

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

Caracterización de muestras para el diagnóstico de Sífilis

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología

Micaela Villalba - 213494

Tutora: Silvina Rossi

2020

Declaración de autoría

Yo, Micaela Villalba, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Trabajo Final de Carrera;
- Cuando he consultado el trabajo de otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado la obra de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Micaela Villalba

Montevideo, 10 de Marzo de 2020.

Agradecimientos

En una primera instancia, quisiera agradecer a mi tutora Silvina Rossi por su disponibilidad y su ayuda que lograron enriquecer considerablemente el trabajo.

En segunda instancia, quiero agradecer a todo equipo de laboratorio de Biotecnología de el Polo Tecnológico de Pando por permitirme utilizar sus instalaciones y por la ayuda brindada.

Por otro lado, me gustaría agradecer a la Universidad ORT Uruguay, así como a sus docentes por la enseñanza brindada a lo largo de estos años.

Por último, me gustaría agradecer de manera especial a familia, novio y amigos por el incondicional apoyo brindado a lo largo de toda la carrera.

Resumen

La sífilis es una enfermedad infecciosa causada por el microorganismo *Treponema pallidum*. La forma más frecuente de contagio es por transmisión sexual.

Actualmente existen variedad de métodos de diagnóstico de la infección. Dentro de las pruebas serológicas se detectan dos tipos de anticuerpos: los llamados no treponémicos, y los treponémicos o específicos (IgG e IgM).

Los tests no treponémicos (NTT) detectan anticuerpos producidos frente a un antígeno lipoideo que es el resultado de la interacción de *T. pallidum* con los tejidos del huésped y presenta resultados falsos positivos con cierta frecuencia. A pesar de esto, constituyen métodos de diagnóstico serológico adecuados para las primeras etapas de la enfermedad, Sífilis primaria y Sífilis secundaria, dado que los anticuerpos contra estos antígenos se generan tempranamente y van desapareciendo a medida que avanza la enfermedad.

Los tests treponémicos (TT), detectan anticuerpos contra proteínas treponémicas; su generación requiere la puesta en marcha de la inmunidad adaptativa, por lo que aparecen un poco más tardíamente que los anteriores. Las pruebas treponémicas más utilizadas comprenden Inmunofluorescencia (IFI), Hemaglutinación (TPHA), Aglutinación de partículas de látex (TPA), ELISA y Western-blot (WB). Estos tests utilizan el patógeno entero fijado al portaobjeto (IFI) o antígenos nativos o preparados en forma de proteínas recombinantes (TPHA, TPA, ELISA, WB), siendo las proteínas Tp47, Tp45, Tp17 y Tp15 las que presentan mayor valor diagnóstico y por lo tanto las más utilizadas.

Dado que la enfermedad, si no es tratada eficazmente, cursa diferentes etapas y los anticuerpos pueden perdurar más allá de la curación, el diagnóstico serológico de Sífilis es complejo ya que no siempre es sencillo identificar perfectamente las etapas de la enfermedad; algunas situaciones son difíciles de resolver, generando cierto grado de incertidumbre. La caracterización de las muestras en función de los anticuerpos presentes, ofrece información valiosa en este sentido y facilita la toma de decisión a la hora de seleccionar las pruebas a utilizar en la rutina del diagnóstico así como, las medidas de tratamiento y prevención de la transmisión de la enfermedad.

Actualmente, existen diferentes recomendaciones para combinar pruebas NT y TT, o algoritmos diagnósticos, que apuntan a lograr una mejora en la eficiencia del diagnóstico de Sífilis. La eficiencia diagnóstica de cada algoritmo depende, en parte, de la prevalencia de la enfermedad en la población en que se aplica.

El objetivo de este trabajo, es caracterizar la respuesta de anticuerpos contra las proteínas Tp47, Tp17 y Tp15 presentes en muestras de suero humano previamente clasificadas en reactivas y no reactivas a Test NT y así generar información que permita seleccionar la combinación de tests diagnósticos más adecuados para una población dada que asiste a un centro asistencial. Para ello, se pusieron a punto pruebas de ELISAs de tipo sándwich, para cada una de las proteínas por separado, detectando selectivamente la clase de los anticuerpos detectados (IgM o IgG). La puesta a punto de los inmunoensayos, involucró la determinación de las concentraciones óptimas de cada proteína y el buffer de sensibilización adecuado y la selección de una dilución adecuada de las muestras que permitiera detectar presencia o ausencia de anticuerpos específicos.

Los resultados obtenidos para los anticuerpos detectados, se contrastaron con los resultados de la prueba de RPR (Rapid Plasma Reagin, no treponémico).

Se detectó presencia de anticuerpos contra al menos una de las proteínas recombinantes en el 98% de las muestras reactivas por RPR, mientras que la mayoría de las muestras no reactivas por RPR, no se detectó anticuerpos contra ninguno de los antígenos estudiados. Las muestras que mostraron resultados discordantes entre el RPR y las pruebas de ELISA desarrolladas, se analizaron por Western Blot contra una mezcla de las 3 proteínas recombinantes; la prueba de WB confirmó los resultados obtenidos por ELISA.

Palabras clave

Sífilis, Serología, ELISA, Proteínas treponémicas, Western Blot.

Abreviaturas

Ac: Anticuerpo

BSA: de sus siglas en inglés- Bovine serum albumin- (Albúmina de suero bovino).

CS: Sífilis congénita

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

g: Gramos

g/L: Gramos por litro

KCl: Fórmula del compuesto químico denominado Cloruro de Potasio, según la nomenclatura

IUPAC.

kDa: kiloDalton

mg: Miligramos

mg/mL: Miligramos por mililitro

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MPM: Marcador de peso molecular

NaCl: Fórmula del compuesto químico denominado Cloruro de Sodio, según la nomenclatura

IUPAC.

Na₂HPO₄: Fórmula del compuesto inorgánico denominado Bifosfato de sodio, según la nomenclatura IUPAC.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPD: o-Phenylenediamine dihydrochloride

PBS: de sus siglas en inglés- Phosphate buffered saline- (Tampón fosfato salino).

KH₂PO₄: Fórmula del compuesto químico denominado Fosfato de potasio monobásico, según la

nomenclatura IUPAC.

RPR: reaginación plasmática rápida

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

V: Volt, Unidad de tensión eléctrica, potencial eléctrico y fuerza electromotriz del Sistema Internacional

Tpp: Proteína treponémica

WB: Western Blot

µg: Microgramo

µg/mL: Microgramo/mililitro

Índice

1. Introducción	10
1.1. La enfermedad	10
1.2. Prevalencia de la enfermedad	12
1.3. Neurosífilis	12
1.4. Respuesta inmune contra T. Pallidum	13
1.5. Diagnóstico	14
1.6. RPR (reagina plasmática rápida)	17
1.7. ELISA	18
1.8. Antígenos recombinantes	19
1.9. Western Blot	20
2. Objetivos	22
2.1. Objetivo general	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. Materiales y métodos	23
3.1. Buffer de sensibilización	23
3.2. Bloqueo	23
3.3. Muestra	23
3.4. Conjugado	24
3.5. Sustrato	24
3.6. ELISA	24
3.7. Clasificación de las muestras	25
3.8. Western Blot	25
4. Resultados y discusión	26
4.1. Sensibilización	26
4.2. Muestras para controles	29
4.3. Análisis de muestras	32
4.4. Western Blot	40
5. Conclusiones	43
6. Referencias bibliográficas	44
7. Anexos	47

7.1. Construcción de proteínas treponémicas	47
7.2. RPR	47
7.3. Ejemplo de cálculos de normalización	51
7.4. Cálculos para definir valor de corte	52
7.5. Marcador de peso molecular	57

1. Introducción

1.1. La enfermedad

La sífilis es causada por la espiroqueta *Treponema pallidum subsp. pallidum* y afecta únicamente a los seres humanos. ¹ Se trata de un microorganismo móvil de forma espiral, estrechamente relacionado con los organismos causantes de las treponemosis no venéreas, *T. pallidum subsp. pertenue* (pian), *T. pallidum subsp. endémico* (sífilis endémica) y *T. herrejoni (carateum)* (pinta). Estos cuatro patógenos son morfológica, antigénicamente idénticos y sólo se pueden diferenciar por su modo de transmisión, epidemiología, manifestaciones clínicas y, más recientemente, como resultado de la secuenciación genética. ²

Treponema pallidum subsp. pallidum, sólo puede cultivarse in vivo y dada sus dimensiones no puede examinarse con simples tinciones de laboratorio ya que se encuentra en el límite de resolución óptica para microscopios convencionales. Su tiempo de generación en los tejidos humanos es de unas 8 horas. ³



Figura 1: *Treponema pallidum* ¹

La sífilis generalmente se transmite por contacto sexual (transmisión horizontal) y clínicamente se caracteriza por episodios de enfermedad activa, interrumpidos por lapsos de latencia. ^{1,4,5} También puede transmitirse verticalmente, de madre a hijo, durante la gestación. ^{1,6}

Sin tratamiento, la enfermedad pasa por cuatro etapas: sífilis primaria, sífilis secundaria, sífilis latente, y sífilis tardía o terciaria. ⁴ La figura 2 muestra el curso de la sífilis no tratada. La enfermedad es contagiosa solo durante las etapas de sífilis primaria y secundaria.

Luego de un periodo de incubación de 3 semanas, aparecen las lesiones primarias conocida como “chancro”, una lesión ulcerada, indolora que puede durar entre 2 a 6 semanas, y que desaparece espontáneamente. La lesión se encuentra comúnmente en el surco coronal, en el glande o el eje del pene en los hombres, y en la vulva, las paredes vaginales o el cuello uterino en las mujeres. Las lesiones extragenitales son poco frecuentes. Como con frecuencia son indoloras, las lesiones primarias pueden pasar desapercibidas.² La lesión primaria provoca la actividad del sistema inmunitario mediado por células lo que resulta en la eliminación de la mayoría de las espiroquetas, curando el chancro.⁷

Sin embargo, algunas espiroquetas escapan, proliferan, y finalmente dan lugar a una sífilis secundaria caracterizada por lesiones mucocutáneas y adenitis linfática generalizada.

