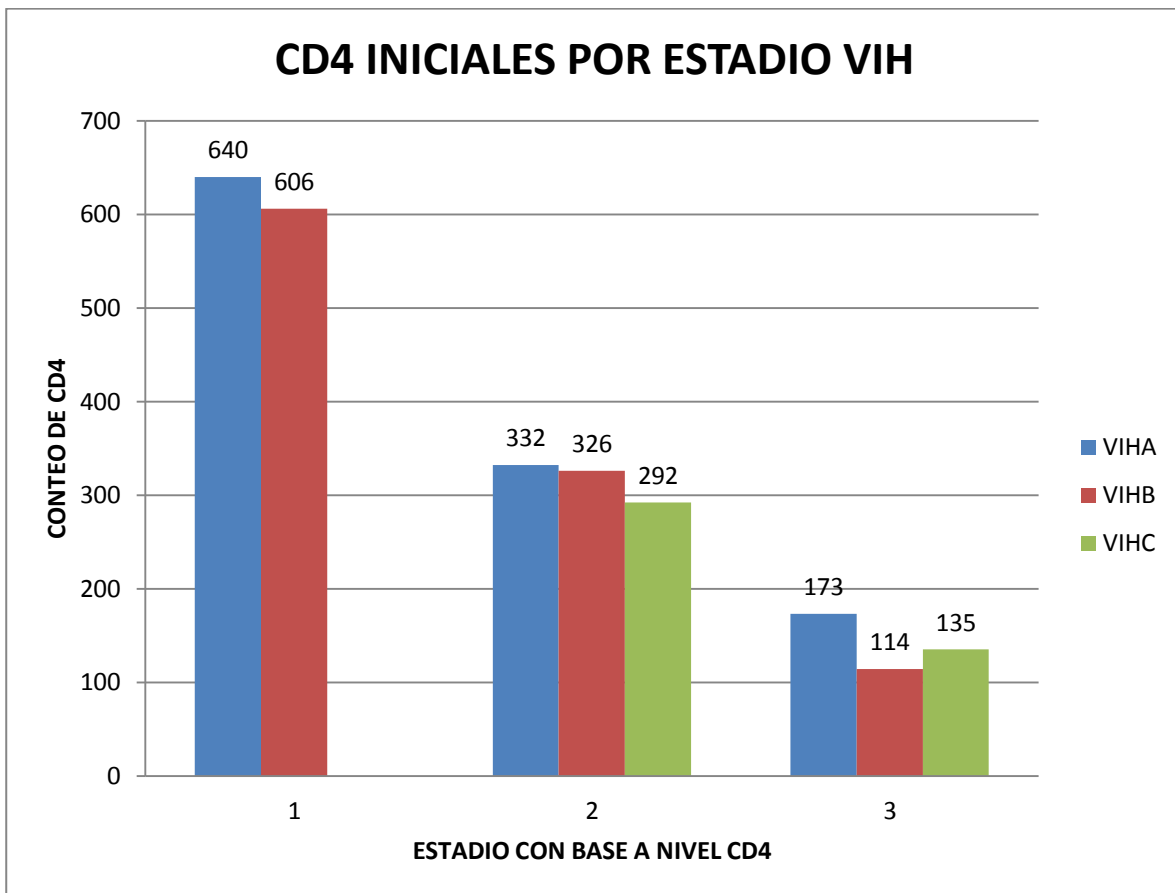


Figura 15. Conteo de CD4 inicial por estadio del CDC de la población general.

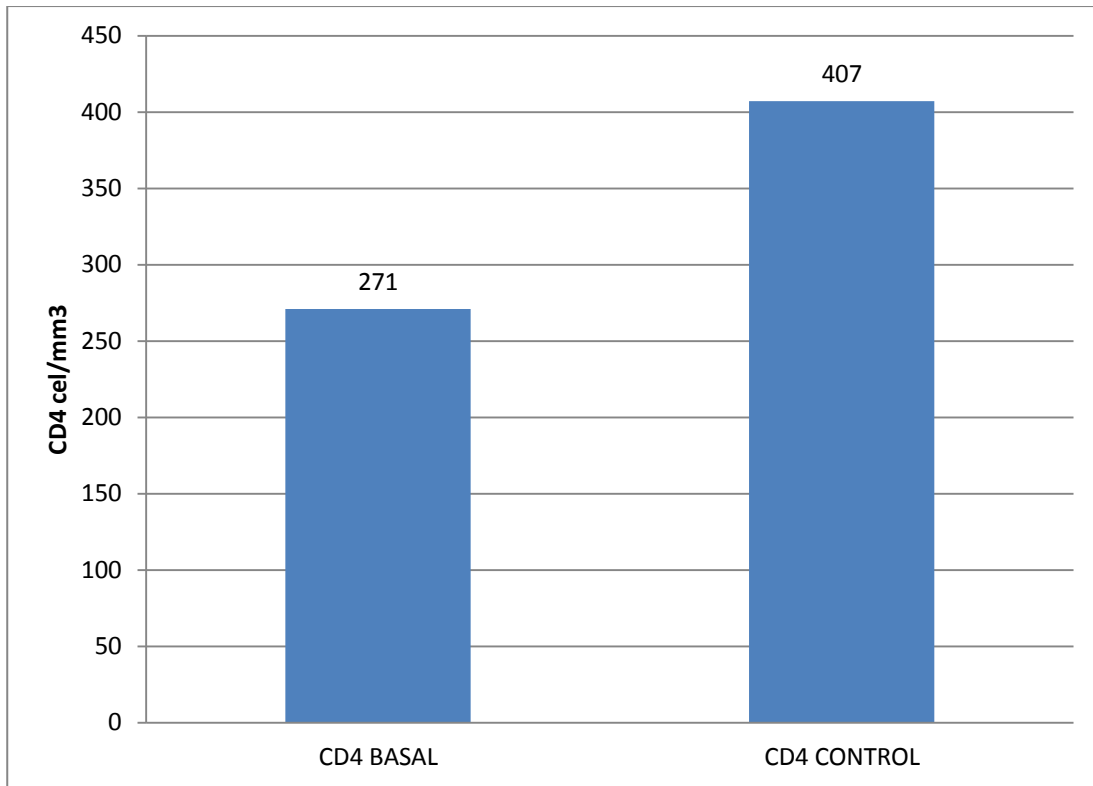


Figura 16. Conteo de CD4 inicial comparado con los CD4 control posterior al inicio de tratamiento.

La mediana de CD4 posterior al inicio de la terapia antirretroviral fue de 381.23 cel/mm³ (IQR 237-527), con un rango de variación de 10-1356cel/mm³, en la población general. En los pacientes catalogados como SIDA C3 la mediana de CD4 fue 236.5 cel/mm³ (IQR 46-450), con un rango de variación de 46 a 450 cel/mm³. Los sujetos en estadio B1 se encontró una disminución del 59% con respecto al basal (figura 17) .

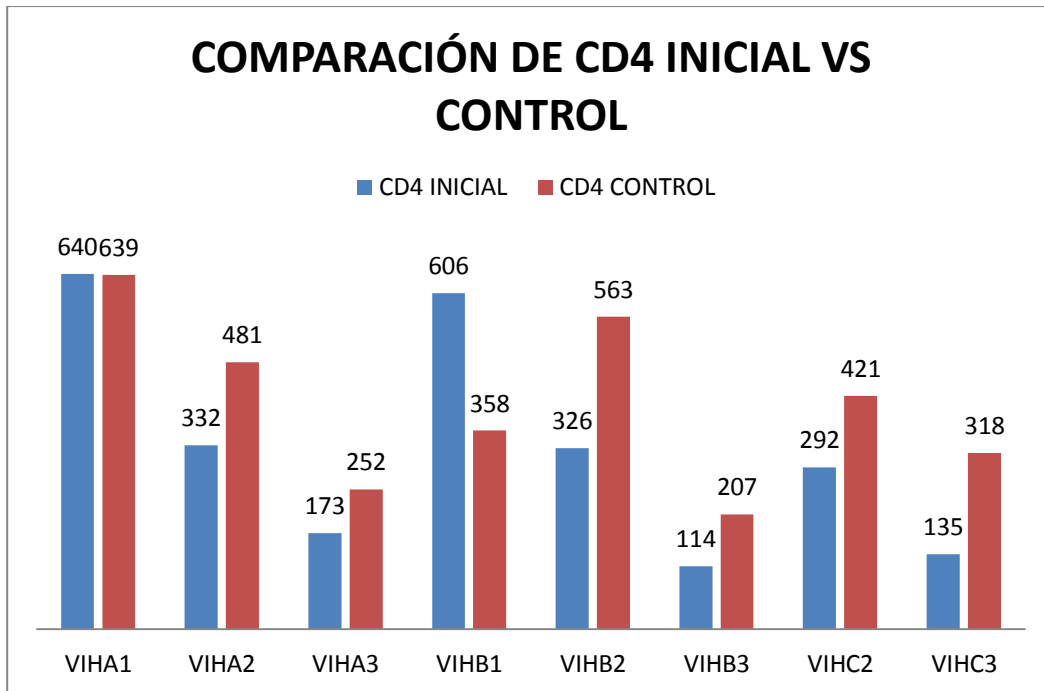


Figura 17. Conteo de CD4 inicial comparado con control por estadios de la población general.

En la población general la mediana de la carga viral basal fue de 70900 copias/ml (IQR 14070-287488), con un rango de variación de <50 copias/ml a 96383301 copias/ml, En sujetos con diagnóstico reciente la mediana fue de 97300 copias/ml (IQR 24550-329500) y en pacientes con diagnóstico previo fue de 25715 copias/ml (IQR 1375-115633.5).

La mediana CV posterior a inicio de tratamiento en la población general fue 31 copias/ml (IQR 0-217) con una rango de variación de 72600 copias/ml a 2795671 copias/ml; en pacientes con diagnóstico reciente se encontró una mediana de 90 copias (IQR 0 a 361) y de <50 copias/ml (IQR <50-90) en población con diagnóstico previo de VIH,

De los 330 pacientes, 81.7% se encontraban con carga viral menores de 400 copias/ml posterior al inicio de tratamiento.

El 77% de los sujetos se encontró en tratamiento antirretrovirales. El esquema más utilizado fue FTC/TDF + EFV, seguido por FTC/TDF + LPV/r (Tabla 1; figura 18).

ANTIRRETROVIRAL	ABREVIATURA
LAMIVUDINA	3TC
ABACAVIR	ABC
TENOFOVIR	TDF
EMTRICITABINA	FTC
ZIDOVUDINA	AZT
NEVIRAPINA	NVP
EFAVIRENZ	EFV
LOPINAVER/RITONAVIR	LPV/r
ATAZANAVIR/RITONAVIR	ATV/r
FOSAMPRENAVIR/RITONAVIR	FVP/r

TABLA 1. Antirretrovirales más utilizados en sujetos del estudio y abreviaturas usadas.

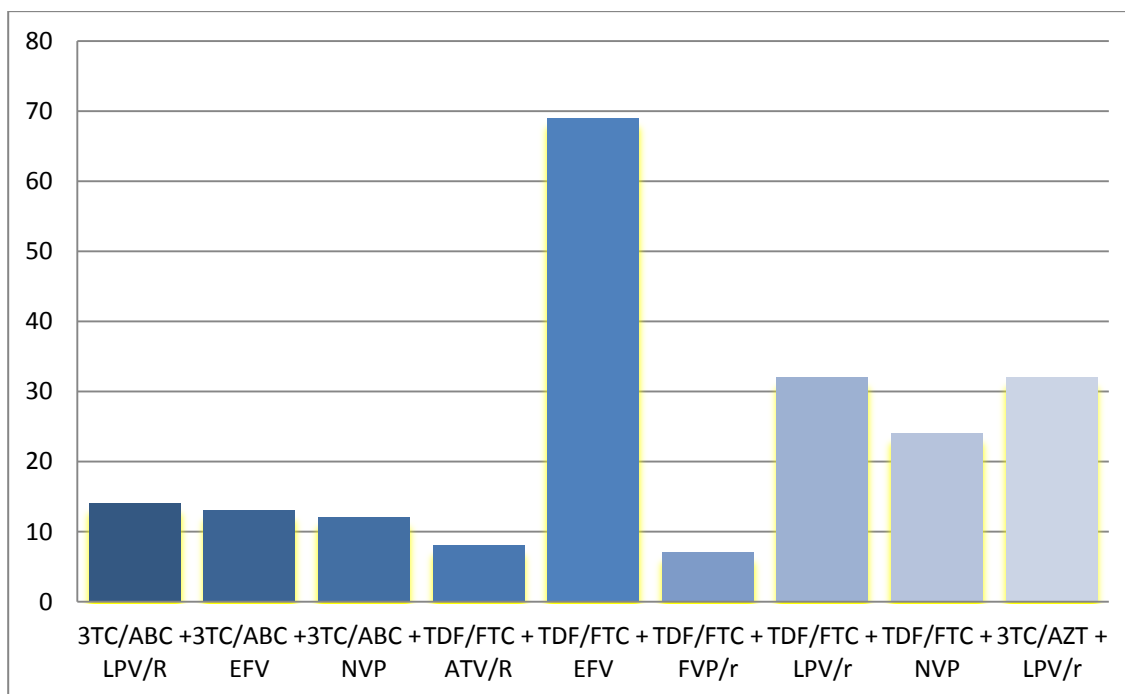


Figura 18. Esquemas antirretrovirales más utilizados en sujetos del estudio.

