

ACTUALIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE LA SÍFILIS

Syphilis diagnosis update

Ana Cecilia Sanguinetti-Díaz¹, Juan Rodríguez-Tafur-Dávila²

RESUMEN

El diagnóstico de la sífilis depende del cuadro clínico, la evaluación de las lesiones y de las pruebas serológicas. Las pruebas serológicas son treponémicas y no treponémicas. Las pruebas no treponémicas son empleadas como tamizaje y las pruebas treponémicas, como confirmatorias. Se consideraba hasta hace pocos años tres pruebas treponémicas estándar, FTA-ABS (*fluorescent treponemal antibody absorption test*), FTA-ABS de doble coloración y MHA-TP (microhemaglutinación), las que usan al *T. pallidum* como antígeno y se basan en la detección de anticuerpos contra componentes treponémicos. Las pruebas treponémicas se usan para verificar la reactividad de las pruebas no treponémicas, pueden ser usadas para confirmar una sospecha con evidencia clínica de sífilis, como ocurre en la sífilis tardía, y cuando las pruebas no treponémicas son no reactivas. Pero, las pruebas treponémicas son técnicamente más difíciles y costosas que las pruebas no treponémicas y algunas veces no se pueden usar para monitorear el tratamiento. Actualmente se realizan generalmente tres o más ensayos simultáneos, para el diagnóstico serológico de la sífilis. La tecnología de ADN recombinante ha permitido la purificación de antígenos treponémicos como el TpN15, TpN17, TpN47 y TmpA, su clonación y expresión, que han llevado al desarrollo de pruebas de anticuerpos treponémicos de nueva generación como el enzoinmunoensayos (EIA), el Western blot (WB), y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los EIA son muy apropiados para procesar grandes volúmenes de muestras, porque pueden ser automatizados, y obtenerse una lectura objetiva generando reportes electrónicamente, con lo que se reduce los errores en la transcripción de datos. El EIA específico para IgM contra treponema no detecta sífilis tardía, además no debe usarse como tamizaje. Sin embargo en la sífilis temprana, la prueba que detecta IgM específico, es la más sensible. El WB treponémico, se ha desarrollado como una alternativa a las pruebas FTA-ABS o MHA-TP para la confirmación del diagnóstico de la sífilis. WB se puede usar para detectar tanto IgG como IgM. En los últimos años, se han desarrollado nuevas pruebas basadas en la amplificación de ADN de *T. pallidum* y la PCR ha incrementado su sensibilidad para detectar *T. pallidum* a menos de 10 microorganismos, pero es aún una técnica que se realiza básicamente en laboratorios de investigación.

PALABRAS CLAVE: Diagnóstico; Sífilis; *Treponema pallidum*; Estructura; Serología.

Dermatol Perú 2004;14: 192-199

SUMMARY

The diagnosis of syphilis depends on clinical findings, examination of lesions for treponemes, and/or serologic tests. Serologic tests are divided into nontreponemal and treponemal tests. Traditionally nontreponemal tests are useful for screening, while treponemal tests are used as confirmatory tests. Three tests were considered standard treponemal tests: FTA-ABS, FTA-ABS double staining, and MHA-TP (The microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies). These tests use *T. pallidum* as the antigen and are based on

the detection of antibodies directed against treponemal components. Treponemal tests are used primarily to verify reactivity in the nontreponemal tests. Although the treponemal tests also may be used to confirm a clinical impression of syphilis in which the nontreponemal test is no reactive but there is evidence of syphilis, such as might occur in late syphilis. Unfortunately, treponemal tests are technically more difficult and costly to perform than nontreponemal tests and sometimes cannot be used to monitor treatment. In actual practice, three or more assays are performed simultaneous for the serologic diagnosis of syphilis. Recombinant DNA technology involving the cloning, expression, and purification of treponemal antigens such as TpN15, TpN17, TpN47 and TmpA has led to the development of a new generation of treponemal antibody tests, such enzyme immunoassays (EIA), Western blot (WB), and polymerase chain reaction (PCR).