La característica principal de la sífilis secundaria es una erupción cutánea no irritante distribuida uniformemente; a menudo puede ser visto en las palmas de las manos y las plantas de los pies. La erupción puede estar acompañada de una linfadenopatía generalizada y fiebre, dolor de cabeza y malestar general. En áreas cálidas y húmedas como la vulva o la región perianal, la erupción puede agrandarse para formar estructuras elevadas y en las superficies mucosas se forman lesiones serpiginosas grises y blancas superficiales conocidas como “úlceras de huellas de caracol”. Todas estas manifestaciones visibles se resuelven espontáneamente en la sífilis no tratada.

Pasada la etapa de Sífilis secundaria, se continua con un largo periodo de latencia de varios años. En un tercio de la población enferma no tratada se desarrolla la Sífilis terciaria tardía, manifestándose con lesiones mucocutáneas, osteoarticulares o parenquimatosas de carácter destructivo llamadas “gomas”, aortitis con formación de aneurismas o afección sintomática del sistema nervioso central.^{5,8} En general, los signos y los síntomas de estas manifestaciones tardías generalmente ocurren muchos años después de la infección inicial, aunque el proceso de la enfermedad puede avanzar significativamente más rápidamente en pacientes coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).²

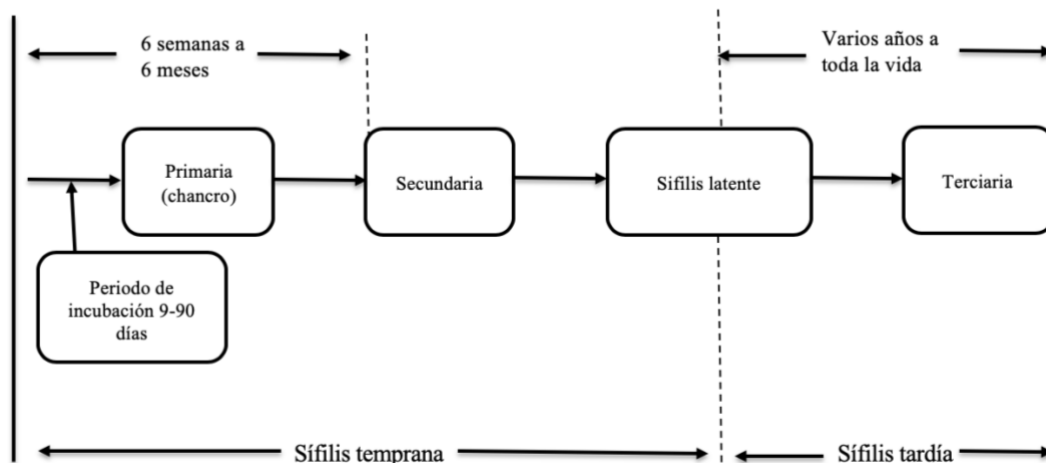


Figura 2: Representación esquemática del curso de la sífilis no tratada.

1.2. Prevalencia de la enfermedad

La sífilis es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes, de amplia distribución mundial y que ha resurgido en grupos con conductas heterosexuales.⁹ A pesar de su disminución con la utilización de la penicilina a mediados del siglo pasado, actualmente, continúa siendo un problema de salud pública en todo el mundo. La precisión de las pruebas de diagnóstico es crítica para el control exitoso de los brotes de sífilis epidémica, incluidos los hallazgos de casos, la pronta administración de la terapia a las personas infectadas y el manejo de la pareja.¹⁰

De 1944 a 1954, las tasas de casos reportados de sífilis en cualquier etapa disminuyeron en más del 75 %. En 1975, las tasas de sífilis general habían disminuido en casi un 90%. Aún más dramática fue la reducción de la mortalidad por sífilis, que disminuyó en más del 98%.¹¹ Con la utilización de penicilina, la mortalidad de la Sífilis descendió a valores cercanos a 0 a nivel mundial. La penicilina es el antibiótico de probada eficacia para curar a la mujer embarazada, evitar la transmisión vertical y tratar al feto en el caso que se haya infectado.¹²

Desde el año 2000 se ha reportado un resurgimiento de la enfermedad en varios países, entre los que se destaca Estados Unidos, Canadá. En China, la sífilis se encuentra entre las cinco enfermedades infecciosas más frecuentes.¹³

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que en el 2012 se produjeron 5,6 millones de nuevos casos de sífilis en jóvenes y adultos de 15 a 49 años en todo el mundo, con alrededor de 18 millones de casos ya existentes. En América hubo alrededor de 471.000 nuevos casos de sífilis en mujeres y 466.000 nuevos casos en hombres en el 2012, que se sumaron al alrededor de 1 millón de casos ya existentes en mujeres y 992.000 casos ya existentes en hombres. En la Región de las Américas, hubo unos 24.600 casos de transmisión materno-infantil de sífilis en el 2017.⁴ En vista de la situación mundial, las metas sanitarias para 2030 de la OMS es de reducir en un 90% la incidencia de Sífilis respecto a 2018 y reducir el número de casos de Sífilis congénita (CS).¹⁴

Los casos de Sífilis congénita, resultado de la transmisión vertical de una madre infectada a su feto durante el embarazo, son de especial atención para el ministerio de Salud Pública (MSP); su eliminación ($< 0.5/1000$ nacimientos) constituyen objetivos sanitarios nacionales para el período 2015-2020.¹⁵ Es por esto que a partir de 2013 se comenzaron a implementar auditorías a todas las mujeres embarazadas con prueba de sífilis reactiva. La incidencia de Sífilis congénita para el año 2016 fue de 1,5 casos/1000 nacidos vivos a nivel nacional, descendiendo en este año pero sin alcanzar los objetivos de eliminación a nivel nacional.¹⁶⁻¹⁸

1.3. Neurosífilis

La neurosífilis debida a *T. pallidum* puede ocurrir en cualquier momento después de la infección inicial. Las manifestaciones clínicas pueden variar ampliamente y pueden incluir meningitis asintomática, sífilis ocular, otosífilis, sífilis meningovascular, tabes dorsal y paresia general según la etapa. El diagnóstico de neurosífilis, a menudo a partir de sospecha en base a hallazgos clínicos junto con pruebas serológicas positivas requiere

la confirmación mediante punción lumbar y análisis de líquido cefalorraquídeo. Las manifestaciones de neurosífilis dependen de la etapa de la enfermedad. Durante la sífilis temprana, la afectación neurológica puede ser asintomática, aunque puede observarse meningitis sintomática. Otros hallazgos comunes incluyen pérdida de audición, tinnitus y debilidad facial. ¹²

Después del primer año de infección, pueden desarrollarse síntomas meningo vasculares y similares a un accidente cerebrovascular. Estos síntomas incluyen hemiparesia, hemiplejía, convulsiones y afasia.¹²

Durante la etapa tardía, generalmente después de 10 años, se pueden ver las manifestaciones clásicas de paresia general o tabes dorsal. La paresia general se presenta con cambios en el afecto, la sensibilidad y la personalidad, reflejos hiperactivos, dificultad para hablar, trastornos pupilares y temblores de atrofia óptica. Tabes dorsal se presenta con dolor lancinante en las extremidades inferiores, ataxia, alteraciones pupilares, incontinencia urinaria o intestinal, un signo positivo de Romberg, neuropatía periférica y afectación del nervio craneal. Cualquier hallazgo neurológico anormal sin una etiología clara debe considerarse una posible manifestación de neurosífilis. ¹²

1.4. Respuesta inmune contra *T. Pallidum*

La infección por *T. pallidum* provoca simultáneamente respuestas inmunes innatas y adaptativas locales y sistémicas. Las lipoproteínas y los glucolípidos presentes debajo de la membrana externa de *T. pallidum* activan la respuesta inflamatoria innata a través del receptor tipo Toll 4 (TLR4); estas lipoproteínas no están expuestas a la superficie. Los leucocitos fagocitan *T. pallidum* y son destruidos en las vacuolas fagocíticas. Se requiere un alto número de treponemas para activar la respuesta fagocítica, pero ésta puede resultar ineficiente y unos pocos treponemas pueden escapar al reconocimiento. La degradación de los patógenos fagocitados en las vacuolas fagocíticas, se induce en los macrófagos la producción del factor de necrosis tumoral y del ARN mensajero de interleucina-12, lo que favorece el desarrollo de inmunidad de tipo TH1. Las lipoproteínas son los componentes principales de las espiroquetas responsables de la activación de la respuesta inmune innata. ⁶

Los linfocitos T que responden a *T. pallidum* aparecen en las lesiones sífilíticas a medida que disminuye el número de treponemas, lo que sugiere un papel de la inmunidad adaptativa celular, en el control de la infección. En los chancros primarios, predominan las células T CD4 y los macrófagos, mientras que, en las lesiones características de Sífilis Secundaria, la mayor parte del infiltrado celular está compuesto por células T CD8. Esto es sorprendente porque se cree que *T. pallidum* es principalmente un patógeno extracelular. Se observa una mayor expresión de las citocinas proinflamatorias, principalmente interferón- γ en lesiones de Sífilis Primaria y Secundaria. Los linfocitos T circulantes que responden a los antígenos treponémicos se pueden detectar hacia el final de la respuesta primaria, pero las respuestas inmunes mediadas por células alcanzan su punto máximo en la etapa secundaria. El aumento de la apoptosis de los linfocitos de sangre periférica y las células T CD4 por una vía mediada por Fas en pacientes al inicio de la etapa secundaria de la enfermedad, podría explicar la eliminación incompleta de *T. pallidum* de las lesiones, conduciendo a una infección crónica. Los mecanismos que conducen a la latencia no se conocen completamente.⁶

La inmunidad humoral ha sido objeto de estudio en la Sífilis desde el descubrimiento de anticuerpos contra cardiolipina a principios del siglo XIX. Los anticuerpos IgM e IgG contra *T. pallidum* son detectables desde que aparece el chancro (es decir, al inicio de la Sífilis Primaria), con anticuerpos contra proteínas de *T. pallidum* detectados en el 90% y anticuerpos contra cardiolipina detectados en el 75% de los casos. Los anticuerpos contra *T. pallidum* reconocen una amplia gama de proteínas, siendo el antígeno de 47 kDa el más inmunogénico. Se alcanzan títulos más altos a medida que la infección se disemina en la etapa secundaria.