De la población en general el 26.7% tuvo anticuerpos antitreponema positivos. 20.3% VRDL reactivo. De los cuales 18.8% se diagnosticó con sífilis en cualquiera de sus etapas. (figura 19 y 20).

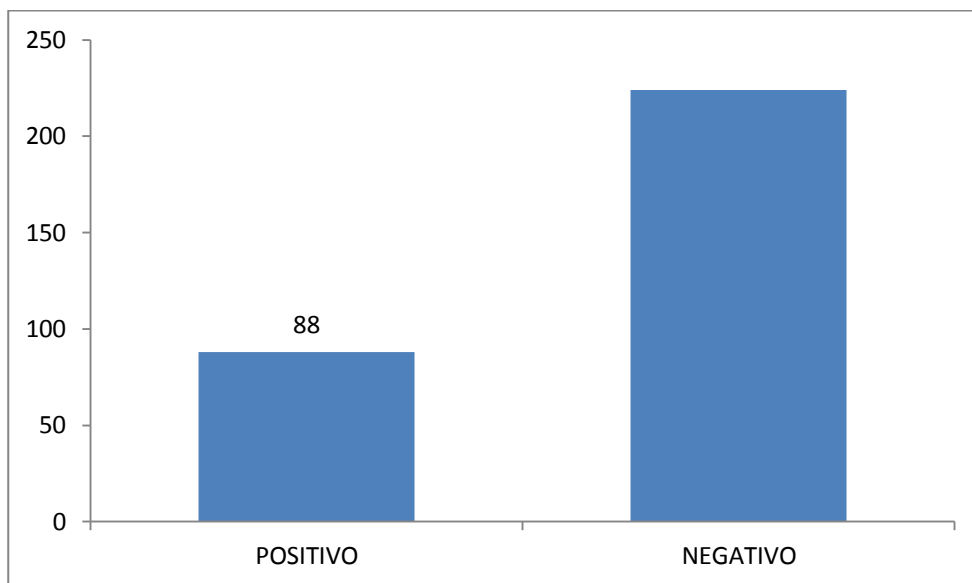


Figura 19. Número de pacientes con anticuerpos antitreponema positivos en la población de estudio

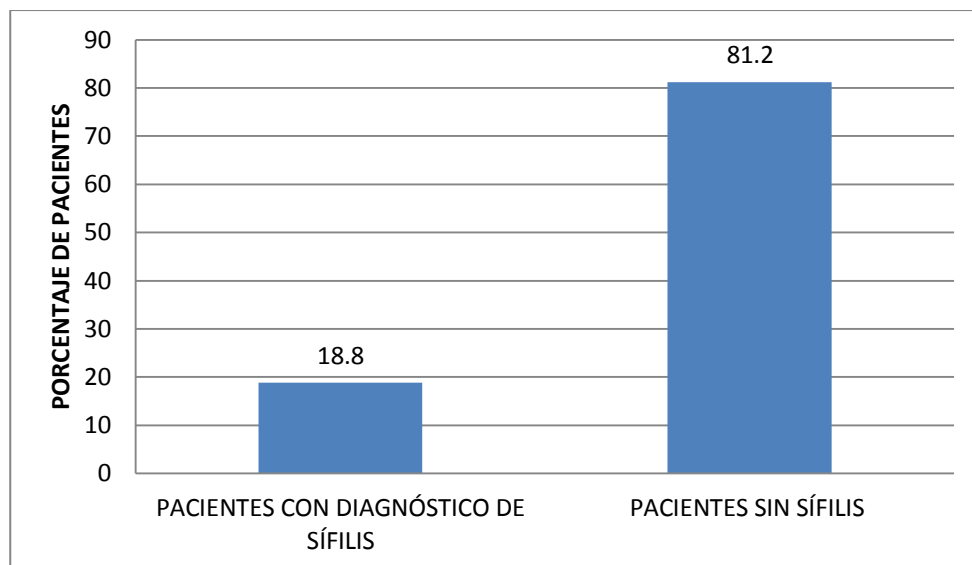


Figura 20. Porcentaje de pacientes con diagnóstico clínico y/o serológico en la población de estudio.

El 70.96% de los pacientes con sífilis se diagnosticó en etapa latente de tiempo desconocido. 11.2 en etapa secundaria y el 11.29% en etapa terciaria (figura 21).

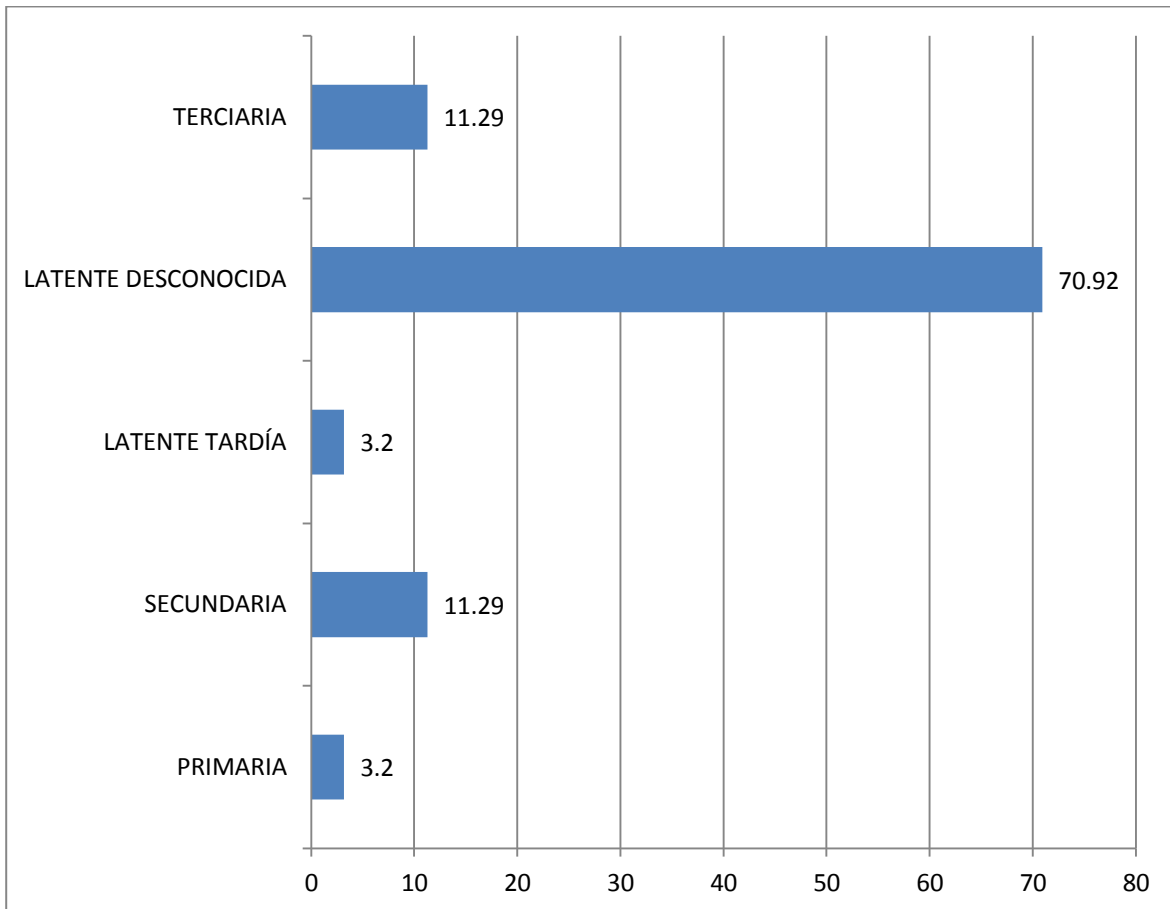


Figura 21. Número de casos por estadios clínicos de sífilis.

Se encontraron 10 (16.12%) casos de neurosífilis, 6 catalogados como terciarios y 3 en fases secundarias de sífilis. Solo en el 33.33% de los casos fueron sintomáticos. (figura 22).

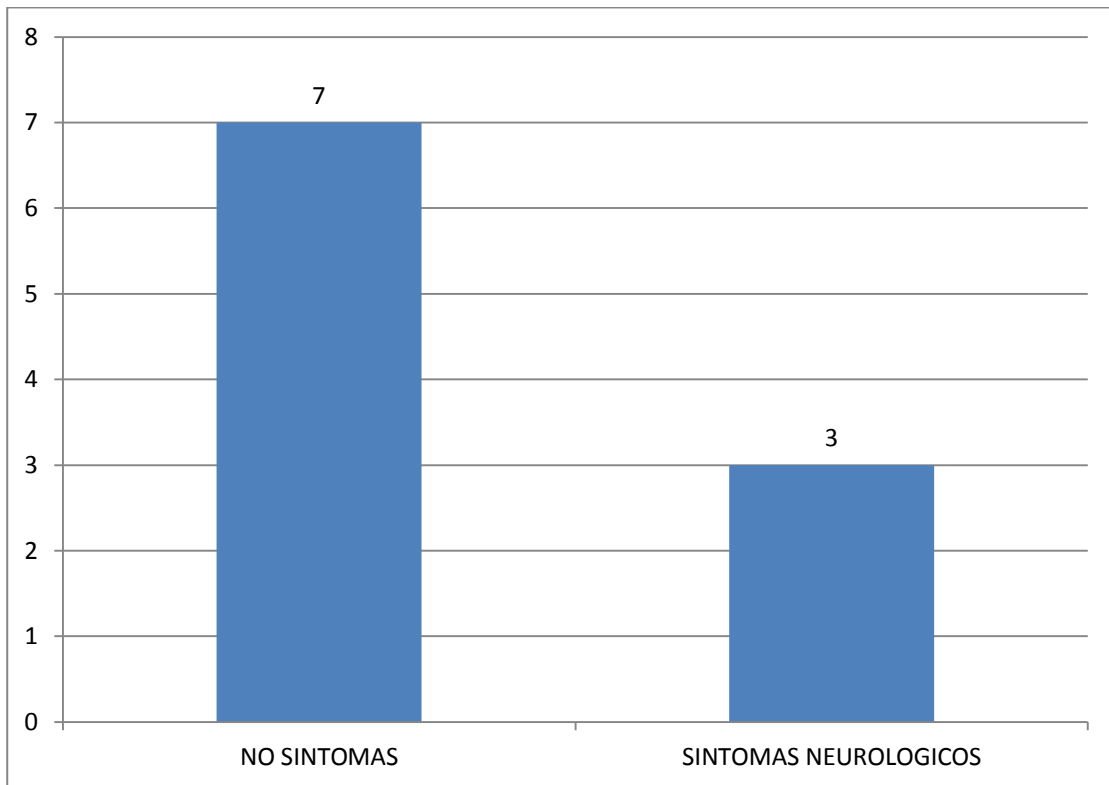


Figura 22. Casos de neurosífilis clasificados con base a la presencia o ausencia de síntomas.

48.38% de los casos de sífilis tenían CD4 menores a $200\text{cel}/\text{mm}^3$, el 90% tenían VRDL reactivo. La mediana en los títulos de VRDL sérico fue de 8 (IQR 2.5-16) con un rango de variación de 8 a 1848.

Se encontró en el 85.7 % de pacientes con sífilis terciaria, CD4 menores de $200\text{cel}/\text{mm}^3$ al momento de diagnóstico.

El 100% de los casos de sífilis se encontró en hombres, con una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al sexo de la población, $P < 0.001$. (TABLA 2)

Los 62 pacientes con diagnóstico de sífilis fueron mexicanos. Respecto al lugar de residencia el 64.5% viven en el DF y el 27.4% son residente del estado de México, sin embargo no hubo significancia estadística, $P < 0.81$.