¹ Unidad de Inmunodiagnóstico, Departamento de Patología Clínica, Hospital Nacional Guillermo Almonacid C. EsSalud

² Profesor Asociado de Inmunología y Farmacología, Departamento de Ciencias Dinámicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos



EIAs are ideally suited for processing large numbers of specimens because they can be automated, results are read objectively and reports are generated electronically, reducing transcription errors. Unfortunately, EIA treponemal-specific IgM is not often detected in late syphilis and therefore, IgM-specific assays should not be used for screening. However, for early syphilis, tests that detect *T. pallidum*-specific IgM are the most sensitive. The treponemal WB, has been performed as an alternative to either the FTA-ABS or MHA-TP tests for the confirmation of the serological diagnosis of syphilis. The WB can be used to detect either *T. pallidum* specific IgG or IgM. In recent years, new diagnostic assays based on the amplification of *T. pallidum* DNA have been developed and PCR has increased the sensitivity of *T. pallidum* detection to less than 10 microorganisms, but it still remains a technique performed mostly in research laboratories.

KEY WORDS: Diagnosis; Syphilis; *Treponema pallidum*; Structure; Serology

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Se proponen hasta tres teorías para el origen de la sífilis: la teoría del nuevo mundo, que propone que la sífilis era endémica en la zona actualmente conocida como Haití y que fue llevada al viejo mundo por Cristóbal Colón; la teoría del viejo mundo o precolombina que afirma que la sífilis provenía del África central, y llegó a Europa mucho antes que Colón llegara a América y la teoría unitaria, que sostiene que todas las infecciones por treponema eran una sola entidad clínica, y sus manifestaciones variaban de acuerdo a condiciones del medio ambiente, como el clima. Lo que si está muy claro es que para 1495 la sífilis era epidémica en Europa, y que llegó a otros países como la India en 1498, a la China en 1505 y a Japón en 1569.

Durante el Renacimiento esta enfermedad tuvo varios nombres, como la gran maldición (en inglés: *the great pox*), enfermedad venérea, enfermedad francesa o Morbus Gallicus, enfermedad italiana, española, alemana o polaca. Lo cierto es que ningún país aceptaba ser el origen de la nueva plaga y cada cual la adjudicaba a sus enemigos, para los turcos por ejemplo, era la enfermedad de los cristianos. El término enfermedad francesa o Morbus Gallicus fue el más aceptado en esa época, hasta que en 1530 el poeta italiano, Girolamo Fracastoro (1483–1553), que además era astrónomo, botánico, matemático y filósofo, escribió un poema denominado '*Syphilis sive morbus gallicus*', que se traduce como 'Sífilis y la enfermedad francesa'; trataba de un pastor llamado Sífilis, que fue afectado por la enfermedad Morbus Gallicus. Como era de esperarse, rápidamente se aceptó el nuevo término para esta enfermedad, por que así no se afectaba el buen nombre de las naciones. Pero además Fracastoro, en 1546, escribió "*De contagione et contagiosis morbis et curatione*", donde formuló tres formas de transmisión para esta enfermedad, una forma directa entre humanos al igual que la sarna y la lepra, una forma indirecta a través de objetos como

ropa o a través de animales y la tercera en que estos gérmenes eran atraídos por los humores o por la peste.

Según John Hunter (1728-1793), la sífilis y la gonorrea eran una sola enfermedad y no fue hasta 1838, que Philippe Ricord demostró que eran entidades diferentes; además propuso clasificar la sífilis en primaria, secundaria y terciaria. Los primeros modelos animales corresponden a 1903, y fue Ilya Ilich Metchnikoff y Pierre Roux quienes transmitieron el agente causal de la sífilis a chimpancés, según ellos éste era un virus, y lograron la transmisión de la enfermedad entre primates, poco después dos investigadores italianos inocularon el germen en testículos y escroto de conejos⁽¹⁾

