

11262  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

*Facultad de Medicina División de Estudios Superiores*

2



**PRECIPITACION EN CAPILAR: UNA NUEVA PRUEBA  
SEROLOGICA PARA EL DIAGNOSTICO DE  
FIEBRE TIFOIDEA EN NIÑOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS: AREA INFECTOLOGIA**

**P R E S E N T A:**

*Francisco Javier Alvarado Alemán*

2002

*Director de la Tesis Dr. Jesús Kumate*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

Ante la imposibilidad de contar en nuestros países en desarrollo con todos los recursos necesarios para la erradicación de la fiebre tifoidea, un paliativo es hacer un diagnóstico en forma oportuna.

Este pequeño esfuerzo es dedicado a los niños quienes bajo mi responsabilidad médica han fallecido por complicaciones de la fiebre tifoidea. Especialmente al niño David Gómez Bautista.

México, D.F., Enero de 1984.

**"PRECIPITACION" EN CAPILAR: UNA NUEVA PRUEBA SEROLOGICA  
PARA EL DIAGNOSTICO DE FIEBRE TIFOIDEA EN NIROS**

*Trabajo de tesis que presenta el Dr. Francisco Javier Alvarado Alemán ante la División de Estudios Superiores de la Facultad de Medicina de la UNAM, como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias Médicas, especialidad Infectología.*

*Tutor de la Tesis:*

*DR. JESUS KUMATE R. Jefe de la División de Inmunología  
Unidad de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional  
Instituto Mexicano del Seguro Social.*

El presente trabajo se llevó a cabo gracias a la colaboración de los Dhs. Maximiliano Ruiz Castañeda y Jesús Kumate R., jefes, del Laboratorio de Desarrollo del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", y de la División de Inmunología de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional del IMSS, respectivamente, a quienes doy mi agradecimiento por su amistad y confianza.

Agradezco a la Srta. Q.B.P. Emilia Gómez y al Sr. -- M.V.Z. Antonio Ramírez V., su sentido de compañerismo y -- profesionalismo.

C O N T E N I D O

Págs.

- I.- TITULO
- II.- OBJETIVOS. . . . . 3
- III.- RESUMEN. . . . . 3
- IV.- INTRODUCCION. . . . . 4
- V.- PRUEBAS UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DE LA FIEBRE TIFOIDEA. . . . . 5
- VI.- ANTECEDENTES. . . . . 6
  - A.- ASPECTOS RELACIONADOS CON INMUNIDAD HUMORAL.. 7
  - B.- ASPECTOS RELACIONADOS CON EL ANTIGENO SOMATICO.. 9
- VII.- MATERIAL Y METODOS. . . . . 11
  - A.- OBTENCION DE LOS SUEROS. . . . . 11
  - B.- CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA. . . . . 12
  - C.- TECNICA DE INMUNIZACION DEL CONEJO. . . . . 12
  - 1.- FIJACION EN SUPERFICIE (FS). . . . . 13
  - 2.- PRUEBA INMUNOENZIMATICA (ELISA). . . . . 15
    - 2.1.- PREPARACION DE BACTERIAS INACTIVADAS CON ACETONA. . . . . 15
    - 2.2.- EXTRACCION DEL LIPOPOLISACARIDO POR LA TECNICA FENOL-AGUA. . . . . 16
    - 2.3.- UNION DEL LIPOPOLISACARIDO A LA PLACA. . . . . 16
    - 2.4.- PRIMERA UNION ANTIGENO ANTICUERPO. .... 17
    - 2.5.- UNION DEL SEGUNDO ANTICUERPO AL PRIMERO. 18
    - 2.6.- ACTIVACION DEL SUBSTRATO. . . . . 19
  - 3.- HEMOAGLUTINACION INDIRECTA. . . . . 20
    - 3.1.- PREPARACION DEL ANTIGENO. . . . . 20
    - 3.2.- PREPARACION DE LOS GLOBULOS ROJOS DE CARINERO. . . . . 20

- 3.3.- SENSIBILIZACION DE LOS GLOBULOS RO-  
JOS DE CARNERO . . . . . 20
- 4.- PRECIPITACION EN CAPILAR (PC). . . . . 21
- VIII.- VALORACION ESTADISTICA. . . . . 23
  - 1.- DEFINICIONES DE: . . . . . 24
    - SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, EFICIEN-  
CIA, VALOR PREDICTIVO PARA UN RESULTA  
DO POSITIVO, VALOR PREDICTIVO PARA UN  
RESULTADO NEGATIVO.
- IX.- RESULTADOS. . . . . 25
  - 1.- HEMOAGLUTINACION INDIRECTA (HAI). . . 25
  - 2.- FIJACION EN SUPERFICIE (FS). . . . . 25
  - 3.- PRUEBA INMUNOENZIMATICA (ELISA). . . . 26
  - 4.- PRECIPITACION EN CAPILAR (PC). . . . . 27
- X.- COMENTARIOS. . . . . 29
- XI.- CONCLUSIONES. . . . . 32
- XII.- BIBLIOGRAFIA. . . . . 35

## II.- OBJETIVOS

La elaboración de una nueva prueba serológica para -- apoyar al clínico en el diagnóstico de la fiebre tifoidea, que presente las características de: sensibilidad y especificidad altas, fácil interpretación y sencilla en su realización.

## III.- RESUMEN

El antígeno utilizado por Ruiz Castañeda en su prueba de " Fijación en Superficie ", a concentración, precipita en forma inmediata (30segundos), al mezclarse dentro de un tubo capilar con el suero proveniente de pacientes con fiebre tifoidea.

Esta nueva prueba llamada de " "Precipitación" en Capilar ", se comparó con las pruebas de: Hemoaglutinación indirecta ( HAI ), inmunoenzimática (ELISA ) y la Fijación en Superficie ( FS ).

La prueba de Precipitación en capilar, mostró una sensibilidad y especificidad comparables a las demás pruebas, con la ventaja en el costo, rapidez y la facilidad de llevarse a cabo, prácticamente, a la cabecera del enfermo.



#### IV.- INTRODUCCION

La fiebre tifoidea es una enfermedad producida por -- Salmonella typhi, un bacilo gram negativo, móvil, perteneciente a la tribu Salmonellae de la familia Enterobacteriaceae. Perteneció al grupo D de la clasificación de --- Kauffman - White de las salmonelas y comparte con 96 especies de ese grupo los antígenos somáticos 9, 12. Los flagelos contienen el antígeno " d ", y en la superficie posee el antígeno " Vi " ( 1 ).

La fiebre tifoidea es considerada como un importante problema de salud pública, es endémica en muchos países -- en desarrollo. El 80% de las infecciones son leves o subclínicas.

El típico patrón epidemiológico muestra predominancia en la población escolar. El hombre es el reservorio -- natural de S. typhi. El inóculo infectante 50% es de  $10^7$  - bacterias por ml.

En nuestro país la fiebre tifoidea presenta tendencia hacia la disminución, en 1978 la mortalidad fue de 2.3 y - la morbilidad de 4.1 por 100,000 habitantes. En 1982 se reportaron 6,701 casos en toda la república (2).

La presencia de pacientes convalescientes y crónicos, la existencia de manejadores de alimentos portadores, la - ocurrencia de epidemias por S. typhi resistentes a cloramfenicol, y la característica del bacilo de permanecer viable en el suelo ó en los depósitos de agua durante semanas, permite que en México y en otros países con saneamiento ambiental deficiente, presente dicha enfermedad, características endémico - epidémicas ( 3, 4, 5 ).

V.- PRUEBAS UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DE LA FIEBRE  
TIFOIDEA

La infección por S. typhi en el hombre, da origen a -  
través de sus antígenos somáticos 9, 12 y de su fracción -  
flagelar " d ", a la formación de anticuerpos. La detec-  
ción y cuantificación de los dirigidos contra el antígeno\_  
somático " O ", son de un gran valor como medio para esta-  
blecer un diagnóstico de probabilidad y de iniciar una te-  
rapia antimicrobiana, antes de la confirmación bacterioló-  
gica.