50% de los sujetos con sífilis tenían un nivel de educación superior, siendo menor en sujetos sin sífilis, 35.5%, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa $P < 0.004$. (TABLA 2)

85.5% de los sujetos con sífilis son solteros, siendo menor en los pacientes sin sífilis, 67.4%, con significancia estadística $P < 0.024$ (TABLA 2).

77.4 % de pacientes con diagnóstico de sífilis son HSH, proporción mayor con significancia estadística, $P < 0.01$; 67.7% tuvieron un rol insertivo/receptivo, encontrando una P de 0.49. (TABLA 2)

59.7% tenían pareja inestables, porcentaje mayor comparado con la proporción de los pacientes sin sífilis, encontrando diferencia significativa, $p < 0.017$ (TABLA 2)

El 4.85% de los pacientes con sífilis, usaron condón en todos sus contactos sexuales, un 82.3% de estos sujetos emplean condón de manera irregular, sin significancia estadística, $P < 0.14$. (TABLA 2).

El abuso de alcohol fue del 32.3% en los sujetos con sífilis, comparativamente mayor en los sujetos sin diagnóstico de sífilis, 21.3%, sin diferencia estadísticamente significativa $P < 0.72$. Respecto al uso de drogas, no se encontró diferencia, el 11% tenía consumo en ambos grupos $P < 0.55$ (TABLA 2).

	SÍFILIS	SIN SÍFILIS	P
HOMBRE	100%	76.5%	<0.001
HSH	77.4%	55.2%	0.01
SOLTEROS	85.5%	67.4%	0.002
EDUACIÓN SUPERIOR	50%	36%	0.024
PREJAS SEXUALES INESTABLES	60.7%	44.5%	0.017
NACIONALIDAD MEXICANA	100%	98.5%	0.43
ROL INSERTIVO/RECEPTIVO	68.9%	50.6%	0.42
CONDÓN OCASIONAL	83.6%	76.2%	0.39
ALCOHOL	32.3%	21.7%	0.72
DROGAS	11.8%	11.3%	0.58

TABLA 2. Características demográficas de pacientes con sífilis.

Se encontró una mediana de edad de 33 años (IQR 28.5-39.5), mayor comparada con los pacientes sin sífilis, sin embargo no se encontró diferencia significativa P 0.83. (TABLA 3)

La mediana de inicio de vida sexual activa en sujetos con sífilis fue de 18 años (IQR 16-19), mayor que en los sujetos sin sífilis con una diferencia estadísticamente significativa, P 0.18. (TABLA 3)

La cantidad de parejas sexuales fue mayor en los pacientes con sífilis, encontrándose una mediana de 14 (IQR 6-30), que comparada con la mediana de 7 (IQR 3-20) en sujetos sin sífilis, se encontró significancia estadística, P < 0.001 (TABLA 3)

	SIFILIS	SIN SÍFILIS	P
EDAD	33 (IQR 28.5-39.5)	24 (IQR 27-42)	0.83
EDAD IVSA	18 (IQR 16-18)	18 (IQR 16-19)	0.18
No PAREJAS SEXUALES	14 (IQR 6-30)	7 IQR (3-20)	< 0.001

TABLA 3. Características demográficas de pacientes con sífilis.

Respecto a las características inmunológicas y virologías basales y de control posterior a inicio de tratamiento antirretroviral no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sujetos con y sin sífilis.

	SIFILIS	SIN SÍFILIS	P
CD4	269	215	0.63
BASAL	(IQR 112.5-370.75)	(IQR 74-395)	
cel/mm³			
CD4	358	385	0.28
CONTROL	(IQR 191-468)	(IQR 239-591)	
cel/mm³			
CARGA VIRAL	71847	70800	0.21
BASAL	(IQR 21151.75-	(IQR 8637-280500)	
Copias/ml	330250)		
CARGA VIRAL	60	23.5	0.19
CONTROL	(IQR 0.0-365)	(IQR 0.0-204.5)	
Copias/ml			

TABLA 4. Características inmunológicas y virales de los pacientes con sífilis en la población de estudio.

	SÍFILIS	SIN SÍFILIS	P
HEPATITIS B	16.1%	7.6%	0.03
HEPATITIS C	1.6%	0.8	0.47
VPH	19.4%	12.1%	0.24
URETRITIS	8.1%	4.9%	0.23

Tabla 4. Infecciones de transmisión sexual en la población.

Como se observa el porcentaje de otras ITS es mayor en los pacientes diagnosticados con sífilis sin embargo, solo infección por VHB existe una diferencia significativa.

DISCUSIÓN

Se incluyeron 330 pacientes, los cuales fueron atendidos por primera vez durante marzo del 2012 a marzo de 2013 y se realizó prueba de anticuerpos antitreponema como parte de la batería inicial de estudios de pacientes con infección por VIH.

La mediana de edad fue de 33 años (IQR 27-41), encontrándose en el rango de edad con mayor prevalencia de VIH a nivel nacional, CENSIDA reportó una prevalencia del 19.6% en el rango de 30-34 años, siendo en orden de frecuencia, el rango de 25-29 años, el segundo, con una prevalencia del 18%.

Predominó el sexo masculino, 80.9% de la población, encontrándose una proporción hombre: mujer de 4.2:1, la cual es similar a la reportada con la tendencia nacional, siendo, la infección por VIH, catalogada como predominantemente masculina (CENSIDA 2012b), el Registro Nacional de Casos de SIDA (CNRS) reportó que el 82% total de casos es en varones y en el 2011 la proporción encontrada fue de 4.6:1 (H: M).

El 5.5% de los sujetos del estudio mantiene relaciones protegidas, empleo de condón, en el 100% de los contactos. Cifras menores comparada con el 41% de uso de condón en hombres y 21 % de empleo de condón en mujeres, reportados en la Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT 2012). Mediciones recientes de la encuesta basal del proyecto del Fondo Mundial Ronda 9 establecen que en el grupo de HSH, 73% declaró usó condón en su última relación sexual anal con una pareja masculina (CENSIDA, 2012), mientras que en el proyecto comisionado al INSP por el CENSIDA, que se desarrolló en Jalisco (Zona Metropolitana de Guadalajara y Puerto Vallarta), Estado de México (ZM de Toluca, Ecatepec, y Netzahualcóyotl) y Veracruz (Veracruz y Coatzacoalcos-Minatitlán), 65.7% (IC 95%: 58.4 - 73.1) de los que resultaron seropositivos al VIH y 59.9% (IC 95%: 56.2 - 63.7)

de los no reactivos reportaron haber utilizado condón en su última relación sexual anal (Gutiérrez et al, 2012a).

La principal vía de contagio de la infección por VIH fue sexual, solo en 0.90% se documentó contagio por transmisión vertical. El 94% de los casos notificados de SIDA desde los inicios de la epidemia, pertenecen a la categoría de transmisión sexual, ya sea homosexual, bisexual o heterosexual. A nivel nacional se estima que el resto de las formas de contagio son del 1% de transmisión vertical y 2% en usuarios de drogas IV.

La mayor proporción los sujetos en estudio, 57.9%, son HSH. Comportamiento similar a la tendencia nacional. De acuerdo a estimaciones realizadas por CENSIDA, en México existen 150 mil personas adultas infectadas por el VIH, de las cuales más de 100 mil corresponden HSH, casi 40 mil a población heterosexual, casi 3 mil a usuarios de drogas inyectables. El 32% de los casos notificados de SIDA en hombres, cuya categoría de transmisión se conoce, refieren una categoría de transmisión por relaciones sexuales homosexuales y 22% bisexuales; así como 41% indica la vía heterosexual (considerar que podría estar sobre reportado dado que muchos hombres no se asumen homosexuales aunque tengan sexo con otros hombres).

La gran mayoría de los pacientes incluidos en el estudio son residentes del DF y estado de México, Entidades Federativas que concentran la mayor parte de los casos notificados históricamente de SIDA a nivel nacional, el Distrito Federal con 24,934 casos (15.6%), el Estado de México con 17,245 (10.8) (CENSIDA, 2012b).

69.4% de la población en estudio eran solteros. Considerado en diversos estudios como factor de riesgo para infección por VIH y otras enfermedades de transmisión sexual (Valdespino et. al, 2007).

Se encontró respecto uso de drogas una prevalencia mayor a la reportada a nivel nacional. Se reporta en la Encuesta Nacional de Adicciones 2011(ENA 2011) una prevalencia del 1.2%-2.8%, siendo en nuestra población del 11.6%. Siendo la la marihuana y cocaína, las de mayor consumo, similar a los reportado en la ENA 2011. La prevalencia de consumo de alcohol es mayor respecto a las cifras nacionales reportadas en ENA del 2008, en la cual se reportó de 5.5%.

El 46.4% se encontró en estadio avanzado, C3. Con un mediana de CD4 de la población general de 221(cel/mm³). Sin embargo en pacientes con diagnóstico reciente de VIH C3 la mediana basal de CD4 fue de 49(cel/mm³). En múltiples estudios realizados en países industrializados, reportan el diagnóstico en estadios avanzados de 15 al 43%; en Italia, Girardi et al, 2004, En un estudio de 968 pacientes, el 39% se contaba con CD4 <200 cel/mm³ al momento de diagnóstico; Sabin et al, 2004, en Inglaterra el 15 % de los pacientes de reciente diagnóstico tenían <50cel/mm³ Caro-Murillo et al, 2009, en España, encuentra una media al momento de diagnóstico de 345cel/mm³, sin embargo hasta el 11% de los sujetos tenían una enfermedad definitiva de SIDA.

Respecto a la carga viral, en la población general la mediana de la carga viral basal fue 70900 copias/ml (IQR 14070-287488). Cifra mayor que la reportada por Caro-Murillo, et al, 2009, mediana de 48.962 copias/ml.

El 81.7% de los sujetos, posterior a iniciar tratamiento, se encontró en control, con una CV mediana de 31copias/ml y 407 de CD4.

En los sujetos en estadio B1, se presentó un descenso del 59% de los CD4 basales, sin embargo, los sujetos al momento de la primer consulta no contaban con criterios para inicio de tratamiento.

Se encontró una seroprevalencia del 26.7%, sin embargo solo se diagnosticaron 62 casos de sífilis, que representan el 18.8%, 10 de los 330 pacientes tenían antecedente sífilis tratada, el porcentaje se puede explicar por pacientes que tuvieron infección y curación, la cual se presenta en mas del 50% de los casos sin recibir tratamiento. La diferencia 1.5% entre VDRL reactivo y los casos de sífilis, pueden explicare por las razones previamente expuestas. Cifras mayores que las reportada por CONASIDA,1992, encontrando una seroprevalencia del 15.1% en 1,371 sujetos.

La prevalencia de coinfección, VIH y sífilis, coincide con las reportadas en la literatura internacional. Sin embargo es importante aclarar que la tasa de coinfección varía en función de la prevalencia de cada una de estas enfermedades en la población analizada junto con los factores de riesgo individuales. En una revisión de 30 estudios en los que se analizaba la tasa de infección por el VIH en pacientes diagnosticados de sífilis en Estados Unidos, la mediana de seroprevalencia del VIH fue del 15.7% (25.7% en varones y 12.4% en mujeres), alcanzando tasas del 22.5-70.6% en usuarios de droga por vía parenteral y de hasta un 68-90% en HSH.

Un estudio español de 1.161 pacientes con VIH, la seroprevalencia de sífilis era del 13% y un 4% más se diagnosticó de sífilis durante un período de seguimiento de 38 meses. Un dato preocupante observado en diversos centros españoles es que hasta un 70% de los casos de sífilis se diagnostica en pacientes con infección por el VIH conocida, muchos de ellos en TARGA, lo que refleja una falta en las medidas de prevención de estos pacientes.

En un estudio de 3223 varones heterosexuales y 993 HSH, entre 2002 y 2008, en Israel, se informó una tasa de infección del 27%.

La sífilis latente de tiempo desconocido (70.96%) y la secundaria, fueron las etapas clínicas más encontradas en la población del estudio. Siendo reportadas como las formas más habituales de presentación en pacientes con VIH.

Solo se documentaron dos casos de sífilis primaria, sin embargo, en la literatura reporta el menor número de casos se debe a localizaciones extragenitales y falta de síntomas, dicha etapa pasa desapercibida por los pacientes y médico. A pesar de ser catalogada como la primer causa de úlceras genitales, principalmente en países subdesarrollados.