Las pruebas de detección de IgM para *T. pallidum* tienen una gran importancia, debido a que son capaces de indicar una infección reciente / activa¹⁹

Si el paciente recibe un tratamiento adecuado, los anticuerpos de clase IgM disminuyen durante 1 y 2 años después del tratamiento, pero los anticuerpos de clase IgG generalmente persisten durante toda la vida del paciente.

En los recién nacidos con infección congénita, la respuesta global de anticuerpos es similar a la respuesta en la sífilis adquirida. Los anticuerpos IgM del recién nacido, contra proteínas específicas de *T. pallidum*, a menudo se pueden detectar en el suero neonatal obtenido al nacer. El rango de respuestas de anticuerpos IgM a las proteínas de *T. pallidum* en los sueros de recién nacidos infectados es comparable al de la infección diseminada (secundaria) en adultos. Sin embargo, la respuesta IgM del lactante es distinta de la de la madre y se dirige uniformemente contra el antígeno de lipoproteína de membrana inmunodominante de 47 kDa. Como cabría esperar en función de la transferencia transplacentaria de IgG, los niveles de IgG y la especificidad antigénica de los lactantes infectados coinciden en gran medida con los de sus madres. La sífilis secundaria y la infección congénita a veces van acompañadas de un síndrome nefrótico de naturaleza inmunológica, que responde rápidamente a la penicilina. ⁶

Aunque los pacientes que han sido tratados previamente para la sífilis pueden reinfectarse, los pacientes no tratados parecen tener al menos un grado de inmunidad a la infección repetida. Este estado se conoce como "inmunidad de chancro" o "chancro rápido". Si bien el desarrollo de un chancro con reinfección es inusual, la inmunidad generada durante la enfermedad no tratada representa sólo una resistencia relativa a la reinfección, que puede depender simplemente del inóculo de desafío. ⁶

1.5. Diagnóstico

El diagnóstico de la sífilis se puede realizar mediante: métodos directos o métodos indirectos (serología).

El diagnóstico directo consiste en detección del patógeno por visualización en microscopio de campo oscuro, inmunofluorescencia directa o pruebas moleculares para secuencias de ADN específicas de *T. pallidum*, en muestras obtenidas de lesiones cutáneas o tejidos. Estos son los métodos de elección para diagnosticar la sífilis temprana.

2

La microscopía de campo oscuro es capaz de establecer un diagnóstico directo de sífilis en casos de enfermedad congénita primaria, secundaria o temprana en adultos. Se requiere un microscopio de campo oscuro y el cumplimiento de estrictas condiciones técnicas para

producir resultados confiables. En la microscopía de campo oscuro, sólo los rayos de luz que inciden sobre los microorganismos o partículas en un ángulo oblicuo, ingresan al objetivo del microscopio, dando lugar a cuerpos brillantes, blancos y luminiscentes sobre un fondo negro. La microscopía de campo oscuro debe ser realizada por personal bien capacitado y experimentado que pueda diferenciar *T. pallidum* de treponemas no patógenos y otros organismos espirales que se encuentran comúnmente en las membranas mucosas genitales y anales. El organismo es identificado por su típica morfología, tamaño y movimiento. Es un organismo delgado (0.10–0.18 µm de ancho), de 6–20 µm de largo, con 8–14 espirales profundas regulares, fuertemente enrolladas.²

La inmunofluorescencia directa (DFA) consiste en hacer reaccionar de anticuerpos marcados con un fluorocromo con la muestra fijada al portaobjetos y requiere la utilización de un microscopio de fluorescencia. Todas las espiroquetas de *T. pallidum* en la muestra aparecen como organismos fluorescentes (si se utiliza fluoresceína se observará una coloración verde manzana), con la morfología típica de *T. pallidum* contra un fondo negro. Tanto la especificidad como la sensibilidad de la prueba de DFA son superiores a las de la microscopía de campo oscuro, especialmente si se usa un anticuerpo monoclonal conjugado al fluorocromo. Desafortunadamente, el conjugado de fluoresceína específico no está disponible comercialmente en muchos países.

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede detectar equivalentes de ADN de <10 organismos en una muestra, al amplificar segmentos genéticos específicos del ADN genómico de *T. pallidum*. Se puede usar para examinar muestras de cualquier exudado, fluido corporal o tejido que contenga la lesión; la muestra puede ser fresca, o un corte histológico fijado e incluido en parafina o criostático. Debido a que las pruebas de PCR comerciales para *T. pallidum* aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América no están disponibles, algunos laboratorios han implementado pruebas de PCR desarrolladas en laboratorio.

Las pruebas de diagnóstico directo son rápidas y de bajo costo. Un resultado negativo en el examen directo del producto de la lesión no descarta la posibilidad de la enfermedad, ya que pueden existir pocos treponemas en la misma, dependiendo de los días de evolución y de la administración de tratamiento previos.³

Las pruebas indirectas consisten en detectar la presencia de anticuerpos generados por la infección. Dependiendo del tipo de antígeno se agrupan en pruebas no treponémicas y pruebas treponémicas.²⁰ Éstas se consideran el pilar principal para diagnosticar la sífilis y para monitorear la eficacia del tratamiento con antibiótico.

Las pruebas no treponémicas son aquellas que detectan anticuerpos generados contra antígenos lipídicos, en las etapas tempranas de la infección por *T. pallidum*. Se propone que estos antígenos lipídicos, provienen del tejido dañado por la infección y del patógeno simultáneamente. Por tratarse de componentes lipídicos también presentes en el tejido propio, la presencia de anticuerpos contra estos antígenos también puede observarse en otras patologías, lo que afecta negativamente su especificidad en relación a Sífilis. No obstante, la generación de anticuerpos contra estos antígenos es un evento temprano en el curso de la respuesta inmune contra *T. pallidum*, lo que los hace altamente sensibles. Los test NT son de bajo costo, fáciles de efectuar y su utilización para la detección de una infección reciente, o para evaluar la respuesta a un tratamiento, está ampliamente aceptada, a pesar de la inespecificidad que presentan. Las principales pruebas de este

grupo son VDRL (Venereal Research Disease Laboratory), RPR (Rapid Plasma Reagin), TRUST (Toluidina Red Unheated Serum Test), USR (Unheated Serum Reagin).²¹ Por tratarse de técnicas de aglutinación, no permiten discriminar entre distintas clases de anticuerpos. Otra de sus desventajas es la posibilidad de presentar fenómenos de prozona cuando las muestras se analizan sin diluir. Estos resultados “falsos negativos”, son frecuentes cuando las muestras poseen altos títulos de anticuerpos, por lo que se recomienda titularlas siempre. También puede obtenerse un resultado negativo en las fases muy tempranas del período primario, incluso cuando la visualización de los treponemas es positiva. ²²

Las pruebas treponémicas, son las que detectan anticuerpos IgG e IgM específicos contra antígeno proteicos de *T. pallidum*, ya que utilizan antígenos de la membrana externa de la espiroqueta y antígenos recombinantes. Presentan una alta especificidad y sensibilidad, por lo que son adecuadas para confirmar los resultados obtenidos con las pruebas no treponémicas. Su desventaja es que no pueden distinguir entre una infección reciente, activa y una infección anterior ya tratada y no contagiosa, debido a que el anticuerpo treponémico permanece de por vida en el paciente; por este motivo tampoco son útiles para seguir pacientes bajo tratamiento. Las pruebas más conocidas de este grupo son FTA-ABS (Inmunofluorescencia indirecta con absorción del suero), TPHA (Microhemaglutinación), ELISA (en sus versiones colorimétricas y quimioluminiscentes) y Western Blot. ²¹ No suelen presentar falsos positivos.³ Estas pruebas son sensibles y específicas. ¹²

Dada la complejidad que presenta el serodiagnóstico de Sífilis, actualmente se proponen tres enfoques, dependiendo de la situación: el algoritmo tradicional, el algoritmo inverso y el algoritmo ECDC, el cual es una variante del algoritmo inverso.

El algoritmo tradicional consiste en la utilización de una prueba no treponémica, (RPR o VDRL), como primera prueba o prueba de tamizaje, seguido de una prueba treponémica como prueba confirmatoria.⁴ Este algoritmo, hace foco en la detección de sífilis temprana y es recomendado por los centros de control y prevención de enfermedades (CDC) de EE.UU.¹⁰ Los casos de sífilis pasadas y tratadas, así como las etapas secundarias o terciarias asintomáticas, no son detectadas con este algoritmo, en su gran mayoría.

El algoritmo inverso consiste en la utilización de un ensayo treponémico automatizado de alta sensibilidad como primera prueba o prueba de tamizaje, seguido de una prueba no treponémica semicuantitativa (se debe analizar la muestra en varias diluciones). Cuando el ensayo de detección treponémico es reactivo pero hay un resultado negativo del ensayo no treponémico, se realiza una tercera prueba a través de un test treponémico de referencia (generalmente FTA-ABS) para resolver los resultados discordantes. Este algoritmo es particularmente útil para la prevención de la Sífilis Congénita, ya que detectaría todas las etapas de la enfermedad, con mayor o menor riesgo de transmisión vertical de Sífilis. La Asociación de Laboratorios de Salud Pública, la Agencia de Protección de la Salud del Reino Unido y la Unión Internacional contra las Infecciones de Transmisión Sexual fomentan el uso del algoritmo inverso.

El tercer algoritmo, conocido como ECDC, ya que es recomendado por el Centro Europeo para la prevención y el control de enfermedades (ECDC) comienza con un ensayo de treponémico de alta sensibilidad, si resulta reactivo se confirma mediante un segundo ensayo treponémico de alta especificidad.¹²

Los tres algoritmos se resumen gráficamente en la Figura 3.