Las pruebas de aglutinación como la de Widal utiliza-  
das desde 1896 y sus modificaciones han sido las más em-  
pleadas ( 6 ). Otras técnicas de mayor sensibilidad como:  
la detección de anticuerpos incompletos por medio del reac-  
tivo de Coombs que muestran la presencia de anticuerpos no  
aglutinantes asociados a los aglutinantes clásicos ( 7 ).  
Las técnicas de hemaglutinación y sus diversas variantes,  
utilizan eritrocitos con antígenos bacterianos adsorbidos  
en su superficie: en este caso lipopolisacáridos crudos -  
( 8, 9, 10, 11 ). La prueba de Talmage y Freter, que con-  
siste en una inhibición de la combinación; los anticuerpos  
del suero problema compiten con los anticuerpos marcados -  
radioactivamente, la magnitud del efecto bloqueador se mi-  
de con un contador de rayos gamma y el cálculo de unidades  
se realiza en la zona lineal al 50% ( 12 ). La prueba de -  
Fijación en Superficie de Rutz - Castañeda, con la que se  
puede demostrar en forma específica anticuerpos de muy va-  
riada índole mediante la acción del suero fisiológico so-  
bre mezclas de antígeno anticuerpo ( 13, 14 ). La contrain-  
munelectroforesis ( CIE ) en donde la colocación del lípo-  
polisacárido ( LPS ) y del suero problema en diluciones, -

en posillos de placa de agarosa a un ( pH ) alcalino, al pasar una corriente eléctrica, las proteínas cargadas negativamente emigran hacia el ánodo, formando arcos de precipitación al efectuarse la reacción antígeno anticuerpo -- ( 15 ). Recientemente se ha descrito una prueba inmunoenzimática ( Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay ) para la detección de anticuerpos séricos tipo IgG dirigidos contra el LPS extraído de S. typhi. La prueba depende de que un antígeno, en este caso el LPS adsorbido a una placa de poliestireno pueda ser reconocido por el anticuerpo del paciente. Un segundo anticuerpo producido en otra especie animal conjugado a una enzima, reconoce al primer anticuerpo y que al adicionar el sustrato el color que se forma se pueda valorar ya sea visualmente, colorimétricamente o espectrofotométricamente ( 16, 17 ).

Debido a que la producción de anticuerpos ante la -- agresión bacteriana no es inmediata sino que se inicia su producción a niveles cuantificables al quinto día aproximadamente, una proporción importante de las técnicas tanto de la Microbiología e Inmunología contemporáneas se basan en la detección de antígenos en los primeros días de la evolución de la enfermedad. En el caso de la fiebre tifoidea, la prueba de coaglutinación utiliza Staphylococcus aureus Cowan I, cuya proteína A une el Fc ( fragmento cristalizante ) de las IgG. La suspensión de S. aureus cubierto con anticuerpos contra S. typhi se ha utilizado para detectar antígenos en orina y heces ( 18, 19 ). También se ha utilizado, la inhibición de la hemoaglutinación ( 20 ).

#### V.- ANTECEDENTES

La fiebre tifoidea fue descrita como una enfermedad -

entérica por los clínicos franceses desde los inicios del siglo XIX. Bretonneau y Chomel describieron las lesiones anatómicas, reconociendo las graves complicaciones como la perforación intestinal. Pierre Louis estudió los detalles histológicos de 158 pacientes, describió las lesiones del intestino, ganglios y bazo. William Wood Gerhard de Filadelfia, hizo la primera diferenciación entre el tifo y la fiebre tifoidea. En la mitad del siglo XIX William Budd, sugirió que la enfermedad se transmite por las "descargas intestinales". En 1880 Ebert describió el bacilo tifoídico en cortes histológicos de ganglios mesentéricos y bazo, apreciando la localización intracelular. Pfeiffer en 1884 lo aisló por primera ocasión de las heces.

Los misterios serológicos comenzaron a aclararse cuando Pfeiffer y Kolle mostraron que el suero de pacientes convalescientes protegía a cobayos contra dosis letales -- de bacilos tifoídicos, estos "cuerpos protectores" fueron demostrados en el hombre once días después de la inoculación de bacterias muertas. Simultáneamente Gruber y --- Durham reportaron que el suero de cobayos inmunizados mezclados con bacterias, producía la pérdida de movilidad y la unión formando "aglutininas". En el mismo año de 1896, Widal añadió suero de pacientes enfermos a cultivos de -- S. typhi en diluciones seriadas, encontrando aglutinación -- después de 24 hrs. de incubación ( 21 ).

#### VI.-A.- ASPECTOS RELACIONADOS CON INMUNIDAD HUMORAL

La mayor parte de los anticuerpos producidos como respuesta a los antígenos somáticos de S. typhi están conteni

dos en la fracción gamma de las globulinas 19S ( Unidades Svedber de sedimentación ) en el conejo. Enders en 1944 - reportó que casi todos los anticuerpos anti " 0 " ( somáticos ) se encontraban en la fracción III-1 de Cohn al estudiar el plasma. Pike habla observado que la inyección Subcutánea en los cojinetes plantares de los conejos permilla - sólo la producción de macroglobulinas 19S con producción - reducida de 7S, lo que coincidió con LoSpalluto en 1962 al estudiar sueros de lactantes, escolares y adultos, encontrando aglutininas 19S exclusivamente ( 22, 23 ).

Los conejos inmunizados con S. typhi muerta con aceto na y tratado el suero por medio de levigación con DEA -- ( cromatografía de intercambio iónico ) y tratamiento con mercaptoetanol ( destrucción de grupos sulfhidrilos ) mostró la producción de ambas aglutininas con aparición temprana de 19S seguida de 7S en forma lenta y menos intensa. Los conejos inyectados por vía intravenosa produjeron mayor cantidad de 7S ( 24 ).

Al estudiar la respuesta en niños prematuros inmunizados al nacimiento por vía intramuscular con una vacuna DV A y B ( mil millones de S. typhi por ml. y 250 millones de S. paratyphi A y B/ml ), 19 sueros de los 43 inmunizados, mostraron aglutininas a uno o más de los antígenos, todos del tipo 7S. Ninguno presentó anticuerpos transferidos maternalmente para el antígeno " 0 ", no se presentó una respuesta adecuada en la producción de anticuerpos para antígeno " 0 ". Sólo uno de cada cuatro niños inmunizados respondió con títulos cuantificables, las aglutininas anti - " 0 ", fueron siempre del tipo 19S y a títulos siempre bajos ( 25 ). En voluntarios humanos, utilizando una vacuna oral con S. typhi muerta por calor (  $10^9$  organismos por ml ) mostró la producción de anticuerpos anti flagelos al sexto día, anti - antígenos somáticos al onceavo día posterior -

a la inmunización, con títulos elevados contra " O " al --  
 treintavo día. ( 26 ) Rosen en 1967 observó la producción  
 de IgG o sea la llamada anteriormente 7S, e IgM llamada -  
 19S, e IgA, contra " O " en respuesta a estímulos de ----  
S. typhi intravenosa ( 27 ). La misma observación fue ---  
 hecha por Chernokhvostova ( 28 ). Kumar reportó un estudio  
 inmunológico que comprendió además de las inmunoglobulinas;  
 complemento ( C3 ), inhibición de la migración de los leu-  
 cositos ( IML ), tanto en pacientes con fiebre tifoidea --  
 como en vacunados, 45 pacientes con cultivo positivo, to-  
 dos presentaron el inicio un aumento significativo de IGM  
 y después de la tercera semana de IgG con una buena corre-  
 lación de anti " H " ( flagelares ) con anti " O ". ( 29 )  
 Kumate en 1962 valoró la respuesta en niños en forma seria  
 da por medio de las pruebas de Coomb, hemoaglutinación, -  
 aglutinación por Widal, fijación en superficie y la prueba  
 de Talmage, encontrando que los niños desnutridos aumenta-  
 ron los anticuerpos incompletos en comparación a los niños  
 eutróficos. Los estudios serológicos carecieron de valor -  
 para calibrar la magnitud de la infección, la evolución -  
 de la misma o para prever una complicación. Fue común en--  
 contrar evoluciones " normales " de la enfermedad en pre--  
 sencia de niveles bajos de aglutininas o por el contrario  
 recaídas con títulos elevados de esos anticuerpos. ( 30 )