Fueron Fritz Schaudinn y Paul Hoffman, microbiólogos alemanes, quienes en 1905 realizaron las primeras observaciones al microscopio del *Treponema pallidum*, con coloración de Giemsa modificada y demostraron que la espiroqueta era el agente causal de la sífilis. Un año después August von Wassermann, patólogo alemán, modificó la técnica de fijación del complemento, utilizando hígados de recién nacidos fallecidos por sífilis, que luego se conoció como la reacción de Wassermann. En 1906, se le atribuye a Karl Landsteiner y a Viktor Mucha el desarrollo de la microscopía de campo oscuro. Landsteiner también demostró que en la reacción de Wassermann se podían usar otros tejidos, especialmente corazón bovino, luego se le añadió a la técnica original de Wassermann, colesterol y lecitina para incrementar la sensibilidad de los antígenos. En 1912 Nichols y Hough aislaron el *Treponema pallidum*, subespecie *pallidum* del líquido cefalorraquídeo (LCR) de un paciente con neurosífilis y lo inocularon en testículos de conejos adultos, logrando mantener esta cepa viable, la que se denominó cepa Nichols. En 1922 Kahn desarrolló un test de floculación que no requería complemento y podía observarse microscópicamente en pocas horas^(2,3). Fue recién en 1941, que Mary Pangborn purificó la cardioplipina del corazón bovino, mediante repetidas precipitaciones con cloruro de bario, ésta se mezcla con colesterol y lecitina para formar un antígeno estable usado en la detección de anticuerpos contra la sífilis, lo que permitió el desarrollo de la prueba de VDRL⁽⁴⁾.

Nelson y Mayer desarrollaron en 1949, la primera prueba con anticuerpo treponémico, denominada prueba de inmovilización del treponema (TPI), que usaba como antígeno la cepa Nichols y complemento sérico para inmovilizar los treponemas vivos, luego se observa al microscopio de campo oscuro, su inconveniente es que es laboriosa, costosa, poco sensible y con una especificidad del 50%. En 1953, D'Allesandro y Dardanoni prepararon un antígeno de *Treponema phagedenis*, conocido como treponema de Reiter o cepa Reiter, un organismo no patógeno que a diferencia del *T. pallidum* subespecie *pallidum*, es fácilmente cultivable *in vitro*. Poco después en 1957, apareció la prueba de anticuer-



pos treponémicos fluorescentes (FTA), esta prueba tenía el inconveniente de alto porcentaje de reacciones inespecíficas con la flora normal humana y fue modificada por Deacon y Hunter en 1962, usando un sonicado de cultivos de espiroquetas de la cepa Reiter a los que se le removieron los antígenos comunes por absorción, lo que llevó al desarrollo del FTA-ABS, más sensible y específico. Rathlev en 1965 aplicó la prueba de hemaglutinación al estudio de la sífilis, utilizando eritrocitos de carnero sensibilizados con un ultrasonido de la cepa Nichols, luego la técnica fue modificada con el uso de un sorbente como el usado para el FTA-ABS. Inicialmente esta prueba se realizaba en tubo, luego evolucionó al uso de microvolúmenes denominándose microhemaglutinación para *T. pallidum* (MHA-TP)⁽³⁾.

Tanto FTA-ABS, como MHA-TP tienen gran utilidad en la actualidad, y el FTA-ABS se consideró por muchos años la prueba confirmatoria para el diagnóstico de la sífilis. Fue en 1998 que se identificó el genoma completo del *T. pallidum*, esto ha permitido el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas altamente sensibles y específicas para la detección de anticuerpos o de componentes de la estructura de este microorganismo, mediante la producción de péptidos producidos por técnicas de ARN o ADN recombinante⁽⁵⁾.

CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA

T. pallidum es una bacteria miembro de la familia Spirochaetaceae, género Treponema, conformada 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. Antes pertenecía a este grupo el *T. carateum*, que produce la pinta, pero fue separado por carecer de información genética. Las especies no patógenas se encuentran en la flora normal del tracto digestivo, tracto genital y cavidad oral.