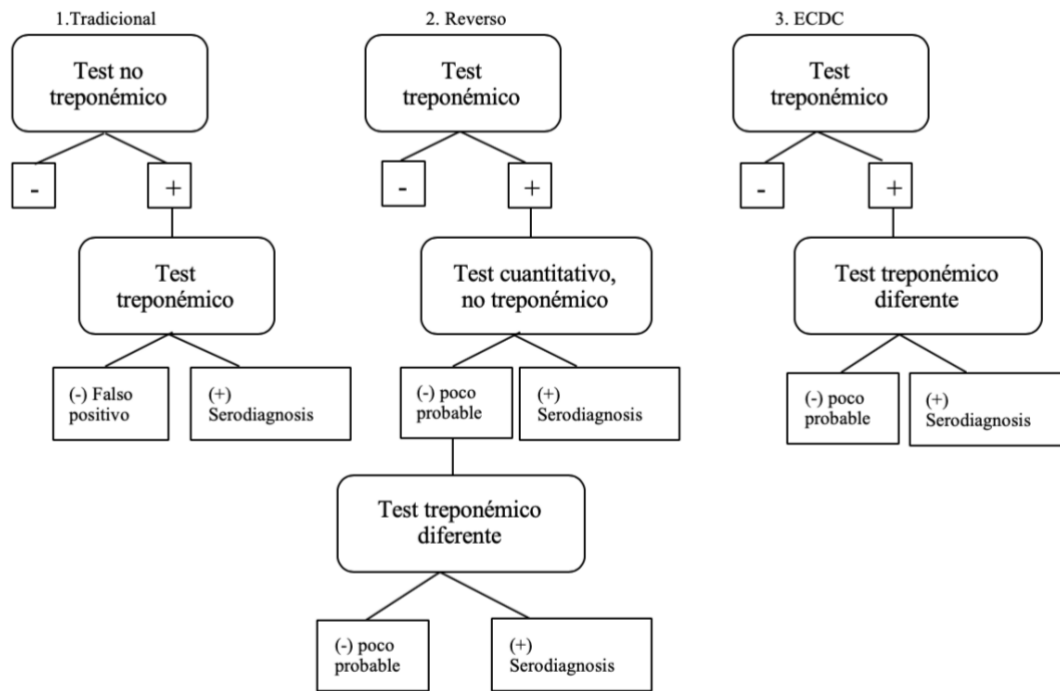


Figura 3: Algoritmos de prueba de sífilis.

La sífilis es una infección fascinante y desconcertante, con manifestaciones clínicas proteicas y ambigüedades diagnósticas y de manejo. *Treponema pallidum subsp. pallidum*, el agente de la sífilis, es difícil de estudiar en parte porque no puede ser cultivado o manipulado genéticamente.²³ Se ha demostrado que todas las pruebas serológicas para sífilis pueden dar resultados falsos cuando existen ciertas condiciones como: otras enfermedades espiroquetales, trastornos autoinmunes o infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. En consecuencia, el uso de un solo método se considera insuficiente para lograr el mejor rendimiento de diagnóstico, y la búsqueda de métodos de diagnóstico nuevos, simples, confiables y que ahorren dinero continúa.²⁴

1.6. RPR (reagina plasmática rápida)

La prueba de la reagina plasmática rápida es una técnica no treponémica de detección para sífilis. Esta técnica detecta anticuerpos IgM e IgG contra cardiolipina presente en el suero de pacientes con sífilis.¹⁹

En el ensayo se utiliza cloruro de clorina (para eliminar la inactivación del suero evaluado), EDTA (para potenciar la estabilidad de la suspensión) y partículas de carbón (para la visualización de la suspensión).¹³

La prueba RPR es relativamente barata y se puede realizar en casi cualquier entorno de laboratorio. Por estas razones es que RPR es el test no-treponémico macroscópico de mayor disponibilidad y uso alrededor del mundo. ¹³

Todas las pruebas no treponémicas pueden presentar fenómenos de prozona - falsos negativos - cuando las muestras son fuertemente reactivas, por lo que es conveniente titularlas siempre. También puede obtenerse un resultado negativo en las fases muy tempranas del período primario, incluso cuando la visualización de los treponemas es positiva. Las pruebas reagínicas son fundamentales para evaluar la eficacia de los tratamientos. Si es eficaz los títulos deberán disminuir significativamente (hasta 8 veces) durante los 6-12 meses siguientes a su inicio. ³

1.7. ELISA

Las pruebas de ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) son inmunoensayos heterogéneos en fase sólida que emplean marcas enzimáticas para evidenciar la reacción entre antígenos y anticuerpos. Son técnicas de laboratorio clínico ampliamente utilizadas para medir la concentración de anticuerpos o antígenos en la sangre. ²²

Los ensayos ELISA se introducen en el diagnóstico de la sífilis por la necesidad de contar con pruebas rápidas, específicas y automatizadas que permitan la pesquisa y confirmación de la misma. En un principio, en la década de los ochenta, usaban extractos treponémicos nativos como antígeno y no estaban aprobadas para el diagnóstico de la enfermedad. Más tarde, en los noventa se introdujeron pruebas que utilizaban antígenos recombinantes de las proteínas de membrana del *T. pallidum* y otras que utilizaban anticuerpos secundarios monoclonales, las cuales detectan tanto IgM como IgG o ambas. ^{9,20}

Durante la infección, se producen anticuerpos contra *T. pallidum* que presentan variada especificidad diagnóstica, algunos reaccionan con antígenos comunes a todas las espiroquetas mientras que otros reaccionan contra antígenos exclusivos de *T. pallidum*.²⁰ Al comienzo de la infección los anticuerpos son IgM, luego rápidamente aparecen anticuerpos IgG que son los predominantes durante el mayor tiempo de la enfermedad. ²⁵ Los anticuerpos IgM para *T. pallidum* indican una infección reciente y/o activa, aunque un resultado negativo no excluye la necesidad de tratamiento, éstos son detectables después de 2 semanas de adquirida la infección, mientras que los anticuerpos de tipo IgG son detectables después de 4 a 5 semanas.²⁵

Esta técnica permite detectar una o más inmunoglobulinas así como antígenos específicos, dependiendo del diseño del ensayo. Se utiliza un conjugado, formado por un anti-anticuerpo o un antígeno, el cual se ha marcado con una enzima (peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, etc.). El antígeno o anticuerpo que se utiliza es inmovilizado sobre un soporte sólido, que es generalmente una placa de poliestireno, por lo que la reacción antígeno-anticuerpo que se produce también queda inmovilizada en el soporte sólido. A esto se le adiciona un sustrato (enzima) marcado con un cromógeno que produce una reacción de color, que es directamente proporcional al analito (antígeno o anticuerpo a ser detectado) y que es cuantificado con un lector de ELISA que es un espectrofotómetro modificado. ²⁰

Actualmente existen en el mercado múltiples formatos de ELISA que utilizan sustratos quimioluminiscentes, detectando niveles muy bajos, aportando mayor sensibilidad analítica.

En la figura 4 se representa esquemáticamente el formato de ELISA utilizado, el antígeno utilizado corresponde a las proteínas treponémicas 15, 17 o 47 y el anticuerpo ligado a enzima sería el anticuerpo anti IgM o IgG conjugado a peroxidasa de rábano.

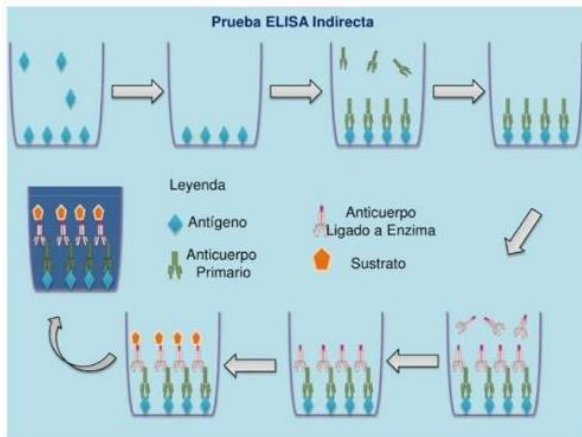


Figura 4: Esquema de ELISA indirecto 26

1.8. Antígenos recombinantes

Las lipoproteínas de membrana de *T. pallidum* son patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que se unen a receptores de reconocimiento de patrones como los receptores de tipo Toll (TLR), siendo los principales responsables de la evasión del sistema inmune por parte de la espiroqueta y de la adhesión de la misma a las células huésped.¹³

La mayoría de las pruebas treponémicas utilizan péptidos sintéticos o proteínas treponémicas recombinantes genéticamente modificadas para detectar todos los anticuerpos treponémicos (IgM e IgG).

La tecnología de ADN recombinante que implica la clonación, expresión y purificación de antígenos treponémicos como Tpp15, Tpp17, Tpp47 y TmpA ha llevado al desarrollo de una nueva generación de pruebas de anticuerpos treponémicos, tales como inmunoensayos enzimáticos (EIA), Western blot (WB) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).²⁷

El uso de antígenos de *T. pallidum* obtenidos por vía recombinante fue una estrategia importante para aumentar la especificidad de las pruebas, dejando de lado el uso de mezclas de antígenos treponémicos pobremente definidas obtenidas de testículos de conejo y difíciles de obtener.

La primera proteína de *T. pallidum* estudiada y utilizada con este objetivo fue la proteína de membrana externa TmpA, cuyo gen fue secuenciado desde 1985, valorándose desde entonces el uso potencial de ELISA con este antígeno expresado en *Escherichia coli*. Su

estructura antigénica también ha sido estudiada a través de péptidos sintéticos sobrelapantes. 9

Actualmente las proteínas más utilizadas en el diagnóstico de Sífilis son las proteínas treponémicas 15, 17, 45 y 47.