#### VI.-B.- ASPECTOS RELACIONADOS CON EL ANTIGENO " O "

El antígeno somático " O " forma parte constitutiva -  
 de la estructura macromolecular en la porción externa de -  
 la pared bacteriana de S. typhi. Es un complejo compuesto  
 por: Polisacárido específico O, lípido y proteína. Puede -

ser aislado por varios métodos. Boivin, extrajo el complejo por medio de ácido tricloroacético. Modificaciones a su técnica fueron hechas por: Walter T. J. Morgan en Londres y Walther F. Goebel en Nueva York ( 31 ). Otras técnicas son la de Freeman y su modificación por Staub ( 32, 33 ) El método más empleado ha sido el de Westphal y Lüderitz - quienes en 1952 utilizaron fenol - agua; en esta forma el LPS queda prácticamente libre de protelna. La técnica más reciente ha sido la de Galanos con extracción fenol - cloroformo - éter de petróleo para calorías rugosas. (34)

Este complejo lipopolisacarídico de alto peso molecular, tiene actividades características. En los animales superiores y en el hombre a dosis de 0.0001 a 0.01 mg/Kg produce entre otras cosas: fiebre, cambios en el número de -- leucocitos, aumento de hormonas y enzimas, estimulación de la fagocitosis y de otros mecanismos de defensa. A dosis altas provoca los fenómenos de Shwartzman y necrosis de tumores. Debido a estas propiedades el complejo es llamado - endotoxina, palabra acuñada por Pfeiffer al observar que - el vibrión del cólera, además de la toxina excretada en el medio de cultivo llamada exotoxina producía otra diferente que permanecía unida a la pared de la bacteria. Todas las enterobacteriaceas y la mayoría de los germenés gram negativos producen endotoxinas.

Las propiedades antigénicas y las endotóxicas están estrechamente relacionadas, aunque las estructuras responsables de la especificidad antigénica se pueden distinguir, de las responsables de la actividad endotóxica, se continúan utilizando como sinónimos.

El LPS está constituido por tres regiones distintas:  
1.- Una porción externa o cadena lateral específica O, -- constituida por la polimerización de un oligosacárido de -

base, con uniones glicosídicas propias de cada cepa, formando unidades de repetición. En este polímero se localizan los factores antigénicos "O". 2.- Una región central formada por un núcleo basal y el lípido A. 3.- El lípido A es la parte antigénicamente más importante de la molécula, constituido por un esqueleto de diglucosaminas unidas entre sí por puentes pirofosfato, cada grupo amina está substituido por un ácido beta hidroximiriístico a través de una unión amida y los grupos hidroxilo substituidos por ácidos grasos con uniones éster. El término puede ser utilizado para señalar el componente lipídico de la molécula del LPS, mientras el llamado Lip. A "libre" se refiere al aislado por hidrólisis ácida. ( 35 )

Hace más de 25 años se daba la designación de Lip. A al precipitado lipídico que se formaba después del tratamiento del LPS con ácido. Es la parte menos variable del LPS, siendo constante para las Enterobacteriaceae. Gmeiner y cols., en 1969 demostraron por primera ocasión que la estructura del Lip. A estaba formada por D-glucosamina con uniones B 1', 6' y residuos de fosfato en posición 1,4, con uniones amidas a ácidos grasos d-3 hidroxilicos. En salmonela el grupo hidroxilo en C3 representa el punto de unión de la parte polisacáridica de la molécula. En resumen el Lip. A es un disacárido lipídico acetilado.

## VII.- MATERIAL Y METODOS

VII.-A.- OBTENCION DE LOS SUEROS.- Se estudiaron 75 sueros provenientes de pacientes con cuadro clínico y diagnóstico bacteriológico de fiebre tifoidea. Del total de --



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

sueros, 20 de ellos fueron proporcionados por Muñoz y su grupo de la División de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional del IMSS. Los restantes se obtuvieron del Departamento de Pediatría del Hospital de Infectología del Centro Médico "La Raza" del IMSS. Los sueros se guardaron en alícuotas de 0.200 ml a menos de 20°C hasta su utilización en el laboratorio.

VII.-B.- CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA.- De los 75 -- sueros sólo en 67 se obtuvieron los datos relacionados con la toma de la muestra, en relación a la evolución de la enfermedad tomando en cuenta la fiebre como signo característico. De los 67 casos en que se obtuvieron los datos, 28 ( 41.8% ) pertenecieron al sexo femenino, 39 ( 58.2% ) al masculino. La edad comprendió de 2 a 16 años distribuidos en pre-escolares hasta los 5 años, 11 casos (16.4%), escolares hasta los 12 años, 41 casos (61.2%) y adolescentes -- hasta los 16 años, 15 casos (22.4%). En relación a la semana de evolución aparente en que se tomó la muestra; primera semana, 7 casos (10.4%), segunda semana, 24 casos -- (36%), tercera semana, 30 casos (44.7%), cuarta semana, 4 -- casos (6%) y quinta semana, 2 casos (3%). Lo que concuerda con ingresos a Hospitales de tercer nivel, con la mayoría de casos en la segunda y tercera semana de evolución.

VII.-C.- INMUNIZACION DE CONEJOS PARA LOS CONTROLES -- POSITIVOS.- Los testigos positivos para las pruebas de: -- "fijación" en superficie (FS), hemoaglutinación indirecta (HAI) y de "precipitación" en capilar (PC) a excepción -- de la prueba inmunoenzimática ( ELISA ) se llevaron a cabo con suero de conejo hiperinmune. Una suspensión de bacterias de S. typhi 0-901 inactivadas por calor a 100°C durante dos hrs., a una concentración de  $2/10^9$  por ml, se in

## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

yectó a conejos machos Nueva Zelanda de tres kg. de peso y de acuerdo con el esquema siguiente: Primera inmunización.- Por vía intravenosa: primer día 0.5 ml., tercer día 1.0 ml., quinto día 2.0 ml., séptimo día 2.0 ml., noveno 2.0 ml., onceavo 2.0 ml, reposo de ocho días y al 18avo día sangrado por punción cardíaca. Segunda inmunización.- Por vía subcutánea: primer día 0.5 ml, tercer día 1.0 ml, quinto día 1.0 ml, luego por vía intravenosa: séptimo día 1.0 ml, noveno día 2.0 ml, onceavo día 2.0 ml, seguido de un reposo de 8 días y sangrado por punción cardíaca. Reposo de un mes. Tercera inmunización.- El mismo esquema de la segunda. Con el suero extraído se le practicó una curva de precipitación contra polisacrido Freeman de la técnica modificada por Staub ( 32, 33 ), el cual fue proporcionado por -- Isibasi del laboratorio de Carbohidratos de la División de Inmunoquímica, de la Unidad de Investigación Biomédica del CMN del IMSS. Uno de los conejos marcado con el No. 149 -- fue el seleccionado, con 135 ug de protelna/ml.

Las cuatro pruebas utilizadas en el trabajo fueron:

### VII.1.- FIJACION EN SUPERFICIE

Es una prueba rápida que resulta de la mezcla de suero sin diluir, con antígenos concentrados, cuyos resultados pueden observarse inmediatamente.

El antígeno fue preparado en el Laboratorio de Desarrollo del Hospital Infantil de México " Federico Gómez ". Una cepa de S. typhi sembrada en botellas de Roux, cosechada a las 24 hrs con solución de cloruro de sodio 0.89% a 50 ml por botella de Roux. Se agrega azul de tetrazolio --

( Nutritional Corp. ) a 200 mg., por litro de suspensión bacteriana agitando por 12 hrs., se lavó tres veces con solución de cloruro de sodio 0.89% a 3000 rpm, se suspendió con alcohol absoluto volumen a volumen por 48 hrs., se formaliniza con formol al 3% durante 48 - 72 hrs, Se lava con agua destilada 3 veces a 3000 rpm., se mezcla con sacarosa previamente pulverizada a cantidad igual en un mortero. ( 18, 19 ) Se imprimió en papel filtro dejando manchas circulares a una distancia de 0.5 cm del borde inferior del papel el cual es manufacturado por J. C. Binzer - Hatzfeld, Eder Alemania, marcado con la calidad D.D., se proporcionó para el trabajo en tiras de papel de 12 por 14 cm con 10 manchas de antígeno. Se colocó una gota del suero problema sobre la mancha antigénica, dejando el papel en forma vertical, permitiendo que el borde inferior tomara contacto con una solución de cloruro de sodio al 0.85% la cual ascendió por capilaridad pasando sobre la mezcla de los reactivos. Cuando la mezcla de antígeno y suero no produce reacción antígeno anticuerpo, ambos son desalojados del sitio donde se les colocó. Si la reacción tuvo lugar el antígeno es retenido por el papel como una mancha de tinta indeleble, ya que el antígeno está coloreado en azul marino. Si el título de anticuerpos no es elevado, la fijación será parcial: parte del antígeno queda en el sitio de la reacción y el resto se desaloja en forma de cometa, siendo la distancia recorrida por la cola inversamente proporcional al título del suero. Se considera una reacción positiva cuando la fijación es superior a 50% teniendo en cuenta la distancia que separa la mancha del borde superior del papel ( 36 ) Cada papel con el número de 10 manchas antigénicas, se utilizó en la siguiente forma: la primera mancha para el testigo positivo-suero de conejo hiperinmune-, la segunda para el control negativo - suero de niño asintomático y sin vacuna contra la fiebre tifo-

dea -, las siguientes ocho manchas para los sueros en estudio por duplicado, en cada tira de papel para cuatro sueros. Se practicó la prueba en los 75 sueros problema e igual número de testigos negativos, en sueros de niños que acudieron al Hospital Infantil de México " Federico Gómez ", al Laboratorio de Desarrollo, por problemas diversos, no relacionados con cuadro clínico compatible con fiebre tifoidea.