Las lesiones cutáneas son la manifestación más común del secundarismo sifilítico y generalmente consisten en una erupción cutánea maculopapular generalizada; forma de presentación en el 58% de los casos en nuestra población.

Se diagnosticaron 4 casos de uveítis, 3 de los cuales en pacientes con manifestaciones de secundarismo. Siendo esta una forma de presentación rara, sin embargo la afección ocular, fundamentalmente la uveítis, puede ocurrir en cualquier fase de la infección y en los individuos con VIH suele ser más grave.

La prevalencia de neurosífilis fue del 16.12%, cifra menor que la reportada por otros centros. En los pacientes con VIH, la afección del SNC es más frecuente. Un estudio español encontró una prevalencia de neurosífilis en pacientes VIH con sífilis no tratada del 23,5%. La afección del SNC en los individuos con VIH es frecuentemente asintomática. Similar a lo hallazgos en nuestra población, en la cual el 66% de los sujetos fueron asintomáticos.

En el 85.7% de los pacientes con neurosífilis se encontró una basal de CD4 menor de 200cel/mm³, lo cual puede explicarse por estudios recientes que reportan que los

pacientes con recuento de CD4 inferiores a 350 células/ml tiene 3 veces más riesgo de presentar afección a SNC.

Un aspecto importante a tener en cuenta cuando un paciente presenta coinfección por el VIH y la sífilis es el posible impacto que ésta puede ejercer en la situación inmunoviológica del individuo. La sífilis puede incrementar la activación inmunológica y la secreción de citocinas, y así favorecer la replicación del VIH, reportado por Bentwich Z, et. al 2000 . Además, las úlceras genitales pueden inducir un aumento de la carga viral y un descenso del recuento de linfocitos CD4. Estudios recientes han evidenciado un incremento de la carga viral y un descenso de los linfocitos CD4 en pacientes con VIH y sífilis precoz. En un estudio multicéntrico nacional en el que se incluyó a 118 pacientes con infección por el VIH diagnosticados de sífilis precoz, la carga viral aumentó en un 27,6% de los pacientes, y destacó que 11 (25,0%) de los que estaban suprimidos antes del episodio de sífilis, presentaron carga viral detectable durante éste, Palacios R, et al, 2006. Sin embargo, respecto a las características inmunoviológicas, CD4 y CV basales y de control, no se entró diferencia estadísticamente significativa, por lo que no podemos confirmar el impacto de la sífilis sobre el VIH.

Se encontró que el estado civil soltero, el ser hombre HSH, tener una licenciatura, el no tener una pareja sexual estable y tener un gran número de parejas sexuales son factores de riesgo para tener una coinfección por sífilis y VIH.

CONCLUSIONES

- La prevalencia de infección por sífilis y VIH es similar a la reportada en la literatura internacional.
- La sífilis latente es la forma de presentación clínica mas frecuente.
- La sífilis no modifica el estado inmunoviroológico en sujetos con VIH.
- Los HSH tiene mayor riesgo de adquirir ITS.
- En México hay un importante subregistro de sífilis y otras ITS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cohen M. HIV and sexually transmitted diseases: lethal synergy. *Top HIV Med.* 2004 Oct-Nov; 12(4):104-7.
2. García-Lechuz J, Rivera M, Catalán P, Sánchez-Carrillo C, Rodríguez-Creixems M, Bouza E. Differences in curable STDs between HIV and non- HIV populations in Spain. *AIDS Patient Care STDS.* 1999 Mar;13(3):175-7.
3. Golden MR, Marra CM, Holmes KK. Update on syphilis: resurgence of an old problem. *JAMA.* 2003 Sep 17;290(11):1510-14.
4. Fenton KA, Imrie J. Increasing rates of sexually transmitted diseases in homosexual men in western Europe and the United States: why? *Infect Dis Clin North Am.* 2005 Jun;19(2):311-31.
5. Fenton KA. A multilevel approach to understanding the resurgence and evolution of infectious syphilis in western Europe. *Euro Surveill.* 2004 Dec;9(12):3-4.
6. Fenton K, Lowndes C. Recent trends in the epidemiology of sexually transmitted infections in the European Union. *Sex Transm Infect.* 2004 Aug;80(4):255-63.
7. Gerbase AC, Rowley JT, Heymann DH, Berkley SF, Piot P. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. *Sex Transm Infect.* 1998 Jun;74 Suppl 1:S12-6
8. Teodoro Carrada Bravo. Sífilis: actualidad, diagnóstico y tratamiento. *Rev Fac Med UNAM.* 2004 Nov-Dic;46(6):236-41.
9. Clark EG, Danbolt N. The Oslo study of the natural course of untreated syphilis: an epidemiologic investigation based on re-study of the Boeck- Bruusgaard material. *Clin Microbiol Rev.* 1999 April; 12(2): 187–209.

10. Centurion-Lara A, Castro C, Castillo R, Shaff er JM, Van Voorhis WC, Lukehart SA. The fl anking region sequences of the 15-kDa lipoprotein gene diff erentiate pathogenic treponemes. *J Infect Dis*. 1998 Apr;177(4):1036-40.
11. Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Jan;19(1):29-49.
12. Stamm LV. Biology of *Treponema pallidum*. In: Holmes KK, Sparling PR, Mardh P-A, et al, eds. Sexually transmitted diseases, 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1998- p 467–72.
13. Hovind-Hougen, K. Further observations on the ultrastructure of *Treponema pallidum* Nichols. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 80:297-304.
14. Hovind-Hougen, K., and A. Birch-Andersen Electron microscopy of endoflagella and microtubules in *Treponema Reiter*. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*. 1971 Nov;79(1):37-50..
- 15 Cox DL, Chang P, McDowall AW, Radolf JD. The outer membrane, not a coat of host proteins, limits antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. *Infect Immun*. 1992 Mar;60(3):1076-83.
16. Penn, C. W. Pathogenicity and immunobiology of *Treponema pallidum*. *J Med Microbiol*. 1987 Aug;24(1):1-9.
17. Penn, C. W., and J. G. Rhodes. Surface-associated antigens of *Treponema pallidum* concealed by an inert outer layer. *Immunology*. 1982 May;46(1):9-16..
18. Fieldsteel, A. H., D. L. Cox, and R. A. Moeckli. Cultivation of virulent *Treponema pallidum* in tissue culture. *Infect. Infect Immun*. 1982 Apr;36(1):437-9.
19. Fieldsteel, A. H., D. L. Cox, and R. A. Moeckli. Further studies on replication of virulent *Treponema pallidum* in tissue cultures of SfEp cells. *Infect Immun*. 1982 Feb;35(2):449-55.

20. Cumberland, M. C., and T. B. Turner. The rate of multiplication of *Treponema pallidum* in normal and immune rabbits. *Am J Syph Gonorrhea Vener Dis.* 1949 May;33(3):201-12.
21. Gherardini, F. C., M. M. Hobbs, L. V. Stamm, and P. J. Bassford. Complementation of an *Escherichia coli* proC mutation by a gene cloned from *Treponema pallidum*. *J Bacteriol.* 1990 Jun;172(6):2996-3002.
22. Norris SJ. Polypeptides of *Treponema pallidum*: Progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Microbiol Rev.* 1993 Sep;57(3):750-79
23. Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Surface antigens of the syphilis spirochete and their potential as virulence determinants. *Emerg Infect Dis.* 1997 Jan-Mar;3(1):11-20.
24. MacNab, R. M., and D. J. deRosier. Bacterial flagellar structure and function. *Can J Microbiol.* 1988 Apr;34(4):442-51
25. Namba, K., I. Yamashita, and F. Vonderviszt. Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature.* 1989 Dec 7;342(6250):648-54.
26. Blanco, D. R., C. I. Champion, J. N. Miller, and M. A. Lovett. Antigenic and structural characterization of *Treponema pallidum* (Nichols strain) endoflagella. *Infect Immun.* 1988 Jan;56(1):168-75.
27. Norris, S. J., N. W. Charon, R. G. Cook, M. D. Fuentes, and R. J. Limberger. Antigenic relatedness and N-terminal sequence homology define two classes of periplasmic flagellar proteins of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* and *Treponema phagedenis*. *J Bacteriol.* 1988 Sep;170(9):4072-82.
28. Penn, C. W., M. J. Bailey, and A. Cockayne. The axial filament antigen of *Treponema pallidum*. *Immunology.* 1985 Apr;54(4):635-41.
29. Cockayne, A., M. J. Bailey, and C. W. Penn. Analysis of sheath and core structures of the axial filament of *Treponema pallidum*. *J Gen Microbiol.* 1987 Jun; 133(6):1397-407.

30. Baseman, J. B., and E. C. Hayes. Molecular characterization of receptor binding proteins and immunogens of virulent *Treponema pallidum*. *J Exp Med*. 1980 Mar 1;151(3):573-86..
31. Baughn, R. E. 1987. Role of fibronectin in the pathogenesis of syphilis. *Rev Infect Dis*. 1987 Jul-Aug;9 Suppl 4:S372-85.
32. Peterson, K., J. B. Baseman, and J. F. Alderete. Molecular cloning of *Treponema pallidum* envelope fibronectin binding proteins, P1 and P2. *Genitourin Med*. 1987 Dec;63(6):355-60.
33. Hindersson, P., J. D. Knudsen, and N. H. Axelsen. Cloning and expression of *Treponema pallidum* common antigen (Tp-4) in *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol*. 1987 Mar; 133(3):587-96.
34. Houston, L. S., R. G. Cook, and S. J. Norris. Isolation and characterization of a *Treponema pallidum* major 60-kilodalton protein resembling the GroEL protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1990 Jun;172(6):2862-70.
35. Masuda, K., and T. Kawata. Isolation and characterization of cytoplasmic fibrils from treponemes. *Microbiol Immunol*. 1989;33(8):619-30.
36. Radolf, J. D., C. Moomaw, C. A. Slaughter, and M. V. Norgard. Penicillin-binding proteins and peptidoglycan of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Infect Immun*. 1989 Apr;57(4):1248-54.
37. Stamm, L. V., and P. J. Bassford. Cellular and extracellular protein antigens of *Treponema pallidum* synthesized during in vitro incubation of freshly extracted organisms. *Infect Immun*. 1985 Mar;47(3):799-807.

38. Stamm, L. V., R. L. Hodinka, P. B. Wyrick, and P. J. Bassford, Jr. Changes in the cell surface properties of *Treponema pallidum* that occur during in vitro incubation of freshly extracted organisms. *Infect Immun*. 1987 Sep;55(9):2255-61..
39. Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Surface antigens of the syphilis spirochete and their potential as virulence determinants. *Emerg Infect Dis*. 1997 Jan-Mar;3(1):11-20..
40. Salazar JC, Hazlett KRO, Radolf JD. The immune response to infection with *Treponema pallidum*, the stealth pathogen. *Microbes Infect*. 2002 Sep;4(11):1133-40 .
41. Zarakolu P, Buchanan I, Tam M, et al. Preliminary evaluation of an immunochromatographic strip test for specific *Treponema pallidum* antibodies. *J Clin Microbiol*. 2002 Aug;40(8):3064-5.
42. DiCarlo RP, Martin DH. The clinical diagnosis of genital ulcer disease in men. *Clin Infect Dis*. 1997 Aug;25(2):292-8.
43. Rompalo AM, Joesoef MR, O'Donnell JA, et al, Syphilis and HIV Study Group. Clinical manifestations of early syphilis by HIV status and gender: results of the syphilis and HIV study. *Sex Transm Dis*. 2001 Mar;28(3):158-65.
14. Hutchinson CM, Hook EW III, Shepherd M, Verley J, Rompalo AM. Altered clinical presentation of early syphilis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Ann Intern Med*. 1994 Jul 15;121(2):94-100.
45. Schofer H, Imhof M, Thoma-Greber E, et al, The German AIDS Study Group (GASG). Active syphilis in HIV infection: a multicentre retrospective survey. *Genitourin Med*. 1996 Jun;72(3):176-81.
- 46 Stamm LV. Biology of *Treponema pallidum*. In: Holmes KK,. Sparling PR, Mardh P-A, et al, eds. *Sexually transmitted diseases*, 3rd edn. New York: McGraw-Hill, 1998: 467–72.