Tpp15 es una lipoproteína de membrana de la bacteria *T. pallidum*, con una masa molecular de 15 kDa, y es el principal inmunógeno producido durante el desarrollo de la infección de sífilis en humanos. Esta lipoproteína ha sido descrita como una diana antigénica muy sensible en la respuesta IgM de infecciones congénitas.²⁸ La proteína está compuesta por 141 aminoácidos, de los cuales los primeros 17 residuos corresponden al péptido señal que lo dirigirá a la cara externa de la membrana citoplasmática. 13

Tpp17 es una lipoproteína de membrana de la bacteria, con una masa molecular de 17kDa. Ha sido descrita como antígeno relevante en el diagnóstico de la sífilis, siendo una de los principales inmunógenos producido durante el desarrollo de la infección de sífilis en humanos. Esta lipoproteína fue identificada inicialmente por su fuerte reactividad con sueros humanos infectados por sífilis. 29 De forma análoga a Tpp15, contiene un péptido señal que abarca los primeros 21 aminoácidos de su secuencia 13

Tpp47 es uno de los principales componentes inmunogénicos de la bacteria espiroqueta *T. pallidum* que induce una respuesta humoral temprana que aparece entre los días 3 a 5 tras la infección. Es una lipoproteína de 47kDa, siendo de las proteínas más estudiadas. El antígeno Tpp47 ha sido descrito en la bibliografía como un marcador potencial para detección de la enfermedad activa, ya que anticuerpos IgM frente a Tpp47 han sido detectados en pacientes con sífilis congénita. 30 Diversos reportes afirman que es uno de los mayores componentes antigénicos, los anticuerpos anti-Tpp47 se encuentran en todas las etapas de la sífilis y disminuye en respuesta al tratamiento, resultando de un buen marcador terapéutico. 13

1.9. Western Blot

El Western Blot es una técnica que consiste en una separación proteica mediante electroforesis, seguida por una transferencia de los antígenos a una membrana sintética, manteniendo su posición electroforética. La membrana puede ser de nitrocelulosa o nylon, esta luego se corta en tiras y se incuban con la muestra del paciente.

Si los anticuerpos específicos estuviesen presentes, los mismos son revelados con un anticuerpo secundario conjugado a una enzima a la que se le añade un sustrato y un cromógeno que da lugar a un producto insoluble (precipita en el sitio de reacción).

Esta técnica se utiliza para confirmar que los anticuerpos detectados previamente por alguna otra prueba serológica, combinando la capacidad de resolución de las proteínas en un gel (electroforesis), con la especificidad de esta proteína con su anticuerpo (reacción antígeno-anticuerpo). Es por esto que resulta de una técnica altamente sensible, ya que detecta cantidades muy pequeñas de anticuerpos y permite identificar los antígenos que están siendo reconocidos.

En el Western Blot para *T. pallidum*, los antígenos pueden reaccionar con IgG, IgM o IgA presentes en el suero de pacientes con sífilis, la IgG reacciona fuertemente con una proteína de membrana de 47 Kd., pero es menos sensible y específica que la prueba de FTA-ABS. En cambio, cuando la prueba detecta IgM, es de gran utilidad en el diagnóstico de la sífilis secundaria y congénita, con una sensibilidad del 83%. Esto se reduce cuando el Western blot detecta IgA, donde la sensibilidad disminuye al 67%^{2,50-53.20}

En la práctica, la detección de anticuerpos frente a los antígenos de treponema correspondiente a masas moleculares de 15, 17, 44,5 y 47 kDa se consideran positivos. Según estudios realizados, se determinó que el antígeno más sensible y específico para detectar sífilis mediante este ensayo es la proteína treponémica 17; aunque otros autores destacan que la combinación de el antígeno 15, 17, 45 y 47 da resultados más sensibles y específicos

5

En la figura 5 se esquematiza la reacción que ocurre en la membrana. La proteína de interés en este caso fueron las proteínas treponémicas 15, 17 y 47.

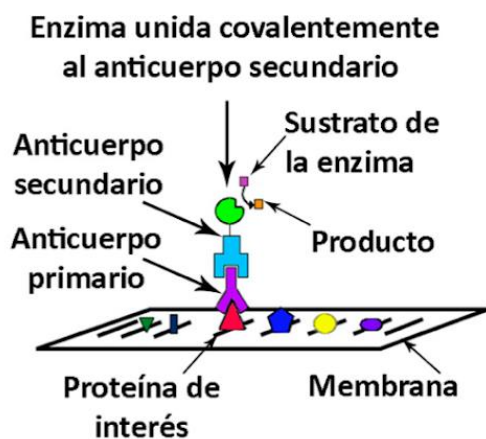


Figura 5: esquema de un Western Blot ³¹

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Diseñar y poner a punto un sistema de diagnóstico inmunológico alternativo para la detección de pacientes de Sífilis utilizando un Test ELISA que detecte anticuerpos de clase M y G de forma independiente para tres proteínas treponémicas.

2.2. Objetivos específicos

1. Diseñar inmunoensayos enzimáticos de tipo sándwich (ELISAs), capaces de detectar, separadamente, inmunoglobulinas de clase M y G específicas, para 3 proteínas de valor diagnóstico para Sífilis.
2. Poner a punto las condiciones de los ELISAs.
3. Analizar la presencia de anticuerpos IgM e IgG contra las proteínas de valor diagnóstico para Sífilis, en muestras de suero humanos previamente clasificadas como reactivas y no reactivas mediante el test no-treponémico RPR.
4. Comparar la reactividad observada mediante la prueba de RPR y los resultados obtenidos para cada antígeno y clase de anticuerpo, por las pruebas de ELISA puestas a punto.

3. Materiales y métodos

Todos los reactivos, insumos y equipos utilizados durante este trabajo fueron brindados por el laboratorio de Biotecnología del Instituto Polo Tecnológico de Pando.

3.1. Buffer de sensibilización

Se trabajo con tres proteínas treponémicas de alto valor diagnostico, Tpp47, Tpp17 y Tpp15, estas proteínas fueron aportadas por el Instituto Pasteur, en donde fueron expresadas en *E.Coli* y purificadas por cromatografía en columna de níquel.

Las tres proteínas se encontraban en buffer Tris 20mM pH 8, y 50% de glicerol. La concentración inicial de Tpp47 es de 2mg/mL, la concentración inicial de Tpp17 1,74mg/mL y la de concentración inicial de Tpp15 de 14 mg/mL.

A partir de la construcción de las proteínas treponémicas Tpp47, Tpp17 y Tpp15 se determinó el punto isoelectrico (pI) teórico con el portal bioinformático ExPASy.

Con estos valores se eligió un buffer con un pH cercano al punto isoelectrico de la proteína.

Para la proteína 47 el buffer que se utilizó fue ácido acético-acetato 0,1 M pH 5,5; para la proteína 17 el buffer fue carbonato-bicarbonato 20mM pH 9,5 y para la proteína 15 se utilizó el buffer bifosfato-fosfato de sodio 20mM pH 6,5.

Las placas utilizadas fueron sensibilizadas con la proteína (100 µL/pocillo) e incubadas en heladera overnight. Luego lavadas con PBS 1X, Tween 20 0,05%.

3.2. Bloqueo

Una vez sensibilizada la placa de ELISA, se procede a bloquear los sitios libres no ocupados con 250 µL/pocillo de solución de bloqueo (PBS conteniendo BSA 1%).

Se incuba la placa una hora a 37°C y se procede a lavar con una solución PBS conteniendo Tween 20 0,05% (PBS-T).

3.3. Muestra

Las 96 muestras utilizadas corresponden a sueros de pacientes de el Hospital de Pando y del Hospital Maciel, se utilizaron sueros diluidos 1/200 en solución de PBS-T conteniendo BSA 0,1% (PBS-T-BSA). Se incubaron 100 µL/pocillo de cada muestra en replicados, durante 1 hora a 37°C.

El análisis de las muestras es único y para cada muestra se contaba con el resultado de el ensayo de RPR. No se tenía información acerca de la historia clínica del paciente.

3.4. Conjugado

Se utilizó anticuerpos anti IgG conjugado a peroxidasa de rábano (anti human IgG (γ -chain specific) peroxidase conjugate, SIGMA™, A6029) y anticuerpo anti IgM conjugado a peroxidasa de rábano. (anti human IgM (μ -chain specific, peroxidase conjugate, SIGMA™, A-6907).

Los anticuerpos conjugados anti-IgG humana se utilizaron a una dilución 1/5000 y los anticuerpos conjugados anti-IgM humana se utilizaron a una dilución 1/3000; el diluyente utilizado en ambos fue PBS-T-BSA.

3.5. Sustrato

Como sustrato para la enzima peroxidasa se utilizaron los sustratos TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)³² y OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride)³² con buffer citrato fosfato salino pH 5,0 y peróxido de hidrógeno. El cambio de sustrato fue a causa de el mal funcionamiento del TMB luego de algunas semanas de ensayo, se cree que por su inestabilidad se produjo este inconveniente.

El desarrollo de color, producto de la transformación del sustrato por la enzima presente en el anticuerpo secundario marcado, es proporcional a la cantidad de anticuerpo específico. De esta forma se pueden discriminar entre los distintos grupos de muestras.

3.6. ELISA

Para la evaluación de la presencia de anticuerpos contra las proteínas treponémicas 15, 17 y 45 se puso a punto un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en formato indirecto, en el cual se sensibilizó los pocillos de placas de 96-pocillos Microtiter (Thermo Scientific™) con los antígenos de interés en forma separada, ofreciendo los sueros humanos como fuente de anticuerpo primario y empleando un anticuerpo secundario de humanos anti IgG conjugado a peroxidasa de rábano y un anticuerpo anti IgM conjugado a peroxidasa de rábano.

Para la puesta a punto del ensayo de ELISA, se realizó un checkerboard, en el que se probaron diferentes concentraciones de antígeno inmovilizado: 10, 5, 2,5 y 1,25 $\mu\text{g/mL}$ para Tpp 15, 17 y 45 y una dilución 1/5000 del anticuerpo secundario.