## VII.-2.- PRUEBA INMUNOENZIMÁTICA ( ELISA )

VII.-2.1.- PREPARACION DE BACTERIAS INACTIVADAS CON ACETONA.- S. typhi Ty2 de la colección del laboratorio, -- cultivada en medio sólido.

Extracto de cerebro	200 g
Extracto de corazón de buey	200 g
Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dibásico	2.5 g
Glucosa	2.0 g

El medio se reconstituyó en agua destilada en proporción 37 g/L, se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, se agregó agar al 1.0% para solidificarlo, se inoculó en botellas de Roux, se dejó en incubación durante 48 hrs., comprobándose su esterilidad. El medio reconstituido en agua destilada se colocó a 100 ml por botella esterilizada. Después de 18 hrs., de incubación a 37°C se cosechó con 25 ml de solución isotónica de cloruro de sodio. Se desprendieron las colonias vaciando en matraz estéril, lavando en dos ocasiones. Se centrifugó

La suspensión de bacterias a 12,000 X g por 10 minutos a 4°C, el sedimento se lavó tres veces con solución isotónica de cloruro de sodio. Se inactivaron las bacterias con acetona volumen a volumen y el sedimento se colocó y secó en caja de Petri a 37°C.

VII.2.2.- EXTRACCION DEL LIPOPOLISACARIDO POR LA TECNICA DE FENOL-AGUA.- 30 g de las bacterias secas en 500 ml de agua destilada se calentaron a 90°C por 30 minutos. Se añadió 8.3 ml de fenol al 90% quedando la suspensión al 45%. Todo lo anterior se llevó a 65°C durante 15 minutos agitando continuamente. Se enfrió a chorro de agua, se centrifugó en tubos de plástico resistentes al fenol durante 40 minutos a 5,000 rpm en una centrifuga Damon IE CPR. Se tomó la capa superior blanquecina por medio de una pipeta Pasteur, se centrifugó dos veces más hasta obtener un sobrenadante claro. Del sedimento se practicó una segunda extracción, se mezclaron los sobrenadantes de las dos extracciones y se dializó durante dos días a chorro de agua de la llave y dos días más contra agua destilada. Se centrifugó durante 40 minutos a 5,000 rpm., se decantó el sobrenadante en un matraz bola de 24 por 40 de boca esmerilada concentrado con vacío hasta 10 ml. Se centrifugó a 40,000 rpm en una ultracentrifuga Beckman L8-80 por 2 hrs. Se decantó y se guardó el sobrenadante, se lavó el botón con agua del lavado del matraz para disolverlo. Se calentó a 40°C, se centrifugó a 3,000 rpm para eliminar las últimas impurezas. El botón se suspendió en agua destilada y se liofilizó en una liofilizadora Labconco - 5.

VII.2.3.- UNION DEL LPS A LAS PLACAS DE RECUBRIMIENTO.- Placas de poliestireno DYNATECH Immunolon I, de 96 posillos intercambiables. Se disolvió el LPS extraído a una concentración de 25 ug/ml en amortiguador de recubrimiento: Carbonato de sodio 1.5898 g, Bicarbonato de sodio ---

2.94 g, Azida de sodio 0.2 g, agua destilada 1 L. Se ajustó a pH 9.6 y sirvió solo para 15 días, se colocaron --- 0.300 ml por posillo, se dejó en reposo en cámara húmeda durante la noche. Se lavo la placa con PBS-Tween-20: Tween 20 (Sigma) 0.5 ml, azida de sodio 0.2 g, PBS 1 L (NaCl-8.0 g, +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g, +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 12  $\text{H}_2\text{O}$  2.9 g, + KCl - 0.2 g. ). Se colocaron para el lavado 0.5 ml en cada posillo, dejando cinco minutos y aspirando con bomba de vacío. Se repitió la operación tres veces.

VII.-2.4.- PRIMERA UNION ANTIGENO ANTICUERPO.- ( LPS-IgG problema ) Se practicaron diluciones de los sueros de 1:50 a 1:1600 en amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 8.1:

Solución A: Tris 0.2 M 24.23 g/L tris ( hidroximetil ) - aminometano.

Solución B: HCl 1 M 83 ml/L.

A 250 ml de la solución A, se adicionaron 22 ml de la solución B, se llevó a un litro con agua destilada, y se ajustó a pH 8.1. Se colocaron 0.300 ml en cada posillo de la placa distribuidos en la siguiente forma: la placa esta -- formada por hileras horizontales de 12 posillos que de izquierda a derecha corresponden a los números del 1 al 12 y los verticales de 8 posillos corresponden de arriba a abajo a las letras de la A a la H, por lo tanto la línea --- No. 1 de arriba hacia abajo se dejó como blanco para la valoración posterior de unión inespecífica del conjugado a la placa. Las líneas 2 y 3 se utilizaron para colocar las diluciones de los testigos positivos por duplicado ( como testigo positivo se utilizó la mezcla de diez sueros de pacientes con diagnóstico bacteriológico y cuya hemoaglutinación indirecta dio títulos de 1:800, y como testigo negativo el suero de un niño escolar sin antecedentes de cuadro clínico compatible con fiebre tifoidea o vacunación ). Los

posillos restantes se utilizaron para los sueros problema a las mismas diluciones. La placa se dejó en reposo por 6 hrs., en cámara húmeda al medio ambiente, se lavó tres veces con PBS-Tween 0.500 ml en cada posillo y aspirando con bomba de vacío. Se dejó una hora con PBS-Tween y albúmina sérica bovina al 0.5%. Se lavó con agua destilada.

VII.-2.5.- UNION DE UN SEGUNDO ANTICUERPO CONJUGADO A UNA ENZIMA AL PRIMER ANTICUERPO.- Este segundo anticuerpo es una IgG de cabra dirigida contra IgG humana, la que fue proporcionada por Acosta del Laboratorio de Inmunobiología I de la División de Inmunoquímica de la Unidad de Investigación Biomédica del CMN del IMSS.

Preparación del conjugado.- El método empleado fue el adecuado para fosfatasa alcalina ( 37 ) tipo VII-S de intestino bovino ( Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo. ) a una concentración de 6.6 mg de proteína por ml. El contenido del frasco se mezcló con la solución de anticuerpos y se dializó contra PBS para eliminar el sulfato de amonio. El contenido de la bolsa de diálisis se ajustó a un ml y se le agregó 0.010 ml de glutaraldehído al 20%, después de mezclar se dejó dos hrs. a temperatura ambiente y se dializó contra dos cambios de Tris-HCl a 0.5 M pH 8.0. Después de recuperada se ajustó a 4.85 ml con amortiguador de Tris-HCl y se añadieron 0.150 ml de azida de sodio al 10% y albúmina sérica bovina ( Sigma ) 50 mg. Se hicieron alícuotas de un ml en frascos de plástico y se conservaron a 4°C para evitar la congelación. El conjugado diluido de Tris-HCl 0.5 M pH 8.1 diluido 1:100, se agregó a 0.300 ml por posillo a toda la placa, se dejó en incubación durante la noche a 4°C en cámara húmeda. Se lavó la placa con 0.5 ml de PBS-Tween por intervalo de cinco minutos en seis ocasiones, aspirando con bomba de vacío, se lavó la -

placa dos veces más con agua destilada.