El *T. pallidum* tiene una estructura helicoidal sumamente fina, de 6 a 15 μm de largo y 0,1 a 0,2 μm de ancho. Su composición es 70% proteínas, 20% lípidos, y 5% carbohidratos. La porción lipídica está formada por varios fosfolípidos, dentro de los que destaca la cardiolipina. El *T. pallidum* se caracteriza por tener una pared celular flexible, rodeando la pared se encuentran unas pequeñas microfibrillas, que presenta flagelos denominados endoflagelos o flagelos periplásmicos. Tapizando a la pared celular y a los endoflagelos, se encuentra una bicapa externa, similar a la estructura de las bacterias gramnegativas. La membrana externa que rodea al flagelo periplásmico es un complejo de peptidoglicano citoplasmático y un cilindro protoplásmico. Esta membrana contiene la mayoría de las proteínas integrales y abundantes lipoproteínas, siendo la más antigénica la que tiene 47 kilodaltons (kDa); se encuentra anclada por lípidos en la

membrana citoplasmática. Se ha demostrado que la membrana externa del *T. pallidum* reacciona pobremente con los anticuerpos específicos del suero de pacientes sífilíticos, su baja antigenicidad explica la persistencia de este microorganismo por largos períodos de tiempo⁽⁶⁾. Su motilidad es característica, consiste en una rápida rotación sobre su eje longitudinal; necesita un ambiente microaerófilico, rico en carbohidratos, un pH de 7,2 a 7,4, y una temperatura de 30 a 37°C, y aún no se ha logrado su cultivo exitoso *in vitro*.

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 uno; el gen que codifica cada polipéptido será: *tnp* (en letras minúsculas e itálicas), 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 y corresponden al core.

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 del cilindro protoplásmico. 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^(7,8).



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.

Mediante WB de antígenos reconocidos por el suero sifilítico, 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.

En modelos humanos in vivo, mediante inoculación intradérmica de lipoproteínas de *T. pallidum*, se analizó 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 quimoquinas (CXCR4 y CCR5), se determinó que el contenido de las ampollas eran células dendríticas, particularmente una población monocitoide 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.

Otros investigadores estudiaron biopsias de lesiones sifilíticas primarias y secundarias, mediante técnicas de RT-PCR (*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 citoquinas Th1, interleuquina-2 (IL-2), interferón gama (IFN- γ), e interleuquina-12 (IL-12).

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. (TnpA), correlaciona con resistencia a reinfección por *T. pallidum*⁽⁹⁾. 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 protectorio⁽¹⁰⁾.

NUEVAS PRUEBAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA SÍFILIS

El estudio del genoma completo del *T. pallidum* y la tecnología de ADN recombinante, que involucra la clonación, expresión y purificación de antígenos treponémicos como TpN15, TpN17, TpN47 y TnpA han llevado al desarrollo de pruebas de anticuerpos treponémicos de nueva generación, como son las tiras inmunocromatográficas, enzoinmunoensayos (EIA), Western blot (WB) y reacción en cadena a la polimerasa (PCR).

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⁽¹¹⁻¹³⁾.

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 enzimoimmunoensayo 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 tra-

tamiento, 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⁽¹⁴⁻¹⁷⁾.

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 anti-



cuerpo 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⁽¹⁸⁾. 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 (LES), 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%^(3, 19-21).

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 (TmpA), que se purificó mediante HPLC reversa (cromatografía líquida reversa de alta performance). 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 prueba⁽²²⁻²⁴⁾.

INMUNOFUORESCENCIA 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 10^8 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 10^7 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%⁽²⁵⁾.

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 desnaturada 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 desnaturación, 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 desnaturado 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⁽³⁾. 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⁽²⁶⁾.

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 modifica-

ción 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*⁽²⁷⁾. 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%⁽²⁸⁾.

En la Figura 1, se presenta como resumen un algoritmo para pruebas de tamizaje para sífilis.