Una vez optimizadas las condiciones del ELISA, se evaluó la respuesta de anticuerpos mediante la titulación de los sueros extraídos de pacientes. Se utilizó los valores de absorbancia a 450 nm cuando se utilizó el sustrato TMB y absorbancia a 492 nm para el sustrato OPD.

El equipo utilizado para medir la absorbancia fue Multiskan EX Thermo Labsystems. En todas las placas, se incluyó un control positivo y un control negativo, para normalizar los valores obtenidos para las diferentes muestras.

Las muestras se analizaron por cuadruplicado y los valores de absorbancia se registraron.

La normalización de los valores de densidad óptica (D.O) se realizó mediante el cálculo siguiente: $(D.O_{\text{promedio muestra}} - D.O_{\text{promedio control negativo}}) / (D.O_{\text{promedio control positivo}} - D.O_{\text{promedio control negativo}})$.

3.7. Clasificación de las muestras

Los resultados se analizaron con el software Microsoft Excel 2020.

Los datos normalizados obtenidos por los test ELISAs se contrastaron con los datos de la prueba RPR, obtenido por el Hospital Maciel y el Hospital de Pando.

Con esta información se asignó un valor de corte por encima del cual se detecta presencia de anticuerpos en los sueros analizados.

3.8. Western Blot

Algunas de las muestras fueron analizadas por Western Blot como prueba confirmatoria a muestras discordantes. Para ello se separaron las proteínas treponémicas 15, 17 y 47 en un gel al 15% de acrilamida, como marcador de peso molecular se utilizó LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis 17-0446-01 de GE Healthcare. El gel se corrió a 25mA, voltaje constante.

Se transfirió a membrana de nitrocelulosa (Hybond-C Extra, GE Healthcare) utilizando la unidad de transferencia Semi-Phor de Hoefer Scientific Instruments 30 minutos a 6V y 30 minutos a 8V, la transferencia se realizó en equipo semihumedo. La membrana se tiñó con FastGreen para observar la aparición de las tres proteínas, luego se lavo para desteñir y se procedió a bloquear los sitios libres con una solución de PBS conteniendo BSA 1%.

La membrana se cortó en tiras, en ella se incubaron 13 muestras, incluyendo controles positivos y negativos. Se seleccionaron algunas de las muestras en el cual el resultado del RPR y de ELISA no eran consistentes. El marcador de peso molecular se resolvió utilizando tinta China Rotring.

Se utilizaron anticuerpos anti-IgG conjugado a peroxidasa de rábano (anti human IgG (γ -chain specific) peroxidase conjugate, SIGMA™, A6029) y anticuerpo anti-IgM conjugado a peroxidasa de rábano. (anti human IgM (μ -chain specific, peroxidase conjugate, SIGMA™, A-6907); ambos diluidos 1/3000 en PBS-T-BSA. Los anticuerpos secundarios se utilizaron en dilución 1/3000 y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

El sustrato utilizado para la enzima peroxidasa fue 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) y peróxido de hidrogeno, en buffer fosfato pH 7.5 conteniendo NiCl₃.³²

4. Resultados y discusión

4.1. Sensibilización

Se determinaron las condiciones óptimas de sensibilización de la placa de ELISA de las proteínas treponémicas (Tpp) 15, 17 y 47. Se seleccionó el buffer y la concentración de la proteína óptima.

Los posibles buffers se seleccionaron en función de su punto isoeléctrico.

A partir de la construcción de las proteínas treponémicas (Anexo 1) se utilizó el portal bioinformático ExPASy ²⁶ para calcular el punto isoeléctrico de cada proteína. (Figura 6, 7 y 8).

Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

```

      10      20      30      40      50      60
GSSHHETHYG YATLSYADYW AGELGQSRDV LLAGNAEADR AGDLLDAGMFD AVSRATHGHG

      70      80      90     100     110     120
AFRQQFQYAV EVKGEKVLK QETEDSRGRK KWEYETDPSV TKMVRASASF QDLGEDGEIK

     130     140     150     160     170     180
FEAVEGAVAL ADRASSFMVD SEEYKITNVK VHGMKFVPVA VPHELKGIK EKHFHVEDSR

     190     200     210     220     230     240
VTENTNGLKT MLTEDSFSAR KVSSMESPHD LVVDTVGTGY HSRFGSDAEA SVMLKRADGS

     250     260     270     280     290     300
ELSHREFIDY VMNFNTVRYD YYGDDASYTN LMASYGTKHS ADSWWKTGRV PRISCGINYG

     310     320     330     340     350     360
FDRFKGSGPG YYRLTLIANG YRDVVADVRF LPKYEGNIDI GLKGKVLTIK GDAETLMDA

     370     380     390     400     410     420
AVDVFADGQP KLVSDQAVSL GQNVLSADFT PGTEYTVQVR FKEFGSVRAK VVAQHSHHHH
```

Theoretical pI/Mw: 5.64 / 46443.54

Figura 6: Punto isoeléctrico de la proteína treponémica 47

Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

```
    10      20      30      40      50      60
VSCTTVCPHA GKAKAEKVEC ALKGGIFRGT LPAADCPGID TTVTFNADGT AOKVELALEK

    70      80      90      100     110     120
KSAPSPITYR GTWMVREDGI VELSLVSSEQ SKAPHEKLYE LIDSNSVRYM GAPGAGKPSK

    130
EMAPFYVLKK TKKHHHHHH
```

Theoretical pI/Mw: 8.88 / 15054.27

Figura 7: Punto isoelectrico de la proteína treponémica 17

Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

```
    10      20      30      40      50      60
SFSSIPNGTY RATYQDFDEN GWKDFLEVTF DGGKMQVVY DYQHKGRFK SQDADYHRVM

    70      80      90      100     110     120
YASSGIGPEK AFRELADALL EKNPEMVDV VTGATVSSQS FRRLGAALLQ SARRGEKEAI

ISRHHHHHH
```

Theoretical pI/Mw: 6.43 / 14617.19

Figura 8: Punto isoelectrico de la proteína treponémica 15

Con estos datos, se trabajó con buffer ácido acético-acetato 0,1 M pH 5,5 para la proteína 47; buffer carbonato-bicarbonato de sodio 20mM pH 9,5 para la proteína 17 y buffer fosfato-bifosfato de sodio 20mM pH 6,5 para la proteína 15.

Luego se determinaron las concentraciones óptimas para sensibilizar dichas proteínas realizando diluciones seriadas de la misma y trabajando con muestras positivas y negativas, ambos controles en una dilución 1/200; se seleccionó la concentración que permita discriminar mejor muestras positivas y negativas.

Para las tres proteínas la concentración óptima es de 10µg/mL. (Figura 7, 8 y 9) A la concentración de 10µg/mL para las tres proteínas treponémicas se observa que la absorbancia para la muestra positiva y la muestra negativa se separan con más énfasis, permitiendo la discriminación entre muestras negativas y positivas de una forma óptima.

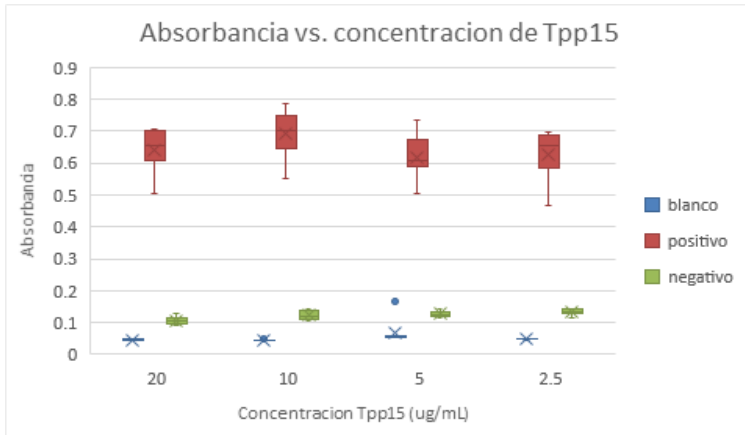


Figura 9: Absorbancia en función de la concentración de Tpp 15

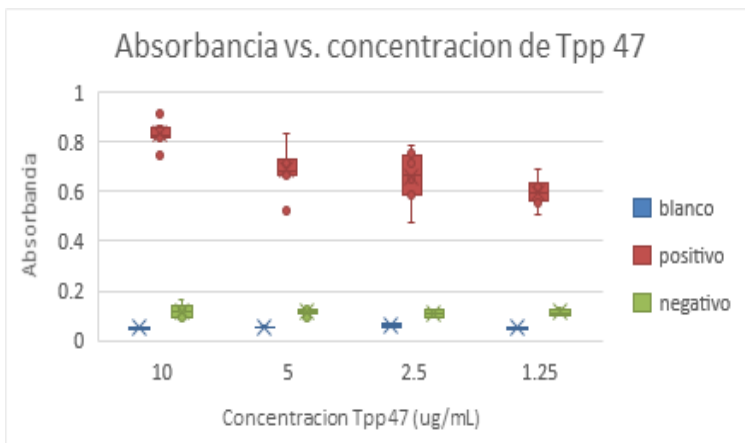


Figura 10: Absorbancia en función de la concentración de Tpp 47

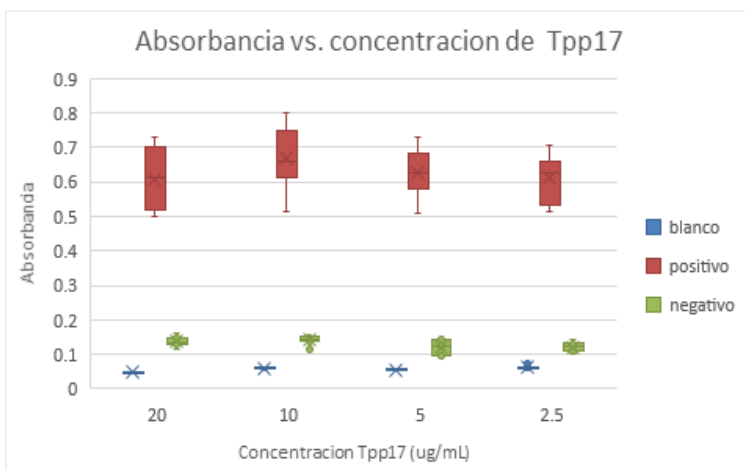


Figura 11: Absorbancia en función de la concentración de Tpp 17

Se analizaron algunas muestras en distintas concentraciones para determinar como proceder a trabajar con las muestras.