VII.-2.6.- ACTIVACION DEL SUBSTRATO.- El substrato -- ( p-nitrofenilfosfato SIGMA ) en tabletas de 5 mg se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad. Se disolvió una tableta por cada 5 ml del amortiguador del substrato: Dietanolamina - 97 ml, azida de sodio 0.2 g, cloruro de magnesio 6 H<sub>2</sub>O 0.1 g, agua destilada 800 ml, se ajustó a pH 9.8 con HCl y se aforó a un litro, se mantuvo a temperatura ambiente en botella oscura. Se colocaron 0.300 ml por posillo de la placa y se practicaron las lecturas a partir de los 30 minutos en un lector Titerken Multiskan del Laboratorio de la División de Infectología del Hospital de Pediatría del -- CMN del IMSS. La reacción se suspendió a la hora con 0.050 ml de NaOH 3N cuando se consideró que el título del conjugado en la dilución 1:200 del testigo positivo, dió una -- lectura mayor a 1.00 en absorbancia, lo que se habla valorado previamente sólo con diluciones del control positivo. Se eliminaron las diluciones 1:50 y 1:100, trabajándose só lo con las diluciones 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600 por con siderar que con esa porción de la curva era suficiente para los propósitos del trabajo; ya que discernía entre testigos positivos y el negativo. La densidad óptica se leyó a 405 nm.

Se practicó la prueba a 75 sueros problema con sus -- respectivos controles, en sueros de niños asintomáticos y sin antecedentes de vacunación antitífoidica.



## VII.3.- HEMOAGLUTINACION ( HAI )

## VII.3.1.- PREPARACION DEL ANTIGENO ( LPS "CRUDO" ).-

S. typhi 0-901, cepa sin flagelos, se cultivó en medio de Muller - Hinton en dos cajas de Petri. Se cosechó a las -- 18 hrs con seis ml de solución de cloruro de sodio al 0.9% por caja. La suspensión bacteriana se ajustó a 50 ml de la misma solución. Se calentó a 100°C por una hora, se centrifugó diez minutos a 6000 rpm en una centrifuga Damon IEC, se tomó el sobrenadante por decantación, se agregó alcohol de 96° 1:10.

## VII.3.2.- PREPARACION DE LOS GLOBULOS ROJOS DE CARNE-

RO ( GRC ).- Los GRC extraídos una semana antes se habían colocado en solución de Alsever: glucosa 20.5 g, citrato de sodio 8.5 g, ácido cítrico 0.55 g, cloruro de sodio -- 4.20 g, y agua destilada un litro. Los GRC se lavaron con amortiguador fosfato salino pH 7.2: Solución A.- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0.15 M ( 10.20 g para 500 ml de H<sub>2</sub>O ). Solución B.- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( 10.64 g para 500 ml de agua de H<sub>2</sub>O ). Se tomó 24 ml de la solución A y 76 de la solución B a los que se agregaron 100 ml de solución de cloruro de sodio al 0.9%, haciendo un total de 200 ml del amortiguador. Los GRC se lavaron a 1500 rpm por cinco minutos en tres ocasiones.

## VII.3.3.- SENSIBILIZACION DE LOS GRC ( GRCs ).-

A 0.1 ml de GRC lavados se agregó 0.2 ml del antígeno LPS crudo, se mezcló y agitó en baño maría a 37°C por 30 minutos y se desechó el sobrenadante. Se lavaron en el amortiguador salino tres veces por cinco minutos a 1500 rpm, se resuspendieron en el mismo amortiguador en solución al 2% ( 4.9 ml del amortiguador para 0.1 ml de los GRC ) se mezclaron y se suspendieron cada vez antes de usarlos. Se utilizaron -

<p style="text-align: center;"><b>TESIS CON FALLA DE ORIGEN</b></p>
---

el mismo día.

Como testigo positivo se utilizó el suero de conejo - hiperinmune mencionado en Material y Métodos.

Se prepararon diluciones de los sueros en forma progresiva de 1:50 módulo 2X en tubos de ensayo con un volumen final de 0.5 ml para cada tubo. Se añadió 0.05 ml de la suspensión de GRC, se incubó el sistema a 37°C durante 30 minutos, los tubos se centrifugaron a 1000 rpm por tres minutos.

Se consideró el título del antisuero como la dilución más elevada que dió una aglutinación de +++ a ++++ al golpear suavemente el fondo del tubo, la placa de hemoaglutinación de desprendió casi íntegra. Se practicó la prueba a 74 sueros problema y los respectivos testigos utilizados en las pruebas mencionadas anteriormente.

#### VII.4.- PRECIPITACION EN CAPILAR ( PC )

El antígeno para la prueba fue proporcionado por Rulz Castañeda y preparado en el Laboratorio de Desarrollo del Hospital Infantil de México " Federico Gómez " ( 13, 14 ).

Se utilizó una liofilizadora labconco - 5. El peso seco que mostró una mejor reactividad en el control positivo fue de 140 mg disuelto en una solución de cloruro de sodio correspondiente a un ml, formando una suspensión de color azul marino. De esta suspensión se tomaron 0.002 ml, equivalentes a 2 mm de un tubo capilar ( Kortex - 2500 ), se agregaron 0.020 ml del suero control positivo de conejo

hiperimmune y se mezclaron suavemente, la reacción que se mostró fue inmediata, caracterizada por la presencia de pequeños gránulos de color azul intenso que se agruparon formando grumos, los que se " precipitaron " al colocar el tubo capilar en posición vertical, apoyado en su extremo inferior por un pequeño soporte de plastilina. ( Fotografía No. 1 ) En caso de negatividad, el tubo capilar persistió mostrando una coloración azul claro en toda su extensión. El testigo negativo se llevó a cabo con los mismos sueros mencionados en las pruebas anteriores. La prueba se efectuó por triplicado a los 75 sueros problema, repitiendo el experimento en tres ocasiones con intervalo de un mes. Se consideraron como positivos los sueros que dieron la prueba en forma inmediata, en un tiempo no mayor de 30 segundos.

#### VIII.- VALORACION ESTADISTICA

La interpretación de los resultados fue hecha de --- acuerdo a Galen y Gambino, basados en su modelo de valor predictivo ( 38 ) el que se expresa a continuación:

	PACIENTES CON PRUEBA POSITIVA	PACIENTES CON PRUEBA NEGATIVA	TOTALES
PACIENTES CON ENFERMEDAD	VP	FN	VP+FN
PACIENTES SIN ENFERMEDAD	FP	VN	FP+VN
TOTALES	VP + FP	FN + VN	VP+FP+VN+FN



Fig. # 1.- El capilar de la izquierda corresponde al control y el de la derecha al problema.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

en donde:

VP = VERDADEROS POSITIVOS.- Pacientes con enfermedad, calificados correctamente por la prueba.

FP = FALSOS POSITIVOS.- Pacientes que no tienen enfermedad, calificados como positivos por la prueba.

VN = VERDADEROS NEGATIVOS.- Pacientes sin enfermedad, calificados correctamente.

FN = FALSOS NEGATIVOS.- Pacientes con enfermedad, calificados erróneamente.

De donde se obtiene:

LA SENSIBILIDAD.- La positividad de la prueba en la enfermedad expresada en por ciento.  $\frac{VP}{VP + FN} \times 100$

LA ESPECIFICIDAD.- La negatividad de la prueba en sujetos sanos o en ausencia de una enfermedad particular, expresada en por ciento.  $\frac{VN}{VP + FN} \times 100$

LA EFICIENCIA.- El por ciento de las pruebas calificadas correctamente como enfermos o como no enfermos, expresada en por ciento.  $\frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN} \times 100$

EL VALOR PREDICTIVO DE UNA PRUEBA NEGATIVA.- El por ciento de pacientes que no tienen enfermedad y dan la prueba negativa.  $\frac{VN}{VN + FN} \times 100$

EL VALOR PREDICTIVO DE UNA PRUEBA POSITIVA.- El por-  
ciento de pacientes que tienen enfermedad y dan la prueba  
positiva.

$$\frac{VP}{VP + FP}$$

## IX. RESULTADOS

### IX.1.- HEMOAGLUTINACION ( HAI )

Se consideraron como positivos los sueros que muestra-  
ron títulos de 1:200 o mayores, considerados como sugestivos  
de enfermedad reciente en otros trabajos de 1:180 o -  
mayores ( 39 ).