47. Singh AE, Romanowski B. Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Apr;12(2):187-209.
48. LaFond RE, Molini BJ, Van Voorhis WC, Lukehart SA. Antigenic variation of TprK V regions abrogates specific antibody binding in syphilis. *Infect Immun.* 2006 Nov;74(11):6244-51
49. Gjestland T. The Oslo study of untreated syphilis; an epidemiologic investigation of the natural course of the syphilitic infection based upon a re-study of the Boeck-Bruusgaard material. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* 1955;35(Suppl 34):3-368; Annex I-LVI.
50. Baeten JM, Overbaugh J. Measuring the infectiousness of persons with HIV-1: opportunities for preventing sexual HIV-1 transmission. *Curr HIV Res.* 2003 Jan;1(1):69-86.
51. Buchacz K, Patel P, Taylor M, et al. Syphilis increases HIV viral load and decreases CD4 cell counts in HIV-infected patients with new syphilis infections. *AIDS.* 2004 Oct 21;18(15):2075-9.
52. Kofoed K, Gerstoft J, Mathiesen LR, Benfield T. Syphilis and human immunodeficiency virus (HIV)-1 coinfection: influence on CD4 T-cell count, HIV-1 viral load, and treatment response. *Sex Transm Dis.* 2006 Mar;33(3):143-8.
53. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, et al, Rakai Project Study Group. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med.* 2000 Mar 30;342(13):921-9. .
54. Cohen Stuart JW, Wensing AM, Kovacs C, et al. Transient relapses (“blips”) of plasma HIV RNA levels during HAART are associated with drug resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001 Oct 1;28(2):105-13.

55. Edward W. Hook, III, M.D., and Rosanna W. Peeling, Ph.D Syphilis Control — A Continuing Challenge. *N Engl J Med.* 2004 Jul 8;351(2):122-4.
56. Engelman J, Jensen TP, Klausner JD Syphilis in the United States: an update for clinicians with an emphasis on HIV coinfection. Zetola NM. *Mayo Clin Proc.* Sep, 82 (9), 2007: 1091-102.
57. Rómulo Breban, Virginie Supervie doctorado un, Justin T Okano MS un, Raffaele Vardavas doctorado un, PhD prof Sally soplador Syphilis Control — A Continuing Challenge. *Lancet Infect Dis.* 2008 Sep;8(9):577-81
58. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev.* 1995 Jan;8(1):1-21.
59. Seña AC, White BL. Novel Treponema pallidum serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. Sparling PF. *Clin Infect Dis.* 2010 Sep 15;51(6):700-8.
60. Ana Cecilia Sanguineti-Díaz, Juan Rodríguez-Tafur-Dávila. Actualización en el diagnóstico de la sífilis. *Dermatol Perú* 2004 Dic14: 192-199.
61. JE de Kaplan, C de Benson, Holmes KH, et al. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep.* 2009 Apr 10;58(RR-4):1-207
62. NORMA Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-2010, Para la prevención y el control de la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
63. NORMA Oficial Mexicana NOM-039-SSA2-2002, Para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual.

CRONOGRAMA

2012-2013

Actividad	Nov 2012	Dic 2012	Ene 2013	Feb 2013	Mar 2013	Abr 2013	May 2013	Jun 2013	Jul 2013	Ago 2013
Búsqueda y estudio de la bibliografía										
Revisión por el comité de investigación en Salud										
Revisión de expedientes										
Análisis estadístico										
Redacción y presentación de resultados										

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por ser un estudio retrospectivo y observacional no se requiere carta de consentimiento informado.

ANEXO 1.

VENEREAL DISEASE RESEARCH LABORATORY (VDRL)

Es una reacción de floculación, donde el antígeno utilizado está compuesto por colesterol, lecitina y cardiopina.

Esta prueba no treponémica mide anticuerpos antilipídicos; IgG e IgM, los cuales son formados por el huésped en respuesta al material lipídico liberado de las células huésped dañadas en la infección por TP y material lipídico de la superficie celular treponémica.

A causa del antígeno utilizado, esta prueba reacciona frente a otras patologías: colagenopatías, parasitosis, drogadicción o en determinadas condiciones fisiológicas como embarazo, vejez, etc. Tiene gran sensibilidad y baja especificidad.

Reactivos:

- 1) Antígeno de VDRL: Es una solución alcohólica de 0,03% de cardiopina, 0,9% de colesterol y 0,21% +/- 0,01% de lecitina.
- 2) Buffer salino VDRL, pH 6,0 +/- 0,1 (1,0% NaCl).
Puede ser comprado o preparado en el laboratorio (ver tabla siguiente)
- 3) Sueros controles:
Control reactivo (R), débil reactivo (D) y no reactivo (N).
Para la realización de las pruebas cuantitativas el suero control debe tener un título de al menos 4 diis.
- 4) Solución Salina 0,9%: Agregar a cada 100ml de agua destilada 0,9 gr de NaCl.
- 5) Solución Salina 10,0%: Agregar a cada 100ml de agua destilada 10 gr de NaCl.

Equipamiento:

- 1) Placas de vidrio:
 - a) Suero: Placa de vidrio de 2 x 3 pulgadas (50 X 76 mm aproximadamente) con 12 círculos planos (no cóncavos) de 14mm de diámetro. El perímetro de cada círculo debe tener un espesor tal que evite el traspaso del suero de un anillo a otro.
 - b) Líquido cefalorraquídeo:
 - 1) Placa de vidrio como la descrita para suero.
 - 2) Placa Kline de vidrio de 3 x 2 ¼ pulgadas (76 mm x 25 mm aproximadamente) x 3 mm de espesor, con 12 concavidades de 16 mm de diámetro y 1,75 mm de profundidad.
 - 2) Rotador mecánico ajustable a 180 \pm 2 r.p.m. que circunscriba un círculo de 19 mm de diámetro sobre el plano horizontal.
 - 3) Agujas no descartables calibradas (Ver Preparación y Calibración de Agujas, pag. 17)

Para dispensar el antígeno sobre el suero: calibre 18

Para dispensar el antígeno sobre el líquido cefalorraquídeo: calibre 21 ó 22.

Si no se disponen de agujas, se pueden utilizar pipetas automáticas considerando que se hallen bien calibradas.

- 4) Un frasco de vidrio para la preparación del antígeno de VDRL, de 30 ml de capacidad de 35 mm de diámetro con tapa de vidrio base plana. Nota: Como este tipo de frasco resulta difícil de conseguir en el comercio se recomienda un Erlenmeyer de vidrio de 25 ml con tapa de vidrio
- 5) Microscopio con ocular de 10X y objetivo 10X
- 6) Pipetas graduada:
 - 1,0 ml graduada en 1/100
 - 5,0 ml graduada en 1/10
 - 10,0 ml graduada en 1/10

Conservación del suero:

Conservar el suero límpido, separado del coágulo, en heladera (2 - 8 °C) o congelado (-20 °C) si la determinación demorará más de 5 días. Evitar el congelamiento y descongelamiento de los especímenes.

Las muestras con contaminación bacteriana o hemólisis excesiva son insatisfactorias para el ensayo.

Preparación del suero:

Calentar a 56 °C en baño de María durante 30 minutos.

Los sueros que se analicen después de 4 hs del primer período de calentamiento, deben volver a calentarse a 56 °C durante 10 minutos.

NOTA: Las pruebas de floculación para la sífilis son afectadas por la temperatura ambiente (Ta). Para obtener resultados confiables y reproducibles, las muestras de suero control, el antígeno y los sueros a testear deben estar a una Ta de 23 a 29 °C en el momento de la determinación.

REACCION DE VDRL CUALITATIVA, EN SUERO

Preparación de la Suspensión del Antígeno VDRL:

- 1) Al momento de preparar la suspensión todos los reactivos deben estar entre 23° y 29°C.
- 2) Pipetear 0,4ml de Buffer salino VDRL y agregarlo al fondo del frasco de 30 ml o del erlenmeyer de 25ml.
- 3) Agregar 0,5 ml de suspensión de antígeno (de la mitad inferior de una pipeta 1 ml graduada hasta la punta) directamente sobre la solución salina mientras se hace girar el frasco suave pero continuamente sobre una superficie plana.

NOTA: El antígeno se añade gota a gota, de modo que se permita unos seis segundos para los 0,5ml de antígeno. La punta de la pipeta debe quedar en el tercio superior del frasco y la rotación no debe ser tan vigorosa que salpique la pipeta con la solución salina. Se obtendrá la velocidad de rotación adecuada cuando el centro del frasco describa un círculo de 5 cm de diámetro, unas tres veces por segundo.

- 4) Expeler la última gota de antígeno de la pipeta sin que esta toque la solución salina.
- 5) Proseguir con la rotación del frasco durante 10 segundos.
- 6) Con una pipeta de 5ml añadir 4,1ml de buffer.
- 7) Tapar el frasco y agitar de abajo hacia arriba y viceversa unas 30 veces en 10 segundos.
- 8) La suspensión de antígeno está lista y puede ser utilizada durante un día (8Hs).
- 9) Cada vez que se utilice la suspensión agitarla suavemente. No debe mezclarse haciéndola pasar a la fuerza de un lado a otro de la jeringa y la aguja, puesto que podría ocasionar la ruptura de partículas y la pérdida de reactividad.

Procedimiento:

- 1) En un anillo de 14 mm de la placa, depositar con pipeta 50 µl de suero calentado.
- 2) Añadir 1 gota (1/60 de ml) de suspensión de antígeno (previamente resuspendida) sobre cada suero, con una aguja no descartable calibrada sin bisel de calibre 18 .
- 3) Rotar las placas durante 4 minutos a 180 \pm 2 rpm sobre un rotador mecánico.
- 4) Leer la reacción al microscopio con ocular de 10X y objetivo de 10X.
- 5) Informar el resultado como:
REACTIVO: formación de flóculos medianos o grandes.
DÉBIL REACTIVO: pequeños flóculos.
NO REACTIVO: ausencia de floculación o ligeramente rugoso.

REACCION DE VDRL CUANTITATIVA, EN SUERO

Todos los sueros que produzcan resultado reactivo, débil reactivo o no reactivo ligeramente rugoso en la reacción de VDRL en placa, deben analizarse de nuevo cuantitativamente hasta un título en dilución final.

Las diluciones de suero que deben analizarse son: sin diluir (1:1), 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16. En casos especiales continuar hasta 1:256.

- 1) Para cada muestra a ser testada, colocar 50 µl de NaCl al 0,9 % en los círculos 2 a 5.
- 2) Colocar 50 µl del suero a testar en los círculos 1 y 2.
- 3) Mezclar la solución salina y el suero en el círculo 2 utilizando la pipeta automática, por aspiración y eliminación, 8 veces. Evitar la formación de burbujas.
- 4) Transferir 50 µl del círculo 2 (1:2) al círculo 3 (1:4), mezclar como en el paso 3.

Transferir 50 µl del círculo 3 (1:4) al círculo 4 (1:8), mezclar como en el paso 3.

Transferir 50 µl del círculo 4 (1:8) al círculo 5 (1:16), mezclar como en el paso 3 y descartar 50 µl.

5) Resuspender suavemente la suspensión antigénica. Sosteniendo el frasco del antígeno en posición vertical, dispensar 1 ó 2 gotas a fin de liberar el pico vertedor de aire, y luego colocar exactamente una gota (1/60 ml) de la suspensión antigénica dentro de cada círculo de prueba con una aguja no descartable sin bisel de calibre 18.

6) Rotar 4 minutos a 180° 2 rpm y leer los resultados al microscopio con ocular y objetivo de 10X.

7) Anotar los resultados en términos de la mayor dilución de suero que produzca un resultado Reactivo (ver tabla 1).