CONCLUSIONES

La falta de medios para cultivar óptimamente el *T. pallidum* ha llevado al desarrollo de nuevas pruebas muy sensibles y específicas. Las que han logrado aun mayor sensibilidad y especificidad con el desarrollo de técnicas moleculares y la identificación completa del genoma del *T. pallidum*. Muchas de ellas por su sencillez se adaptan con facilidad a la rutina de los laboratorios clínicos, otras por su laboriosidad y complejidad quedan básicamente al uso de laboratorios de investigación.

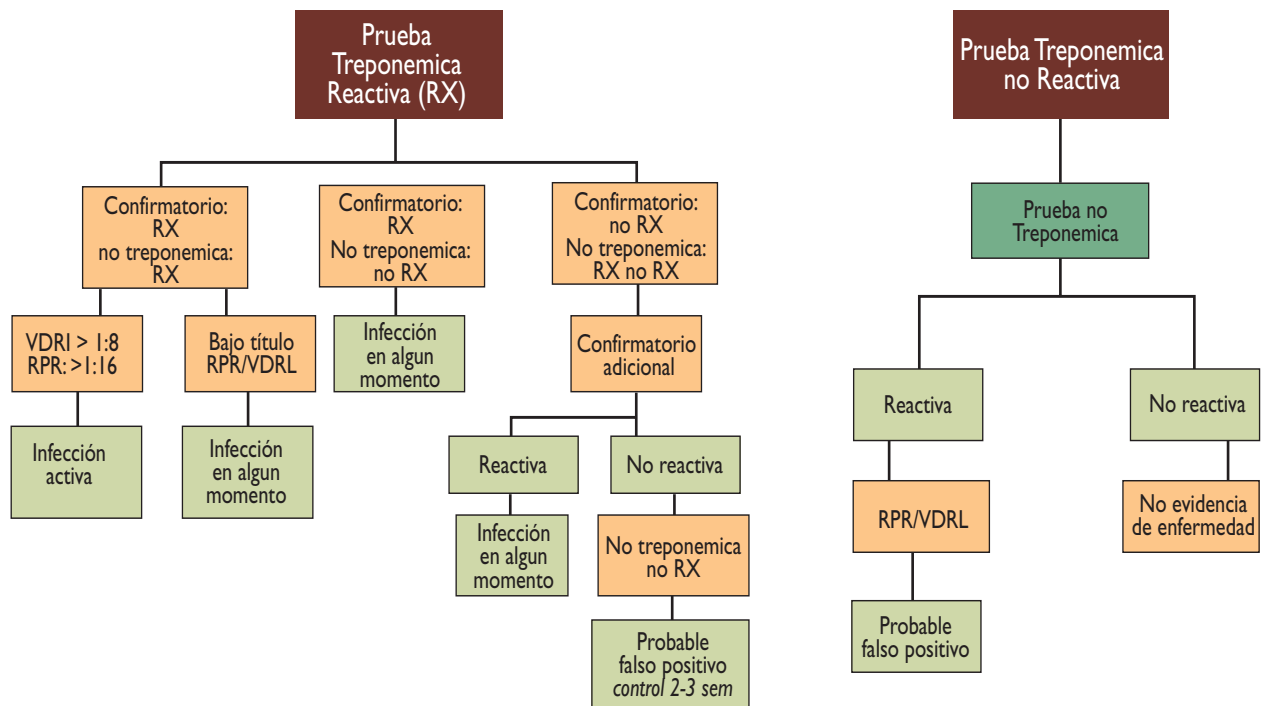


Figura 1. Pruebas de tamizaje para sífilis



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Krause RM. Metchnikoff and syphilis research during a decade of discovery, 1900-1910 Development of an animal model and a preventive treatment set the stage for progress. *ASM News* 1996; 62:307-10.
2. Singh AE, Romanowski B. Syphilis: Review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:187-209.
3. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:1-21.
4. Pangborn MC. A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc Soc Exper Biol Med* 1941;48:484-6.
5. Fraser CM. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* 1998; 281:375-88.
6. 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; 60:1076-88.
7. Norris SJ. The *Treponema Pallidum* Polypeptide Research Group. Polypeptides of *Treponema pallidum*: Progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Microbiol Rev* 1993; 3:750-79.
8. Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Surface antigens of the syphilis spirochete and their potential as virulence determinants. *Emerging Infect Dis* 1997; 3:11-20.
9. Salazar JC, Hazlett KRO, Radolf JD. The immune response to infection with *Treponema pallidum*, the stealth pathogen. *Microbes Infect* 2002; 4:1133-40.
10. Leader BT, Hevner K, Molini BJ, Barrett LK, et al. Antibody responses elicited against the *Treponema pallidum* repeat proteins differ during infection with different isolates of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Infect Immun* 2003; 71:6054-7.
11. Zarakolu P, Buchanan I, Tam M, et al. Preliminary evaluation of an immunochromatographic strip test for specific *Treponema pallidum* antibodies. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3064-5.
12. Lien TX, Tien NT, Chanpong GF, et al. Evaluation of rapid diagnostic tests for the detection of human immunodeficiency virus types 1 and 2, hepatitis B surface antigen, and syphilis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62:301-9.
13. Díaz T, Almeida MG, Georg I, Maia SC, et al. Evaluation of the determine rapid syphilis TP assay using sera. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:98-101.