TABLA 1

#### HEMOAGLUTINACION INDIRECTA

GRUPOS	POSITIVA	NEGATIVA	TOTALES
FIEBRE TIFOIDEA	65	9	74
TESTIGOS SANOS	4	70	74
Totales	69	79	148

### IX.2.- FIJACION EN SUPERFICIE ( FS )

La interpretación de las muestras, de los pacientes -  
con enfermedad al hacerse por duplicado, mostró una varia-  
ción de 10%; se tomó el promedio

TABLA 2

GRUPOS	FIJACION EN SUPERFICIE		TOTALES
	POSITIVA	NEGATIVA	
FIEBRE TIFOIDEA	68	7	75
TESTIGOS SANOS	0	75	75
Totales	68	82	150

Se consideraron como positivas las muestras que mostraron  $\geq 50\%$  de fijación o mayor.

### IX.3.- PRUEBA INMUNOENZIMATICA ( ELISA )

Se consideraron como positivos los sueros que mostraron en la dilución 1:400 o mayor una diferencia en densidad óptica de 50% o mayor en relación a los testigos positivo y negativo de cada placa ( 40 ). Hernández y cols. - considera  $\geq 1:300$  como positivos.

TABLA 3

GRUPOS	ELISA		TOTALES
	POSITIVA	NEGATIVA	
FIEBRE TIFOIDEA	63	12	75
TESTIGOS SANOS	4	71	75
Totales	67	83	150

## IX.4.- PRECIPITACION EN CAPILAR ( PC )

Se consideraron como positivos aquellos sueros que mostraron la presencia de grumos y precipitación sólo durante los primeros 30 segundos después de haber hecho la mezcla del antígeno y el suero problema.

TABLA 4

PRECIPITACION EN CAPILAR			
GRUPOS	POSITIVA	NEGATIVA	TOTALES
FIEBRE TIFOIDEA	67	8	75
TESTIGOS SANOS	0	75	75
Totales	67	83	150

Los ocho pacientes que mostraron la prueba negativa - y con cuadro clínico y bacteriológico positivo se muestra a continuación en relación a los resultados obtenidos en las pruebas de HAI, ELISA, y FS así como los días de evolución aparente de la enfermedad en que se tomó la muestra.

Caso No.	HAI	ELISA	FS	Días de evolución aparente
6	I:200	I:800	50%	19
12	I:100	I:800	0	4
19	I:100	I:1600	50	30
27	I:200	I:200	0	?
32	I:200	I:1600	40	?



Caso No.	HAI	ELISA	FS	Días de evolución aparente
35	1:50	1:800	0	5
36	1:50	1:200	0	7
68	1:100	1:400	70	12

A continuación se muestra en porcentajes los resultados obtenidos en todas las pruebas en relación a su sensibilidad, especificidad, eficiencia, el valor predictivo - para una prueba positiva y para una prueba negativa.

	HAI	FS	ELISA	PC
Sensibilidad	87	90	88	89
Especificidad	94	100	94	100
Eficiencia	91	95	89	94
Valor predictivo para una prueba positiva	94	100	94	100
Valor predictivo para una prueba negativa	88	91	85	90

## X.- COMENTARIOS

La reacción de Widal que se utiliza desde 1896, tiene un valor limitado en la fiebre tifoidea. La serología en ocasiones ayuda pero en otras puede confundir. Un estudio en 1961 del Public Health Laboratory Service, muestra que sólo 70% de portadores conocidos tienen anticuerpos contra antígeno Vi a un título de 1:5 o más ( 42 ). Durante la epidemia de Aberdeen en 403 casos confirmados por cultivo, en 15% no se detectaron anticuerpos anti " H " en la enfermedad aguda ni durante su seguimiento del 83% con confirmación bacteriológica y 40% no desarrollaron anticuerpos -- anti " O ", una ausencia de anticuerpos anti " Vi " en -- cualquier estado de la evolución y sólo en 9% del total de pacientes se produjeron anti " Vi " ( 43 ).

No hay consenso en la literatura para Widal en el aspecto de criterio diagnóstico, en muchas ocasiones no es específico, no está bien estandarizado y presenta dificultades en la interpretación ( 44, 45 ).

Gutierrez y cols. encontraron en 217 casos con comprobación bacteriológica: 90.8% con títulos para " O " 1:160 o mayores, 7.4% títulos menores y 1.8% persistentemente negativos. Para " H " 82% mayor de 1:160, 12.9% menor de -- 1:160 y 5.1% negativos. En la primera semana de evolución aparente 74.1% tenía niveles de 1:160 o mayores para " O " y el 63% para " H ". Los títulos permanecieron sin cambios durante aproximadamente doce semanas, para disminuir en -- las tres semanas siguientes. En los casos de perforación -- los títulos de " O " disminuyeron ( 46 ). Kumate encuentra en 100 niños con fiebre tifoidea comprobada bacteriológicamente y 30 más perforados: 72% con títulos de 1:160 o mayo

nes para Widal, y en el caso de los perforados 71% para " O " y 29% para " H ". Considera que la prueba de Widal no es sencilla ya que requiere: mantener un cultivo de -- S. typhi en fase S, vigilar la presencia de los antígenos " O " y " H " en forma adecuada para la aglutinación, además la lectura de la reacción no es inmediata ( 47 ). Por estos motivos no se incluyó en el estudio, lo mismo que la aglutinación en placa, considerada como modificación del Widal. Ve villier compara la aglutinación en placa con -- cuatro antígenos obtenidos de diferentes laboratorios encontrando una gran variabilidad por diferentes procedimientos de manufactura ( 48 ).

La prueba de hemoaglutinación mide en forma indirecta los títulos de antígeno " O " relacionados con el Widal, - se lleva a cabo en poco tiempo y no requiere material complicado. Los trabajos de Neter mostraron que el tratamiento de S. typhosa, con calor e hidróxido de sodio daba lugar a la liberación de una porción grande de lípido y su adsorción a los glóbulos rojos ( 49 ). Posteriormente --- Landy, Staub y Spaun cuantificaron los antisueros por medio de la alcalinización del polisacrido adsorbido a los glóbulos rojos. Dichas observaciones mostraron evidencias concluyentes de que el lipopolisacrido era el responsable de las propiedades aglutinantes específicas, lo que mostró además una sensibilidad y especificidad comparable a una suspensión estandar de S. typhi ( 50, 51 ).

La prueba de Fijación en Superficie, ha demostrado en un gran número de estudios su utilidad. Gutierrez y cols. encontraron que de 102 enfermos, solamente uno, no desarrolló anticuerpos demostrables por la FS, la intensidad de la reacción fue menor con la edad. En el 99% de los enfermos hubo presencia de anticuerpos, y las reaccio-

nes negativas en el 96.8% en enfermos con otras salmonelosis. La reacción fue negativa en niños vacunados contra tifoidea y en la reproductibilidad diferencias máximas de -10%. El mismo grupo de investigadores establecieron que las reacciones del 55 al 100% eran de valor diagnóstico en menores de 15 años, del 30 al 50% hasta los cinco años de edad, y del 15 al 25% en menores de un año, además una especificidad mejor que el Widal ( 52 ). Kumate en 100 casos encontró un 93% para la FS y 72% para el Widal, en 30 casos con perforación la FS fue positiva en un 80%, el Widal 71% para " O " y 29% para " H " ( 47 ). Muñoz en 100 casos encontró también 95% para FS en comparación al Widal: para " O " 57% y para " H " 29% ( 53 ). Brandao en Brasil, también encuentra una mayor sensibilidad y especificidad para la FS ( 54 ).

Su utilidad en estudios seroepidemiológicos ha sido manifiesta. Gutierrez encontró: una seropositividad de --9.6% en 19258 sueros provenientes de los diversos estados de la República Mexicana, la proporción de individuos con anticuerpos séricos se elevó a partir del primer quinquenio de la vida para alcanzar cifras máximas entre el segundo y el cuarto quinquenio ( 55 ). Muñoz encuentra en 852 niños hospitalizados en la Cd. de México: 8.4% de positivos, de estos; 2.4% con una intensidad mínima ( 15 a 25% de fijación ), 3.2% con intensidad media ( 30 a 50% de fijación ), 2.4% con intensidad superior ( 55 a 75% ) y 0.1% con intensidad máxima ( 80 a 100% de fijación ) ( 56 ).