Diagrama para la reacción cuantitativa

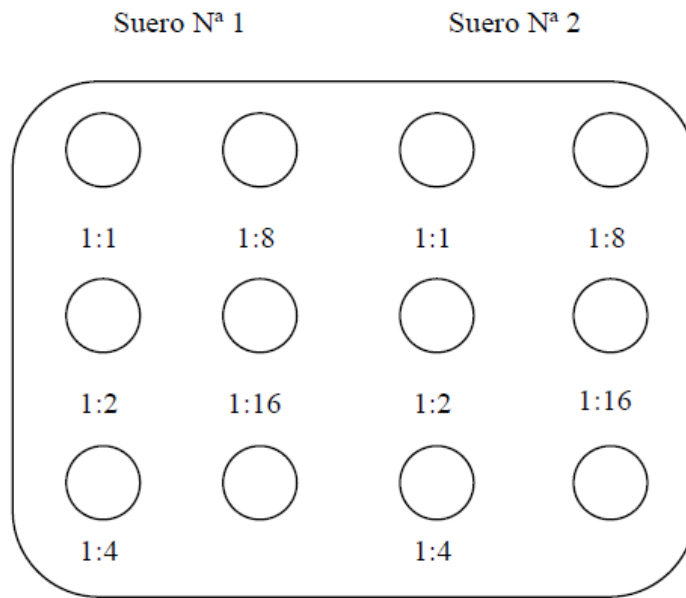


Tabla 1: Informe de los resultados cuantitativos en suero

Suero no diluido	Resultado en dilución de suero:					Informe
	(1:1)	1:2	1:4	1:8	1:16	
R	D	N	N	N	N	Reactivo, no diluido (1 dil)
R	R	D	N	N	N	Reactivo, 2 dils
R	R	R	D	N	N	Reactivo, 4 dils
D	D	R	R	D	N	Reactivo, 8 dils
N (rugoso)	D	R	R	R	N	Reactivo, 16 dils
D	N	N	N	N	N	Débil Reactivo, 1 dil

R: Reactivo, N: no reactivo, D: débil

8) Si la más alta dilución probada (1:16) es reactiva, proceder como sigue:

Preparar una dilución 1:16 de la muestra por adición de 100 µl del suero a 1,5 ml de NaCl al 0,9 %. Mezclar.

Colocar 50 μ l de la solución de NaCl 0,9 % en los círculos 2, 3, 4 y 5 de la placa.

Colocar 50 μ l de la dilución 1:16 en los círculos 1 y 2.

Con la misma pipeta, realizar diluciones seriadas dobles a partir del círculo 2 y completar la prueba como se describió antes en los pasos 3 a 6.

Leer los resultados como se describió previamente.

¡Atención a las modificaciones!

LIAISON® Treponema Screen (310840)

1. FINALIDAD DEL ENSAYO

El ensayo LIAISON® Treponema Screen emplea la tecnología de la del inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) para la determinación cualitativa de anticuerpos específicos totales dirigidos contra *Treponema pallidum* en muestras de suero o plasma humano. El ensayo debe realizarse en la serie de instrumentos LIAISON®.

2. SUMARIO Y EXPLICACIÓN DEL TEST

La sífilis es una enfermedad, normalmente transmitida sexualmente, causada por la infección con la espiroqueta *Treponema pallidum*. En la literatura también se han descrito la transmisión congénita del *Treponema pallidum* mediante el paso trans-placentar desde madres infectadas y el contagio a través de transfusiones sanguíneas. La infección es sistémica desde el inicio y la enfermedad se caracteriza por períodos latentes, que duran frecuentemente más de veinte años. El curso natural de la sífilis se subdivide convencionalmente en tres fases. Después de un período de incubación que dura aproximadamente tres semanas, aparece una lesión de la piel no dolorosa (chancro) a menudo asociada con linfadenopatía regional (fase primaria). La enfermedad progresa en una fase secundaria, diseminada, acompañada por lesiones mucocutáneas y linfadenopatía generalizadas. Si se permite que la infección por el *Treponema pallidum* progrese en la fase tardía, la fase secundaria es seguida por un período de infección subclínica (sífilis latente) detectada solamente por test serológicos y por una fase avanzada o terciaria, observada solamente en un número reducido de pacientes, caracterizada por la enfermedad progresiva.

La sífilis se puede diagnosticar con diferentes test serológicos de laboratorio, los cuales también son útiles para establecer la fase de la enfermedad cuando se adoptan junto con otras pruebas clínicas. El diagnóstico serológico se establece generalmente usando dos test estándar combinados, un test de anticuerpos no treponémicos para fines de selección y un test de anticuerpos treponémicos específicos para fines de confirmación. Los dos test de anticuerpos no treponémicos usados más comúnmente son el test del Laboratorio de Investigación de las Enfermedades Venéreas (VDRL) y el test de la Reagina Plasmática Rápida (RPR), que representa una variación simplificada del VDRL.

En muchos laboratorios, la técnica de selección adoptada es el test de hemaglutinación del *Treponema pallidum* (TPHA), que consiste en la aglutinación de eritrocitos recubiertos de antígenos específicos para *Treponema pallidum* porque detecta anticuerpos de clase IgG e IgM. Sin embargo, la interpretación de los resultados del test TPHA es subjetiva y no puede ser completamente automatizada. Recientemente se han introducido en el mercado varios kit inmunoenzimáticos que emplean Usados bacterianos o proteínas recombinantes purificadas.

Los resultados positivos se pueden confirmar con un método de referencia, el test de absorción de los anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-Abs), que permite detectar tanto IgG como IgM. Sin embargo, su ejecución es larga y compleja, inadecuada para la selección de un número grande de muestras, y la interpretación de los resultados es subjetiva. La reactividad de los test treponémicos, basados en el uso de antígenos específicos, persiste a menudo para siempre, también después del tratamiento, en contraste con los test no treponémicos. Por consiguiente, en los donantes de sangre y plasma se buscan los anticuerpos anti-*Treponema pallidum* con test treponémicos y no treponémicos.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El método para la determinación de anticuerpos específicos totales anti-Treponema *pallidum* es un ensayo *sandwich* con una incubación basado en el principio de la quimioluminiscencia (CLIA). Antígenos recombinantes específicos de *Treponema pallidum* se emplean para recubrir las partículas magnéticas (fase sólida) y están enlazados a un derivado del β -isoluminol (conjugado antígeno-isoluminol). Durante la incubación, los anticuerpos anti-Treponema *pallidum* presentes en los calibradores, en las muestras o en los controles enlazan la fase sólida y el antígeno conjugado. Después de la incubación, se elimina el material no enlazado mediante un ciclo de lavado.

A continuación, se añaden los reactivos starter que inducen una reacción de quimioluminiscencia. La señal luminosa, y por lo tanto la cantidad de conjugado antígeno-isoluminol, se mide con un fotomultiplicador en unidades relativas de luz (RLU, relative light units) e indica la concentración de anticuerpos totales anti-*Treponema pallidum* presente en los calibradores, en las muestras o en los controles.

4. MATERIALES SUMINISTRADOS

Integral de reactivos

Partículas magnéticas (2,3 mL)	Partículas magnéticas recubiertas con antígenos recombinantes de <i>Treponema pallidum</i> (obtenidos en <i>E. coli</i>), albúmina sérica bovina, tampón PBS, < 0,1% azida sódica.
Calibrador 1 (1,4 mL)	Suero/plasma humano que contiene niveles bajos de anticuerpos anti- <i>Treponema pallidum</i> , albúmina sérica bovina, tampón fosfato, 0,2% ProClin® 300 y un colorante amarillo inactivo. Las
Calibrador 2 (1,4 mL)	Suero/plasma humano que contiene niveles altos de anticuerpos anti- <i>Treponema pallidum</i> , albúmina sérica bovina, tampón fosfato, 0,2% ProClin® 300 y un colorante azul inactivo. Las concentraciones de los calibradores son calibradas contra una preparación interna de anticuerpos.
Diluyente de muestras (13 mL)	Proteínas, EDTA, tampón fosfato, 0,2% ProClin® 300 y un colorante azul inactivo.
Conjugado (9 mL)	Antígenos recombinantes de <i>Treponema pallidum</i> (obtenidos en <i>E. coli</i>), conjugados con un derivado del isoluminol, albúmina sérica bovina, tampón PBS, 0,2% ProClin® 300, conservantes.
Número de ensayos	200

Todos los reactivos se suministran listos para su uso. El orden de los reactivos refleja el orden con el que se han ensamblado los contenedores en el integral de reactivos.

Materiales requeridos, pero no suministrados

Instrumentos LIAISON® XL	Instrumentos LIAISON®
LIAISON® XL Cuvettes (código X0016). LIAISON® XL Disposable Tips (código X0015). LIAISON® XL Starter Kit (código 319200). LIAISON® Wash/System Liquid (código 319100). LIAISON® XL Waste Bags (código X0025).	LIAISON® Module (código 319130). LIAISON ³⁰ Starter Kit (código 319102) o LIAISON® XL Starter Kit (código 319200). LIAISON® Light Check (código 319101). LIAISON® Wash/System Liquid (código 319100). LIAISON® Waste Bags (código 450003). LIAISON® Cleaning Kit (código 310990).

Otros materiales requeridos

Controles LIAISON® Treponema Screen (negativo y positivo) (código 310841).

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Sólo para uso diagnóstico *in vitro*.

Todas las unidades de suero y plasma utilizadas para la fabricación de los componentes de este kit se han analizado y se han encontrado no reactivas para la presencia de HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y anti-HIV-2. Sin embargo, visto que ningún método de análisis puede asegurar que los agentes patógenos estén ausentes, todo el material de origen humano se deberá considerar potencialmente infeccioso y manipularlo como tal.

6. NORMAS DE SEGURIDAD

No coma, beba, fume o se maquille durante la ejecución del ensayo. No pipetee las soluciones con la boca.

Evite el contacto directo con el material potencialmente infeccioso usando batas de laboratorio, gafas de protección y guantes desechables. Lávese cuidadosamente las manos al terminar el ensayo.

Evite salpicaduras o formación de aerosoles. En caso de que esto sucediera, cada gota de reactivo se debe eliminar con una solución de hipoclorito sódico al 5% y el medio utilizado se deberá tratar como materia! residuo potencialmente infeccioso.

Todas las muestras, los reactivos biológicos del kit y los materiales usados para efectuar el ensayo se deben considerar capaces de transmitir agentes infecciosos; por lo tanto los residuos se deberán eliminar de acuerdo con las reglamentaciones de las agencias autorizadas que tengan jurisdicción sobre el laboratorio, y con las normativas de cada país. El material de-sechable deberá ser incinerado; los residuos líquidos deberán ser descontaminados con una solución de hipoclorito sódico a una concentración final del 5% durante media hora como mínimo. Cualquier material que pueda ser reutilizado deberá ser tratado en autoclave con un tratamiento de exceso (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente se considera que una hora a 121°C es un tiempo de esterilización adecuado; sin embargo se recomienda a cada usuario que verifique la eficacia del ciclo de descontaminación mediante una validación inicial y el uso rutinario de indicadores biológicos. Los reactivos que contienen ProClin® 300 se clasifican como irritantes según las Directivas Europeas aplicables: R 43 - Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel. S 24 - Evítese el contacto con la piel. S 37 - Úsense guantes adecuados. S 60 - Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.

7. PREPARACIÓN DEL INTEGRAL DE REACTIVOS

Observe escrupulosamente las siguientes precauciones importantes para manipular los reactivos:

Resuspensión de las partículas magnéticas

Las partículas magnéticas deben estar completamente resuspendidas antes de colocar el integral en el instrumento. Siga los pasos indicados a continuación para garantizar la suspensión completa de las partículas:

Antes de quitar la protección de los contenedores, gire hacia adelante y hacia atrás la ruedecilla dentada situada por debajo del contenedor de las partículas magnéticas hasta que la suspensión adopte una coloración morena. Agite horizontalmente el integral de reactivos con delicadeza y sumo cuidado para favorecer la suspensión de las partículas magnéticas (evite la formación de espuma). Controle visualmente el fondo del contenedor de las partículas magnéticas para cerciorarse de que no hayan quedado partículas magnéticas sedimentadas. Seque con sumo cuidado la superficie de cada pared para eliminar el líquido residual. Si es necesario, repita el procedimiento hasta la completa resuspensión de las partículas magnéticas.

Formación de espuma en los reactivos

Para garantizar las mejores prestaciones del integral, se recomienda evitar la formación de espuma en los reactivos. Observe las recomendaciones siguientes para evitarla:

Antes de usar el integral, controle visualmente los reactivos, especialmente los calibradores (situados en la segunda y tercera posición del integral, después del contenedor de las partículas magnéticas) para excluir la presencia de espuma. Si se observa la presencia de espuma después de la resuspensión de las partículas magnéticas, coloque el integral en el instrumento y deje que se disuelva la espuma. El integral está listo para el uso cuando se ha dejado descansar en el instrumento, las partículas magnéticas han sido mantenidas en agitación automática y se ha disuelto la espuma.

Cargar el integral en el área de los reactivos del instrumento Instrumentos LIAISON»

- Coloque el integral de reactivos en el área de los reactivos del instrumento con la etiqueta de los códigos de barras situada a la izquierda y déjelo agitar durante 30 minutos antes del uso. Durante este tiempo las partículas magnéticas serán mantenidas en agitación automáticamente para garantizar una resuspensión completa.
- Hágase referencia al manual operativo del instrumento para cargar las muestras e iniciar el ensayo.