La concentración para analizar las muestras se determinó en base a la que presentaba menor desvío estándar entre las réplicas analizadas, de esta manera las muestras se analizaron en una dilución 1/200 en una solución de PBS 1X, BSA 0,1%, Tween 0,05%.

4.2. Muestras para controles

Con estos resultados se comenzó a analizar múltiples muestras para utilizar como controles positivos y negativos para el inmunoensayo, de acuerdo a los valores de absorbancia que presentaban.

De este modo se asignó un control negativo, único para todas las proteínas inmovilizadas en la placa y los controles positivos dependen de la proteína treponémica utilizada. Para cada proteína treponémica contra una clase de anticuerpos se selecciono una muestra que presentaba un alto titulo de anticuerpos como control positivo, y una muestra que no tenia un titulo de anticuerpos detectable como control negativo.

Los controles positivos y negativos se analizaron a distintas concentraciones para cada proteína para utilizar en los ensayos con las distintas muestras; se probaron los controles positivos a diluciones 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 y los controles negativos a concentraciones 1/100 y 1/200.

Para los controles positivos se eligió la concentración en base a el valor de absorbancia, para ello se graficó la absorbancia promedio en función de la concentración utilizada para el control.

Para la proteína Tpp17 se seleccionó la dilución de 1/100 para IgM (Figura 12) ya que no se llega a observar la saturación de absorbancia.

Para el control positivo de la proteína treponémica 17 para IgG (Figura 13), se utilizó la dilución de 1/800 ya que ahí se observa que se satura, por lo que a mayor dilución no aumenta significativamente la absorbancia.

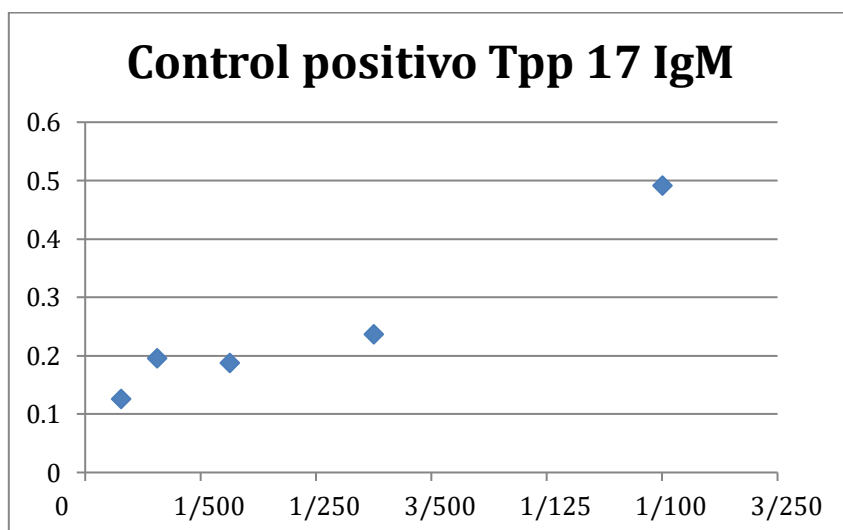


Figura 12: Diluciones de control positivo para IgM de Tpp 17

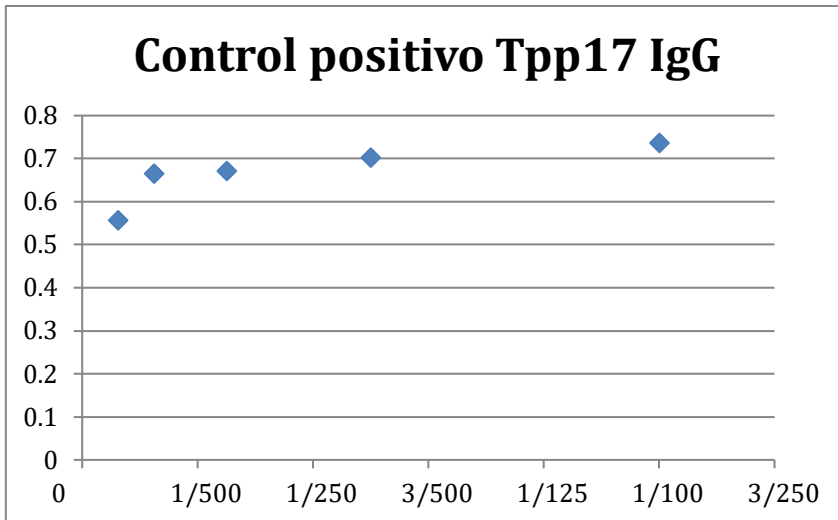


Figura 13: Diluciones de control positivo para IgG de Tpp 17

Para la proteína 47 las concentraciones utilizadas para tanto para IgM como IgG en una dilución 1/100 ya que en las gráficas (Figura 14 y 15) no se observa una saturación en la absorbancia obtenida, por esto se utiliza la muestra en la disolución mas concentrada analizada.

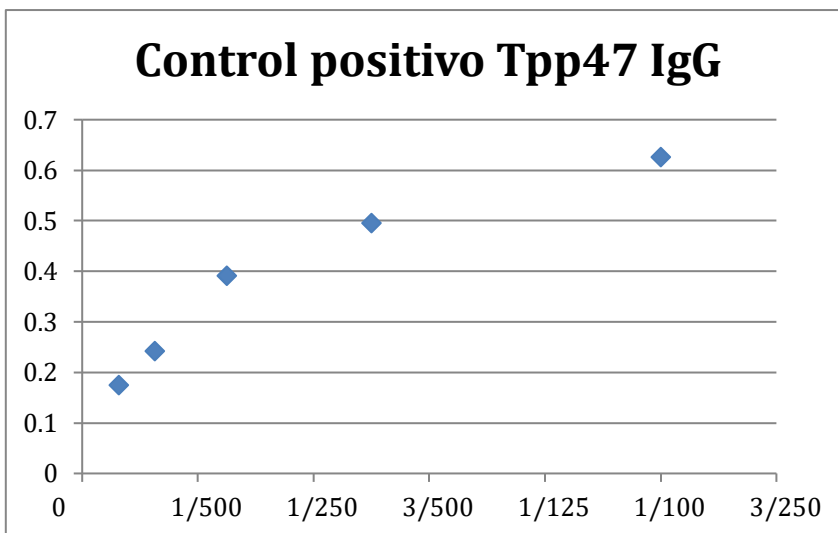


Figura 14: Diluciones de control positivo para IgG de Tpp 47

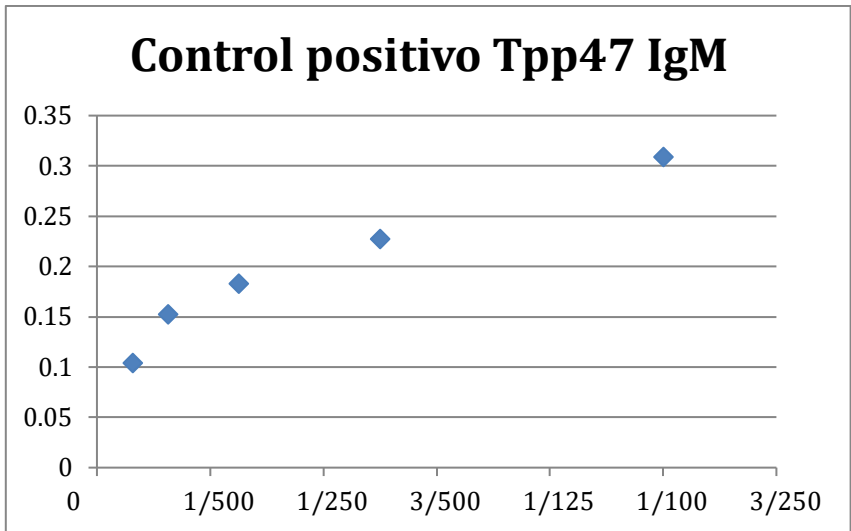


Figura 15: Diluciones de control positivo para IgM de Tpp 47

Para la proteína treponémica 15, para el análisis de IgG se utilizó una dilución 1/200 ya que a partir de esa dilución se comienza a observar la saturación, por lo que, al aumentar la concentración, la absorbancia no varía (Figura 16). Por último, para el control positivo de Tpp15 para IgM se utilizó una concentración de 1/100 debido que no se llega a observar la saturación en la absorbancia obtenida (Figura 17).

Vale aclarar para todos los casos que la absorbancia se relaciona directamente con la concentración de inmunoglobulinas presentes en la muestra.