En 1975 Carlsson describe una técnica inmunoenzimática ( ELISA ) para la detección y cuantificación de anticuerpos en suero humano dirigidos contra el antígeno " O " de S. typhi por medio de un conjugado anti IgG unido a en-

zima ( 16 ). En nuestro país Hernández y cols. han estandarizado la técnica y comparado con la contrainmunolectroforésis ( CIEF ), Widal y FS, en 50 sueros positivos y 325 sueros de pacientes sanos, encuentran una mayor eficiencia, predominando en sensibilidad la FS, en los sanos se encuentran 2.3% con títulos hasta 1:300 ( 17, 57 ).

#### XI.- CONCLUSIONES

La fiebre tifoidea continua siendo un problema de salud pública en países pobres -de los llamados en desarrollo- mientras en las comunidades no se tenga un control relacionado con medidas sanitarias: aprovechamiento de agua potable y adecuada eliminación de excretas.

Las pruebas serológicas actuales, muestran aún defectos técnicos que hacen imposible el llevarse a cabo en pequeñas poblaciones, tanto por la dificultad inherente de instalar laboratorios equipados adecuadamente, como la falta de personal técnicamente preparado.

Las pruebas serológicas mencionadas en este trabajo, muestran un porcentaje importante de sensibilidad y especificidad, de estas la que mejor lo manifiesta es la FS. Sin embargo, el problema que ha impedido una mayor difusión de la prueba ha sido la presencia de falsas negativas en los lugares de clima cálido; por otro lado el papel es de importación y se tiene problemas en adquirirlo. La HAI, es una excelente prueba diagnóstica, adecuada para laboratorios que cuenten con: cultivos de S. typhi, globulos rojos de carnero, centrifuga y baño con temperatura regulada, lo que no es fácil de tener en laboratorios de pequeñas pobla

ciones. La técnica de ELISA, ha demostrado en la práctica buenos resultados -se tiene como estudio de rutina en la División de Infectología del Hospital de Pediatría del CMN del IMSS. Sin embargo, el costo de las placas de poliestireno y del sustrato -que son de importación- y la preparación de los conjugados, hacen difícil la elaboración de rutina en pequeños laboratorios. De acuerdo con los resultados, la detección de anticuerpos clase IgG tiene cierta desventaja, ya que su producción como respuesta a la agresión bacteriana, no es inmediata, lo que da lugar a falsas negativas cuando el paciente ingresa en la primera o segunda semana de evolución de la enfermedad lo que disminuye la sensibilidad. Los títulos bajos pueden imbricarse a los títulos encontrados en el grupo control por lo que disminuye la especificidad. La detección de anticuerpos clase IgG puede ser de mayor utilidad en estudios epidemiológicos, esperando en un futuro que la detección de anticuerpos clase IgM, discierna mejor el problema en los casos agudos.

La precipitación en capilar, mostró una sensibilidad y especificidad comparable a las demás pruebas, lo que le da una gran importancia en utilidad clínica. El antígeno liofilizado tiene la ventaja de transporte, se restituye en el momento de su utilización lo que evita riesgos de contaminación. Su característica de respuesta "todo o nada" además de que facilita su interpretación, ahorra un tiempo valioso al clínico para iniciar un tratamiento adecuado. Es barata. Puede ser de gran utilidad en el medio rural en caso no sólo de problemas de fiebre tifoidea aislados, también en epidemias. Estudios preliminares muestran que la prueba también se puede llevar a cabo en plasma; por medio de capilares heparinizados, lo que simplifica la técnica, evitando: pérdida de tiempo, sangre y moles

FALTA  
PAGINA

34

## XII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Kumate, J.; Gutierrez, G.: Manual de Infectología: - Fiebre Tifoidea. 4a. ed. Eds. Meds. Hosp. Inf. Mex. 1976.
- 2.- Subdirección de Información Epidemiológica - Dirección General de Epidemiología. S.S.A.
- 3.- Varela, G.: Bravo - Becherelle, Olarte J.: Las salmonelosis humanas en la República Mexicana. Sal. Páb. Méx. 1965;7: 169 - 181.
- 4.- González - Cortés, A.; Heredia - Duarte, A.; Guzmán, J.; Hernández - Arreola, H.: Epidemiología de tifoidea por cepas cloramfenicol resistentes en México en 1972. Estudios de transmisión y vigilancia. Rev. -- Inv. Salud Pública [ Méx. ] 1974;34: 27.
- 5.- Salmonellosis en Jamaica. Bol. de la OPS., 1979;86: 82 - 83.
- 6.- Widal, G., F., I., y Sicard, A.: Recherches de la -- réaction agglutinante dans le sang et le sérum desséchés des typhiques et dans la sérosité des vesiculations. Bull. Soc. Med. Paris Third series. 1896;13: 681 - 682.
- 7.- Foad, A. C.; y De Falco, R. J.: Studies on bacterial agglutination by use of the antiglobulin ( Coombs ) - technique. Canc. J. Microb. 1956;2: 657 - 664.



- 8.- Spaun, J.: Determination of *Salmonella typhi* O and Vi antibodies by haemagglutination. *Act. Pathol. Microbiol. Scand.* 1952;31: 462 - 69.
- 9.- Landy, H.; Trapani, R. J. y Clark, W. R.: Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. *Am. J. Hyg.* - 1955;62: 54 - 65.
- 10.- Neter, E.: Bacterial haemagglutination and hemolysis. *Bacterial Rev.* 1956;20: 166.
- 11.- Webster, N.: Purification of the O antigen of *S. typhosa*. *Bacterial Proc.* 1953; 58 - 59.
- 12.- Talmage, D. W.; Freter, G. G. y Taliaferro, W. H.: - Two antibodies of related specificity but different hemolytic efficiency separate by centrifugation. *J. Infect. Dis.* 1956;98:300 .
- 13.- Rulz Castañeda, M.: Surface fixation. A new method of detecting certain immunological reactions. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 1950;73: 46 - 49.
- 14.- Rulz Castañeda, M.: Reacciones inmunológicas sobre papel filtro. Fijación en Superficie. Libro conmemorativo. Centenario de la Academia Nacional de Medicina México. II 1969: 199 - 208.
- 15.- Muñoz, O.; Hernández - Velarde, R.; Garduño - Rodríguez, G.; González - Arroyo, S.; Gutiérrez, G.: Contrainmunolectroforesis para la identificación de anticuerpos contra antígenos " O " de *S. typhi*. II. - Evaluación en enfermos de fiebre tifoidea y población sana. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 1979;10: 33.

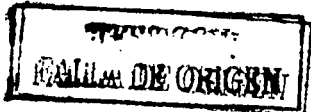
- 16.- Carlsson, H. E.; Lindberg, A. A.; Hammarstrom, S. y - Ljunggren, A.: Quantitation of salmonella O antio-- dies in human sera by enzyme - linked immunisorbent - assay ( ELISA ). *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.* - 1975;48: 485 - 494.
- 17.- Hernandez - Velarde, R.; Muñoz, O.; Sánchez - Casti-- llo, J.: Nuevas técnicas para la detección de anti-- cuerpos séricos contra el antígeno O de *Salmonella ty phi*. *Gac. Méd. ( Méx. )* 1979;115: 197 - 201.
- 18.- Rockhill, R. C.; Rumans, L. W.; Lesmona, M.; Demus, - T.: Detection of *Salmonella typhi* D, Vi and d antigen by slide coagglutination in human urine from patients with typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 1980;11: - 213.
- 19.- Kumate, J.; Carrillo, J.: Coagglutination diagnostic techniques in human salmonellosis. *Agr. J. Clin. Exp. Immunol.* 1982; 3: 145.
- 20.- Kumate, J.; Villarreal, J.; Carrillo, J.; Isibasi, A.: Eliminación de antígenos de salmonelas en la fiebre - tifoidea. I. Encuesta epidemiológica. *Arch. Invest. Méd. ( Méx. )* 1983;14: 51.
- 21.- Woodward, T. E.: The unmasking of typhoid fever. *S. Afr. Med. J.* 1970;44: 99 - 102.
- 22.- Pike, M. R.; Schulze, M. L.: Production of 7S and 19S antibodies to the somatic antigens of *Salmonella ty-- phosa* in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1964;115: - 829.