Instrumentos LIAISON¹ XL

- El instrumento LIAISON[®] XL está dotado de un dispositivo magnético interno que favorece la dispersión de las micropartículas antes de colocar un integral de reactivos en el área de los reactivos del instrumento. Hágase referencia al manual operativo del instrumento para los detalles técnicos.
 - a. Coloque el integral de reactivos en la ranura específica.
 - b. Deje descansar el integral de reactivos en el dispositivo magnético por al menos 30 segundos (hasta varios minutos). Si es necesario, repita la operación.
- Luego coloque el integral de reactivos en el área de los reactivos del instrumento con la etiqueta situada a la izquierda y déjelo agitar durante 15 minutos antes del uso. Durante este tiempo las partículas magnéticas serán mantenidas en agitación automáticamente para garantizar una resuspensión completa.
- Hágase referencia al manual operativo del instrumento para cargar las muestras e iniciar el ensayo.

8. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DEL INTEGRAL DE REACTIVOS

- **Sellado:** Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
- **Abierto en el instrumento o a 2-8°C:** Estabilidad mínima cuatro semanas. Después de este intervalo de tiempo, se puede seguir usando el integral de reactivos, siempre que los controles permanezcan dentro de los límites esperados.
- Use siempre el mismo instrumento LIAISON[®] para un integral de reactivos ya abierto.
- Use las gradillas suministradas con el instrumento LIAISON[®] para la conservación del integral de reactivos en posición vertical.
- No congele.
- Mantenga el integral de reactivos en posición vertical durante la conservación para facilitar la resuspensión de las partículas magnéticas.
- Mantenga protegido de la luz directa.

9 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El ensayo se puede efectuar en muestras de suero o plasma humano. Se pueden utilizar anticoagulantes como el citrato, el EDTA y la heparina. Recoja la sangre mediante punción venosa, déjela coagular y separe el suero del coágulo lo antes posible. Clarifique por filtración o centrifugación antes del ensayo las muestras que presenten material en suspensión, opalescencia, hipemia o residuos eritrocitarios. No use muestras fuertemente hemolizadas o lipémicas, ni muestras que presenten material suspendido o evidente contaminación microbiana. Elimine las eventuales burbujas de aire que pueda haber antes del ensayo. Si el ensayo se lleva a cabo dentro de los siete días sucesivos a la recogida, las muestras se pueden conservar a 2-8°C. En caso contrario, se deben subdividir en alícuotas congeladas a -20°C o a temperaturas inferiores. Si las muestras han sido descongeladas, agítelas con cuidado antes de realizar el ensayo. Ocho muestras de diferente reactividad se han conservado durante siete días a 2-8°C y se han sometido a cuatro ciclos de congelación y descongelación. Los resultados no han presentado diferencias significativas. El volumen mínimo de muestra necesario es 230 µL (80 µL de muestra + 150 µL de volumen muerto).

10. CALIBRACIÓN

El ensayo de los calibradores específicos contenidos en el integral de reactivos permite ajustar la curva predefinida memorizada por el fabricante en las unidades relativas de luz (RLU = relative light units) detectadas. Con una solución de los calibradores es posible realizar cuatro calibraciones. La calibración debe realizarse en triplicado cada vez que se verifique al menos una de las siguientes condiciones:

- Se usa un nuevo lote de integral de reactivos o un nuevo lote de reactivos starter.
- La calibración anterior fue realizada más de dos semanas antes.
- El instrumento ha sufrido una intervención de asistencia técnica.
- Los valores de los controles están fuera de los rangos esperados.

Instrumentos LIAISON*: Los valores de los calibradores están almacenados en los códigos de barras de la etiqueta del integral. Instrumentos LIAISON* XL: Los valores de los calibradores están almacenados en el Tag para identificación de radiofrecuencia (Radio Frequency IDentification transponder, RFID Tag).

11. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

Para obtener unas prestaciones analíticas ideales hay que respetar estrictamente las instrucciones del manual operativo del instrumento.

Instrumentos LIAISON*. Cada parámetro del test es identificado mediante el código de barras en la etiqueta del integral de reactivos. Si la etiqueta del código de barras no se puede leer, el cartucho no se debe utilizar y se tiene que tirar. Hágase referencia al manual operativo del instrumento para una información más detallada.

Instrumentos LIAISON* XL. Cada parámetro del test es identificado mediante informaciones codificadas en el Tag para identificación de radiofrecuencia (Radio Frequency IDentification transponder, RFID Tag) en el integral de reactivos. Si el RFID Tag no se puede leer, el cartucho no se debe utilizar y se tiene que tirar. Hágase referencia al manual operativo del instrumento para una información más detallada. El instrumento realiza las operaciones siguientes:

1. Distribuye el diluyente de muestras, las partículas magnéticas recubiertas y el conjugado en el módulo de reacción.
2. Distribuye calibradores, controles o muestras.
3. Incuba.
4. Lava con el líquido de lavado.
5. Añade los reactivos starter 1 y 2 y mide la luz emitida.

12. CONTROL DE CALIDAD

Los controles LIAISON* se deben analizar individualmente para evaluar las prestaciones del test. El control de calidad se debe realizar analizando los controles LIAISON* Treponema Screen

- (a) por lo menos una vez por cada día de trabajo,
- (b) cuando se usa un nuevo integral de reactivos,
- (c) cuando se calibra el Kit,
- (d) cuando se usa un nuevo lote de reactivos starter,
- (e) cuando se determina la adecuación de las prestaciones del integral de reactivos abierto con más de cuatro semanas de anterioridad, o según las disposiciones legislativas y las reglamentaciones vigentes en cada país.

Los valores de los controles tienen que estar comprendidos entre los rangos esperados: cada vez que uno o ambos valores estén fuera de los rangos esperados habrá que volver a efectuar la calibración y probar de nuevo los controles. Si los valores experimentales de los controles estén de nuevo fuera de los rangos predefinidos después de la calibración, habrá que repetir el test usando un frasco de control no abierto. Si los valores de los controles están fuera de los rangos esperados, los resultados de las muestras no deben ser notificados.

Las prestaciones de otros controles se deben evaluar para asegurar su compatibilidad con este test antes del uso. Por lo tanto es indispensable establecer los intervalos de los valores de los materiales usados para el control de calidad.

13. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El instrumento calcula automáticamente los niveles de anticuerpos totales anti-*Treponema pallidum* expresados en valor de Índice y clasifica los resultados. Hágase referencia al manual operativo del instrumento para una información más detallada. Los calibradores y los controles pueden dar unos resultados de concentración o de unidades relativas de luz (RLU) distintos en LIAISON* y LIAISON* XL, pero los resultados de los pacientes son equivalentes.

El valor límite que discrimina entre la presencia y la ausencia de anticuerpos totales anti-*Treponema pallidum* tiene un valor de índice 1. Los resultados de las muestras deben ser interpretados como sigue:

Las muestras con niveles de anticuerpos anti-*Treponema pallidum* por debajo de un valor de índice 0,9 se deben clasificar *negativas*.

Las muestras con niveles de anticuerpos anti-*Treponema pallidum* entre un valor de índice 0,9 y 1,1 se deben clasificar *dudosas*. Se recomienda repetir el test de las muestras dudosas para confirmar el primer resultado. Si una muestra es positiva al segundo test, se considerará positiva. Si una muestra es negativa al segundo test, se considerará negativa. Si el resultado es repetidamente dudoso, habrá que recoger y ensayar una segunda muestra después de una semana por lo menos. Las muestras con niveles de anticuerpos anti-*Treponema pallidum* iguales o por encima de un valor de índice 1,1 se deben clasificar *positivas*.

Un resultado negativo para anticuerpos totales anti-*Treponema pallidum* indica generalmente que no se ha desarrollado una infección, pero no excluye con seguridad una sífilis aguda, porque la infección puede estar en una fase muy precoz y el paciente puede no haber sintetizado todavía los anticuerpos específicos anti-*Treponema pallidum*, o bien porque los niveles de anticuerpos no se pueden determinar. Si se sospecha que el paciente haya estado expuesto a *Treponema pallidum*, aunque el ensayo de los anticuerpos sea negativo o dudoso, habrá que recoger y ensayar una segunda muestra durante el curso de la infección.

Un resultado positivo para anticuerpos totales anti-*Treponema pallidum* indica generalmente que el sujeto ha estado expuesto a *Treponema pallidum* (infección aguda o pasada). Sin embargo, una única muestra puede sólo ayudar a estimar el estado serológico del sujeto.

14. LIMITACIONES DEL ENSAYO

El test permite detectar la presencia de anticuerpos totales anti-Treponema *pallidum* tanto durante una infección reciente como durante una pasada, pero no es capaz de discriminar entre las diferentes clases de anticuerpos. La detección de los anticuerpos totales anti-Treponema *pallidum* puede indicar una infección reciente, pasada o tratada con éxito: por lo tanto, el test no discrimina entre sífilis activa y tratada y no puede utilizarse para determinar la eficacia del tratamiento terapéutico.

El test LIAISON® Treponema Screen puede suministrar resultados positivos que en cambio son negativos con los test no treponémicos (VDRL, RPR), porque detecta los anticuerpos anti-Treponema *pallidum* que persisten para siempre. Los test RPR suministran generalmente resultados negativos en la infección pasada, porque detectan los anticuerpos heterófilos, que están presentes sólo en la fase precoz de la infección. Los resultados del kit no han sido validados en las muestras de pacientes con HIV.

Para obtener resultados fiables es necesario atenerse estrictamente a las instrucciones de utilización y poseer una adecuada técnica manual.

La contaminación bacteriana de las muestras o la inactivación mediante calentamiento pueden modificar los resultados del análisis.

Los resultados del test se muestran de manera cualitativa como positivos o negativos para la presencia de anticuerpos totales anti-Treponema *pallidum*. Sin embargo, el diagnóstico de una enfermedad infecciosa no se debe formular en base al resultado de un solo ensayo, sino que éste se debe validar con otras pruebas clínicas, procedimientos diagnósticos y con la opinión del médico. Por lo tanto, para efectuar un diagnóstico preciso es necesario tomar en consideración la anamnesis, la sintomatología y los datos serológicos de los pacientes. De todas formas, los resultados del test se deben interpretar con cautela en los individuos inmunocomprometidos porque en estos casos la respuesta anticorpal está deprimida. Los integrales no deben utilizarse con los dos tipos de instrumentos (LIAISON® y LIAISON® XL). Cuando se ha usado un integral con un tipo de instrumento éste debe continuar a usarse siempre en dicho instrumento hasta que se termine. Por cuestiones de posibilidad de rastreo que derivan de esta declaración, es necesario terminar el seguimiento de los pacientes con el mismo tipo de instrumento (LIAISON® o LIAISON® XL), sin efectuar intercambios ni desplazamientos.

15. PRESTACIONES METODOLÓGICAS DEL KIT

15.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica se define como la capacidad que tiene el test para detectar exactamente el analito ante la presencia de factores potencialmente interferentes en la matriz de la muestra (por ejemplo, anticoagulantes, hemolisis, efectos de tratamientos de la muestra) o de reacciones cruzadas con anticuerpos potencialmente interferentes. Interferencias. Estudios controlados sobre los factores potencialmente interferentes han demostrado que las prestaciones del test no están influenciadas por anticoagulantes (citrato sódico, EDTA, heparina), hemolisis (hasta 1000 mg/dL de hemoglobina), lipemia (hasta 3000 mg/dL de triglicéridos), bilirrubinemia (hasta 20 mg/dL de bilirrubina) o por los ciclos de congelación y descongelación de las muestras.

Reacciones cruzadas. Por norma, la presencia de anticuerpos potencialmente interferentes no interfiere en el ensayo. Los anticuerpos estudiados han sido: (a) inmunoglobulinas dirigidas contra varios agentes etiológicos - como hCMV, EBV, VZV, virus de la rubéola, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema denticola*, *Toxoplasma gondii* - (b) anticuerpos anti-nucleares (ANA) y factor reumatoide (inmunoglobulinas anti-Fc).

15.2. Precisión con los instrumentos LIAISON®

La repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo (es decir las variaciones intra-ensayo e inter-ensayo) han sido determinadas utilizando las muestras de referencia en diferentes concentraciones de analito. La variabilidad observada no ha dado lugar a una clasificación errónea de las muestras.

Repetibilidad. Para evaluar la repetibilidad se han analizado veinte replicados en la misma sesión analítica.