14. Young H. Guidelines for serological testing for syphilis. *Sex Transm Infect* 2000; 76:403-5.
15. Nesteroff S. Serology: Syphilis. 2004; Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA) Serology Quality Assurance Program (QAP). 1-14 <http://www.rcpaqap.com.au/serology/journals/journals.html>
16. Muller F, Moskopidis M. Evaluation of an enzyme immunoassay for IgM antibodies to *Treponema pallidum* in syphilis in man. *Br J Vener Dis* 1984; 60:288-92.
17. Association for Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases. UK National Guidelines on the Management of Early Syphilis Clinical Effectiveness Group 2002 pp1-18.
18. Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JGR. Immunoblotting and Immunodetection. *Current Protocols in Molecular Biology* 2005; Unit 10.8 pp10.8.1-10.8.24 Wiley InterScience. http://www.mrw.interscience.wiley.com/cp/cpmb/cpmb_contents_fs.html
19. Sambri V, Marangoni A, Eyer C, et al. Western immunoblotting with five *Treponema pallidum* recombinant antigens for serologic diagnosis of syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8:534-9.
20. Wichera K, Horowitzb HW, Wichera V. Laboratory methods of diagnosis of syphilis for the beginning of the third millennium. *Microbes Infect*. 1999; 1:1035-49.
21. Backhouse JL, Nesteroff SI. *Treponema pallidum* western blot: Comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 39:9-14.
22. Hagedorn HJ, Kraminer-Hagedorn A, De Bosschere K, et al. Evaluation of Inno-Lia™ Syphilis assay as a confirmatory test for syphilis. *J Clin Microbiol* 2002; 40:973-8.
23. Ebel A, Vanneste L, Cardinaels M, Sablon E, et al. Validation of the Inno-Lia™ syphilis kit as a confirmatory assay for the detection of *Treponema pallidum* antibodies. *J Clin Microbiol* 2000; 38:215-9.
24. Baetens D, Weise B, et al. Evaluation of the Inno-Lia™ Syphilis assay. Poster 10th European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Meeting. Stockholm, Sweden. 28-31 May 2000
25. Marangoni A, Sambri V, D'Antuono A, et al. *Treponema pallidum* surface immunofluorescence assay for serologic diagnosis of syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7:417-21.
26. Wicher K, Abbruscato F, Wicher V, et al. Identification of persistent infection in experimental syphilis by PCR. *Infect Immun* 1998; 66:2509-13.
27. Centurion-Lara A, Castro C, Shaffer JM, et al. Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1348-52.
28. Vázquez F, Luis Otero L, Ordás J. Actualización en infecciones de transmisión sexual: epidemiología, diagnóstico y tratamiento. *Enf Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22:392-411