- 23.- LoSpalluto, J.; Miller, E.; Dorward, S. y Fink, W.: - The formation of macroglobulin antibodies I. Studies on adult human. *J. Clin. Invest.* 1962;41: 1415-1421.
- 24.- Bauer, C. D.; Mathies, J. M. y Stavitsky, B. A.: Sequences of synthesis of  $\gamma$ -1 macroglobulin and  $\gamma$ -2 globulin antibodies during primary and secondary responses to protein, salmonella antigens, and phage. *J. Exp. Med.* 1963;117: 889 - 907.
- 25.- Fink, W. C.; Miller, W. E.; Dorward, B. y LoSpalluto, J.: The formation of macroglobulin antibodies. II. - Studies on neonatal infants and older children. *J. of Clin. Invest.* 1962;41: 1422 - 1428.
- 26.- Turner, W. M. y Rowe, S. D.: Characterization of human antibodies to *Salmonella typhi* by gel - filtration - and antigenic analysis. *Immunol.* 1964;7: 639.
- 27.- Rossen, R. O.; Wolf, Sh., M. y Butler, W. T.: The antibody response in nasal washings and serum to *S. typhosa* endotoxin administered intravenously. *J. Immunol.* 1967;99: 246.
- 28.- Chernokvostova, E.; Luxemburg, I. K.; Starshinova, V.; Andreeva, N., y German, G.: Study on the production - of IgG, IgA and IgM antibodies to somatic antigens of *Salmonella typhi* in humans. *Clin. Exp. Immunol.* -- 1969;4: 407 - 421.
- 29.- Kumar, R.; Maloviya, N. A.; Murthy, S. R.; Venkatam-  
ran, M. y Mohapatra, N. L.: Immunological study of -  
*typhoid: Immunoglobulins, C3, antibodies, and leuko-  
cyte migration inhibition in patients with typhoid fe-  
ver and TAB - vaccinated in individuals. Inf. and -  
Imm.* 1974;10: 1219 - 1225.

- 30.- Kumate, J.; Benavidez, L.; Hikimura, J.; Herrera, R. L.: Respuesta inmunológica en fiebre tifoidea. Bol.- Méd. Hosp. Infant. (Méx.) 1962;19: 17 - 27.
- 31.- Westphal, O.; Westphal, L. V. y Sommer.: The history of pyrogen reserch. Microbiology Edit. D. Schessinger Am. Soc. for Microb. 1977, pag. 221 - 238.
- 32.- Freeman, G. G.: The preparation and properties of a - specific polysaccharide from *Bacterium typhosum* Ty2. Biochem. J. 1942;36: 340.
- 33.- Staub, A.M.; Raynaud, M.: Course d' Immunologie générale et de sérologie D'l Institut Pasteur. Fascicule III, 5. Place de la Sorbone, Paris U.
- 34.- Galanos, C.; Luderitz, O.; Westphal, O.: A new method for the extration of R Lypopolysaccharide. Eur. J. - Bloch. 1969;9: 245.
- 35.- Luderitz, O.; Galanos, C.; Lehman, V.; Westphal, O.; Lip. A: Chemical structure and biological activity in bacterial lipopolysaccharides. En: Kass, E. H. y -- Wolff, S. M. ed. University of Chicago Press. --- Chicago. 1973. pag. 9
- 36.- Ruiz Castañeda, M.: Reacciones serológicas para el - diagnóstico de las reacciones febriles. Bol. Méd. -- Hosp. Infant. (Méx.) 1961;18: 63 - 77.
- 37.- Avrameas, S.: Coupling of enzymes to protein with glu taraldehyde. Immunochemistry, 1969;6: 43.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- 38.- Galen, R. S. y Gambino, S. R.: *Beyond Normality: The predictive value of efficiency in medical diagnosis.* John Wiley y Sons, New York. 1975.
- 39.- Herrera, R. L.: *Respuesta inmunológica en fiebre tifoidea juzgada mediante aglutininas, anticuerpos bloqueadores y fijación en superficie.* Tesis de Interno Hosp. Inf. Méx. 1960.
- 40.- Lin, M. T.; Halbert, P. S.; Chin, T. C., y Zarco, R.: *Simple standardized enzyme - linked immunosorbent -- assay for human antibodies to Entamoeba histolytica.* J. of Clin. Microb. 1981;13: 646 - 651.
- 41.- Hernández-Velarde, R.; Sánchez - Castillo, J.; Díaz, G. Ma. C.; Muñoz, O.: *Utilización de la técnica de ensayo enzimático inmunoespecífico ( ELISA ) para el diagnóstico de la fiebre tifoidea. I. Estandarización de la técnica.* Arch. Invest. Méd. ( Méx. ). 1980; - 11: 137.
- 42.-Schroeder, S. A.: *Interpretation of serologic test for typhoid fever.* JAMA. 1968;206: 839 - 840.
- 43.- Anónimo: *Typhoid and its serology.* Brit. Med. J. - 1978;1: 389 - 390.
- 44.-Levine, M. M.; Grados, O.; Gilman, H. R.; Woodward, E. W.; Solis - Plaza, R.; Waldman, W.: *Diagnostic value of the Widal test in areas endemic for typhoid fever.* Ann. J. Trop. Med. Hyg. 1978;27: 795 - 800.



- 45.- Reynolds, D. W.; Carpenter, T. L.; Simon, W. H.: Diagnostic specificity of Widal's reaction for typhoid fever. *JAMA*. 1970;214: 2192 - 2193.
- 46.- Gutierrez, T. G.; Benavidez, L.; Carrillo, J.; Kumate J.: La reacción de Widal en la fiebre tifoidea. *Bol. Méd. Hosp. Infant.* (Méx.) 1962;19: 5 - 16.
- 47.- Kumate, J.; Llausas, A.; Rodríguez, L.; Isibasi, A.: La serología en el diagnóstico de la fiebre tifoidea y sus complicaciones en la edad pediátrica. *Bol. -- Méd. Hosp. Infant.* (Méx.) 1972;29: 405.
- 48.- De Villier, A. B.: Comparative study of typhoid O antigens. *Amer. J. Clin. Path.* 1965;44: 410 - 412.
- 49.- Neter, E.; Westphal, O.; Luderitz, O. y Gorsymski, E.: The bacterial hemmagglutination test for demonstration of antibodies to enterobacteriaceae. *Ann. N.Y. Acad. Sc.* 1956;66: 141.
- 50.- Landy, M.; Trepani, J. R. y Clark, R. W.: Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. *Am. J. Hyg.* -- 1955;62: 54 - 65.
- 51.- Staub, A. M.: Rôle des anticorps antipolysidiques - dans l' agglutination des bacilles typhiques. *Ann. - Inst. Pasteur.* 1954;86: 618 - 635.
- 52.- Gutierrez, G.; Benavidez, L.; Kumate, J. y Rangel, R. L.: Encuesta inmunológica en la población infantil. I. Investigación de anticuerpos contra *S. typhosa* por medio de la reacción de fijación en superficie. *Bol. - Méd. Hosp. Inf.* (Méx.) 1962;19: 107.

- 53.- Muñoz, O.; Alvarez, M. T.; Ruiz - Gómez, J. y Gutierrez, G.: Estudio comparativo de las reacciones de aglutinación y de fijación en superficie en el diagnóstico de la fiebre tifoidea. *Gac. Med. Méx.* 1975; 109: 253.
- 54.- Brandao, C. S.: Reacción de fijación en superficie como método diagnóstico de la fiebre tifoidea. *Bol. - Med. Hosp. Infant. (Méx.)* 1972;29: 413.
- 55.- Gutierrez, G.; Coll, R.; Cerda, M. S. y Muñoz, O.: Se roepidemiología de la fiebre tifoidea en la República Mexicana. *Gac. Méd. Méx.* 1976;111: 97.
- 56.- Muñoz, O.; Reyes, R. R.; Gutierrez, T. G.: Encuesta serológica en niños de la ciudad de México. Investigación de anticuerpos contra S. typhi. *Bol. Méd. Hosp. Inf.* ( Méx. ) 1973;30: 51.
- 57.- Hernández - Velarde, R.; Sánchez - Castillo, J.; Olaz-Godínez, Ma. C. y Muñoz, O.: Utilización de la técnica de ensayo enzimático inmunoespecífico ( ELISA ) para el diagnóstico de la fiebre tifoidea. *Arch. Invest. Méd.* ( Méx. ) 1980;11: 267 - 271.