Repetibilidad	A	B	C	D
Número de determinaciones	20	20	20	20
Media (valor de índice)	0,13	8,17		
Desviación estándar	0,02	0,22	51,48	58,53
Coefficiente de variación (%)	13,1	2,6		

Treponema-es.fm

Reproducibilidad. Para evaluar la reproducibilidad se han analizado varios replicados en días diferentes (una o dos sesiones analíticas al día) utilizando tres lotes diferentes de integral. Los ensayos se realizaron en dos sitios, en el laboratorio donde se desarrolló el kit y en un laboratorio independiente. Los resultados se refieren a los grupos de pacientes tomados en consideración; no se trata de prestaciones garantizadas porque pueden existir diferencias entre los diferentes laboratorios.

Reproducibilidad	SITIO 1				SITIO 2			
	E	F	G	H	E	F	G	H
LOTE Nr. 01	20	20 11,02	20	20 56,45	11	11	11	11
Número de determinaciones	0,18 0,14 0,20 10,8	9,40 12,80	40,20 26,90 46,70 12,1	47,00 61,00	0,15 0,10 0,19 15,4	12,50	41,68	57,47 42,40 66,70 11,2
Media (valor de índice)		7,3		5,9		11,30	38,10	
LOTE Nr. 02	20	20 12,24	20	20 56,20	11	11	11 40,00	11 57,36
Número de determinaciones	0,13 0,09 0,26 39,2	11,00 13,90	38,08 33,20 44,30	49,00 62,30	0,07 0,05 0,09 21,9	13,15	36,70 43,00	50,70 64,00
Media (valor de índice)		6,3	8,5	5,9		11,90	7,9	6,3
LOTE Nr. 03	20	20 12,60	20	20 54,45	11	11	11 38,85	11 55,80
Número de determinaciones	0,06 0,04 0,10 24,7	11,40 13,50	40,83 34,70 49,30 12,1	47,30 61,30	0,03 0,03 0,03 0,0	12,57	33,70 42,30	49,70 62,00
Media (valor de índice)		3,7		8,4		11,10	9,1	6,6

15.3. Precisión con los instrumentos LIAISON®XL

La repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo (es decir las variaciones intra-ensayo e inter-ensayo) han sido determinadas utilizando las muestras de referencia en diferentes concentraciones de analito. La variabilidad observada no ha dado lugar a una clasificación errónea de las muestras.

Repetibilidad. Para evaluar la repetibilidad se han analizado veinte replicados en la misma sesión analítica.

Repetibilidad	1	2	3	Control positivo
Número de determinaciones	20	20	20	20
Media (valor de índice)	0,565	3,07	3,99	11,1
Desviación estándar	0,051	0,056	0,082	0,34
Coefficiente de variación (%)	9,1	1,8	2,0	3,0
Valor mínimo	0,492	2,99	3,80	10,5
Valor máximo	0,656	3,19	4,12	11,6

Reproducibilidad. Para evaluar la reproducibilidad se han analizado veinte replicados en días diferentes (una o dos sesiones analíticas al día).

Reproducibilidad	1	2	3	Control positivo
Número de determinaciones	20	20	20	20
Media (valor de índice)	0,328	2,91	3,78	10,5
Desviación estándar	0,053	0,10	0,12	0,47
Coefficiente de variación (%)	16,0	3,6	3,2	4,5
Valor mínimo	0,216	2,77	3,56	9,89
Valor máximo	0,422	3,17	4,06	11,2

15.4. Efecto gancho con altas concentraciones

Cuando se ensayan muestras que contengan unas concentraciones de anticuerpos sumamente elevadas con un método *sandwich* con una Incubación, se pueden obtener unos niveles aparentes de anticuerpos inferiores al nivel real por efecto gancho.

La presencia de un efecto gancho ha sido evaluada analizando cuatro muestras positivas para anticuerpos totales anti-*Treponema pallidum* con alto título. Todas las muestras han presentado unos valores de concentración por encima del intervalo de ensayo, como se espera de las muestras con alto título, Indicando que la clasificación de las muestras es correcta.

15.5. Especificidad y sensibilidad diagnósticas

La especificidad y la sensibilidad diagnósticas han sido evaluadas analizando 3690 muestras provenientes de diversas poblaciones. Las muestras han sido examinadas con diferentes métodos de comparación y se ha empleado la regla del consenso general y los datos clínicos y serológicos para establecer los resultados esperados. Los resultados globales son los que siguen; los resultados detallados se indican más abajo.

Especificidad diagnóstica: 99,91% (3506/3509) - intervalo de confianza al 95%: 99,75-99,98%. Sensibilidad diagnóstica: 99,40% (167/168) - intervalo de confianza al 95%: 96,73-99,98%.

DONANTES DE SANGRE. En 2494 muestras provenientes de una población de donantes no seleccionados, 2491 muestras fueron negativas, una muestra fuera dudosa y dos muestras fueron positivas. La especificidad diagnóstica fue de 99,92% (2491/2493), calculada después de excluir el resultado dudoso (intervalo de confianza al 95%: 99,71-99,99%). **MUESTRAS CLÍNICAS.** Se analizaron 131 muestras recogidas de pacientes en diferentes fases de la enfermedad (7 en fase primaria, 31 en fase secundaria, 77 con sífilis latente, 5 con sífilis cardiovascular, 6 con neurosífilis y 5 con sífilis con-génita) utilizando los test comerciales como RPR, TPHA, ensayo inmunoenzimático y test Western blot preparado dentro del laboratorio. Las muestras fueron luego evaluadas con el test LIAISON® Treponema Screen. Seis muestras fueron clasificadas dudosas y por consiguiente, excluidas, porque los test de comparación no concordaban. De las 125 muestras clasificadas positivas, 125 fueron positivas con el test LIAISON® Treponema Screen. La sensibilidad diagnóstica fue de 100% (125/125), calculada una vez excluidos los resultados dudosos (intervalo de confianza al 95%: 97,09-100%). **REACCIONES CRUZADAS.** También se analizaron 65 muestras potencialmente interferentes: de éstas, 30 proporcionaron resultados positivos para anticuerpos anti-Borre//a *burgdorferi*, 10 proporcionaron resultados positivos para anticuerpos anti-EBV, 10 proporcionaron resultados positivos para anticuerpos anti-*Sfrepfococcus fi-haemoliticus* y 15 proporcionaron resultados positivos para anticuerpos anti-*Treponema denticola*. Todas las muestras potencialmente interferentes fueron negativas con el test LIAISON® Treponema Screen.

MUESTRAS PROSPECTIVAS. Se analizaron 1000 muestras provenientes de la rutina de laboratorio con resultados serológicos correlativos (ensayo inmunoenzimático y test Western blot preparado en el laboratorio). Los test de comparación no concordaron en cinco resultados que fueron clasificados dudosos. Considerando como seguros los resultados suministrados por el ensayo inmunoenzimático y el test Western blot combinados, la especificidad diagnóstica fue de 99,89% (950/951 -intervalo de confianza al 95%: 99,42-100%) y la sensibilidad diagnóstica fue de 97,67% (42/43 - intervalo de confianza al 95%: 87,71-99,94%), calculadas una vez excluidos los resultados dudosos.

LIAISON® Control Treponema Screen (310841)

1. FINALIDAD DEL ENSAYO

Los controles LIAISON® Treponema Screen (negativo y positivo) deben ser usados en los inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA) LIAISON® para verificar la fiabilidad de los ensayos. Las prestaciones metodológicas de los controles LIAISON® Treponema Screen no son definidas con otros ensayos o instrumentos automáticos diferentes que LIAISON® y LIAISON® XL. **Instrumentos LIAISON®.** El certificado de análisis contiene informaciones específicas sobre el lote de los controles, que debe introducirse manualmente en el software del instrumento antes de cargar los frascos de los controles en el instrumento. Hágase referencia al manual operativo del instrumento para una información más detallada.

Instrumentos LIAISON® XL. Los códigos de barras del certificado de análisis contienen informaciones específicas sobre el lote de los controles y deben ser leídos por el lector manual de los códigos de barras del instrumento LIAISON® XL antes de cargar los frascos de los controles en el instrumento. Hágase referencia al manual operativo del instrumento para una información más detallada.

2. MATERIALES SUMINISTRADOS

Control negativo (2 x 2,0 mL)	Suero/plasma humano no reactivo para anticuerpos anti- <i>Treponema pallidum</i> , estabilizado en tampón TRIS, 0,2% ProClin® 300 y conservantes.
Control positivo (2 x 2,0 mL)	Suero/plasma humano reactivo para anticuerpos anti-Treponema <i>pallidum</i> , estabilizado en tampón TRIS, 0,2% ProClin® 300, conservantes y un colorante amarillo inactivo.

Todos los reactivos se suministran listos para su uso. El intervalo de las concentraciones para cada control está impreso en el certificado de análisis e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de los controles obtenidos con test fiables. Cada laboratorio es responsable de adoptar límites diferentes para cumplir exigencias específicas.

3. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Sólo para uso diagnóstico *in vitro*.
- Los controles no son específicos para lote de kit. Se pueden intercambiar también con lotes diferentes de integral de reactivos.
- Todos los materiales utilizados para la fabricación de los componentes de este kit se han analizado y se han encontrado no reactivos para la presencia de HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y anti-HIV-2. Sin embargo, visto que ningún método de análisis puede asegurar que los agentes patógenos estén ausentes, todo el material de origen humano se deberá considerar potencialmente infeccioso y manipularlo como tal.
- Observe las precauciones necesarias para la manipulación de los reactivos de laboratorio.
- Los residuos deben eliminarse de acuerdo con la reglamentación local.

4. NORMAS DE SEGURIDAD

No coma, beba, fume o se maquille durante la ejecución del ensayo. No pipetee las soluciones con la boca.

Evite el contacto directo con el material potencialmente infeccioso usando batas de laboratorio, gafas de protección y guantes desechables. Lávese cuidadosamente las manos al terminar el ensayo.

Evite salpicaduras o formación de aerosoles. En caso de que esto sucediera, cada gota de reactivo se debe eliminar con una solución de hipoclorito sódico al 5% y el medio utilizado se deberá tratar como material residuo potencialmente infeccioso.

Todas las muestras, los reactivos biológicos del kit y los materiales usados para efectuar el ensayo se deben considerar capaces de transmitir agentes infecciosos; por lo tanto los residuos se deberán eliminar de acuerdo con las reglamentaciones de las agencias autorizadas que tengan jurisdicción sobre el laboratorio, y con las normativas de cada país. Los reactivos que contienen ProClin® 300 se clasifican como irritantes según las Directivas Europeas aplicables: R 43 - Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel. S 24 - Evítense el contacto con la piel. S 37 - Úsense guantes adecuados. S 60 - Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

En el momento de su llegada, los controles se deben mantener a 2-8°C en posición vertical para evitar el contacto de la solución con la tapa del frasco. No congele. Si los controles se conservan sellados y en posición vertical, ellos son estables a 2-8°C hasta la fecha de caducidad. Después de la apertura, los controles son estables durante dos semanas si se conservan refrigerados a 2-8°C entre dos usos sucesivos. Evite la contaminación bacteriana de los controles. Los controles no se deben usar pasada la fecha de caducidad indicada en las etiquetas de los frascos.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Coloque los frascos de los controles en las gradillas C del instrumento LIAISON®. Con una solución de control es posible realizar por lo menos 20 test.
- El volumen mínimo de control necesario es 480 nL (80 μ L de control + 400 μ L de volumen muerto).
- En el momento del uso, acondicione los controles a temperatura ambiente (20-25°C) antes de la apertura de los frascos y déjelos en el área de las muestras del instrumento sólo durante el tiempo requerido para realizar el test de control de calidad.
- Después del uso, tape los frascos lo antes posible y manténgalos a 2-8°C en posición vertical.
- Durante la manipulación de los controles, adopte las precauciones necesarias para evitar la contaminación microbiana.

7. MANIPULACIÓN

Hágase referencia al manual operativo del instrumento para la manipulación correcta.

8. VALORES ESPERADOS

Los intervalos de las concentraciones de anticuerpos anti-*Treponema pallidum* de los controles están indicados en el certificado de análisis. Estos se han establecido considerando la variabilidad de las sesiones analíticas respecto a la curva predefinida memorizada por el fabricante, a fines de garantizar la precisión de los resultados analíticos y obtener indicaciones sobre la estabilidad y el deterioro de los reactivos. Si los valores experimentales de los controles están repetidamente fuera de los intervalos predefinidos, con mucha probabilidad, el ensayo se ha llevado a cabo de forma incorrecta.