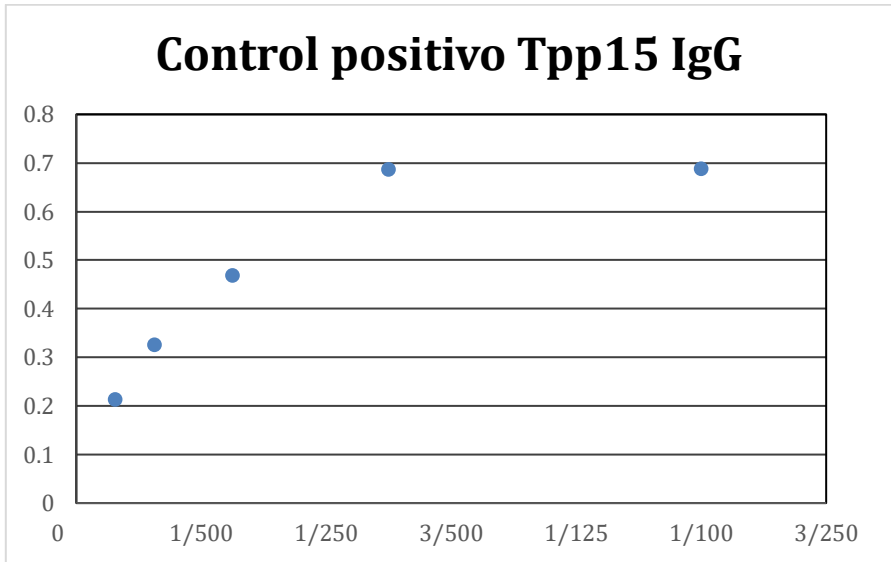


Figura 16: Diluciones de control positivo para IgG de Tpp 15

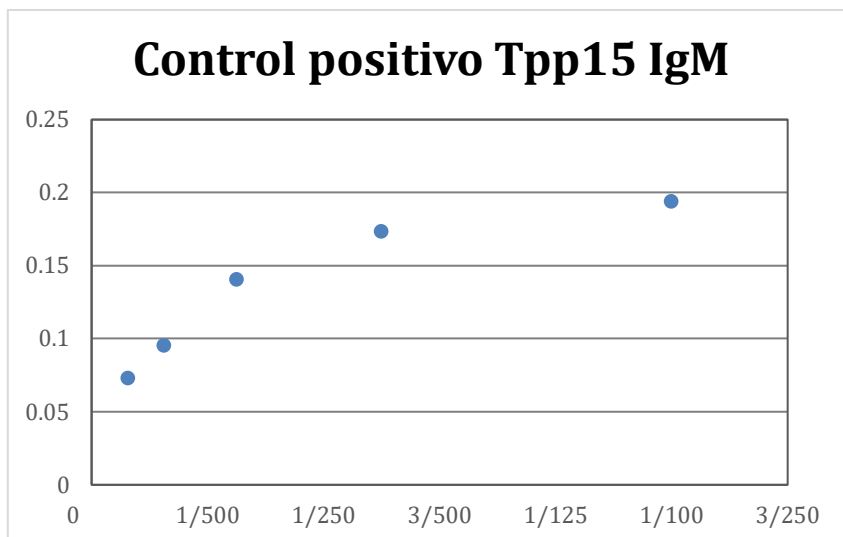


Figura 17: Diluciones de control positivo para IgM de Tpp 15

El control negativo para todos los ensayos fue utilizado en una dilución 1/200, al igual que los sueros analizados.

4.3. Análisis de muestras

Las 96 muestras fueron analizadas por ELISA indirecto con los controles determinados para cada una de las proteínas treponémicas y contra anticuerpos de clase M y G de forma independiente. Los valores de absorbancia obtenidos se los promedió, se le resto el promedio de absorbancia de el control negativo y para normalizar, ese valor se lo dividió entre la diferencia entre el control positivo y negativo. Con estos valores se trabajo para cada muestra. En el anexo 3 se ejemplifican los cálculos de normalización realizados para las muestras, tomando una placa de ELISA como ejemplo.

En las figuras 18, 19 y 20 se observan los valores obtenidos para las muestras de suero analizadas y se comparan con los datos que de RPR aportados por el Hospital de Pando y Hospital Maciel.

Para cada clase de inmunoglobulina se determinó un valor por encima del cual se detectan anticuerpos. Para establecer este valor se promedió el valor de las muestras con RPR negativo y se le sumo 3 desvíos estándares, además se promedió los valores de ELISA para las muestras RPR positivas y se le resto un desvío estándar. ³³ Para realizar estos cálculos se asumió que las muestras tenían una distribución normal. El valor de corte para IgG con este método coincidió, no así para IgM. Los cálculos realizados para definir los valores de corte se detallan en el Anexo 4.

Las muestras que presentan valores de RPR reactivo (puntos rojos) se podrían considerar positivas para la enfermedad, ya que a priori se utilizó esta técnica para discriminar muestras positivas de negativas.

Las muestras con RPR no reactivo que únicamente presentan un alto título de IgG podría tratarse de una infección tardía, en el cual el título de anticuerpos de clase IgM es casi nulo.

Las muestras con resultado de RPR no reactivo, con niveles de inmunoglobulinas detectables de clase M, son difíciles de explicar ya que al inicio de la infección es raro observar efecto prozona. Estas muestras requieren un análisis mas exhaustivo, aunque en la mayoría de los casos estas se encuentran con valores cercanos al valor limite por lo que es probable que se trate de problemas leves con el valor de corte calculado.

Las muestras con RPR reactivo que no detectan IgM se puede deber a que el formato de ELISA utilizado no es el indicado para detectar IgM, ya que al haber un alto título de IgG estas compiten interfiriendo en los resultados. Para solucionar este inconveniente se podría haber utilizado un ELISA de captura de IgM y luego con un antígeno marcado revelar la presencia de anticuerpos.

Las muestras que presentan RPR reactivo y presentan únicamente anticuerpos de clase IgM podrían ser muestras que se encuentran en una fase temprana de la enfermedad , ya que al comienzo de la misma prevalecen los anticuerpos de clase M. 6

Las muestras RPR positivas que no presentan un titulo de anticuerpos considerable, según el valor de corte seleccionado, se deben analizar para las tres proteínas en simultaneo, ya que puede no ser reactiva para una proteína, pero si para el resto. Analizando contra las tres proteínas en simultaneo se observa una única muestra que es reactiva a RPR sin un titulo de anticuerpos detectable (anexo 4) que podría tratarse de un falso positivo para RPR o un falso negativo para ELISA.

Las proteínas treponémicas que parecerían presentar mayor valor diagnostico son la 17 (Figura 18) y la 47 (Figura 19) ya que tiene una mínima cantidad de muestras mal clasificadas. Según bibliografía la proteína con mayor valor diagnostico es la 47. 6 Tpp 47 originariamente es una lipoproteína, la perdida de su porción lipídica en su versión recombinante parece no disminuir reactividad frente a anticuerpos.

Para la proteína 15, es bastante difícil la clasificación, probablemente porque la muestra utilizada como control positivo para el ELISA no presentaba un titulo de anticuerpos de reactividad similar a los sueros utilizados para las proteínas treponémicas 17 y 47.

Los puntos de corte utilizados para comparar los valores obtenidos se seleccionaron teniendo en cuenta el conjunto de muestras no reactivas a RPR exceptuando dos sueros que si presentaban reactividad franca por ELISA y por WB; este valor se contrasto con lo que se espera en una respuesta inmunológica contra el tipo de antígeno y la clase de los anticuerpos obteniéndose resultados coherentes en la mayoría de los casos.

Si se hubiera utilizado el algoritmo tradicional para el análisis de muestras, asumiendo que la prueba RPR fuera la prueba no treponémica utilizada, un 31% de los sueros analizados que presentan títulos detectables de anticuerpos en el análisis por ELISA, hubieran quedado clasificados como sueros poco probables a la enfermedad. Para estos casos se necesitaría contar con una prueba validada para el diagnostico correcto.

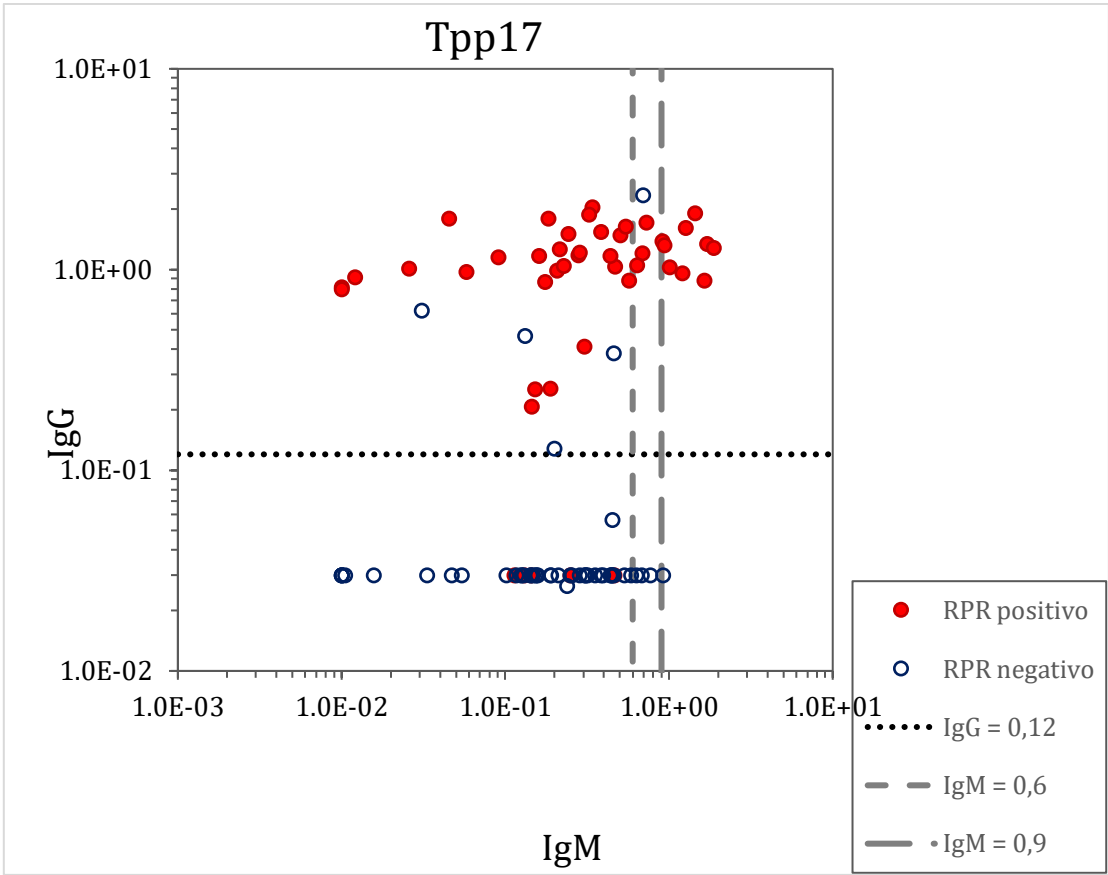


Figura 18: Muestras analizadas para Tpp 17 para detectar IgM e IgG

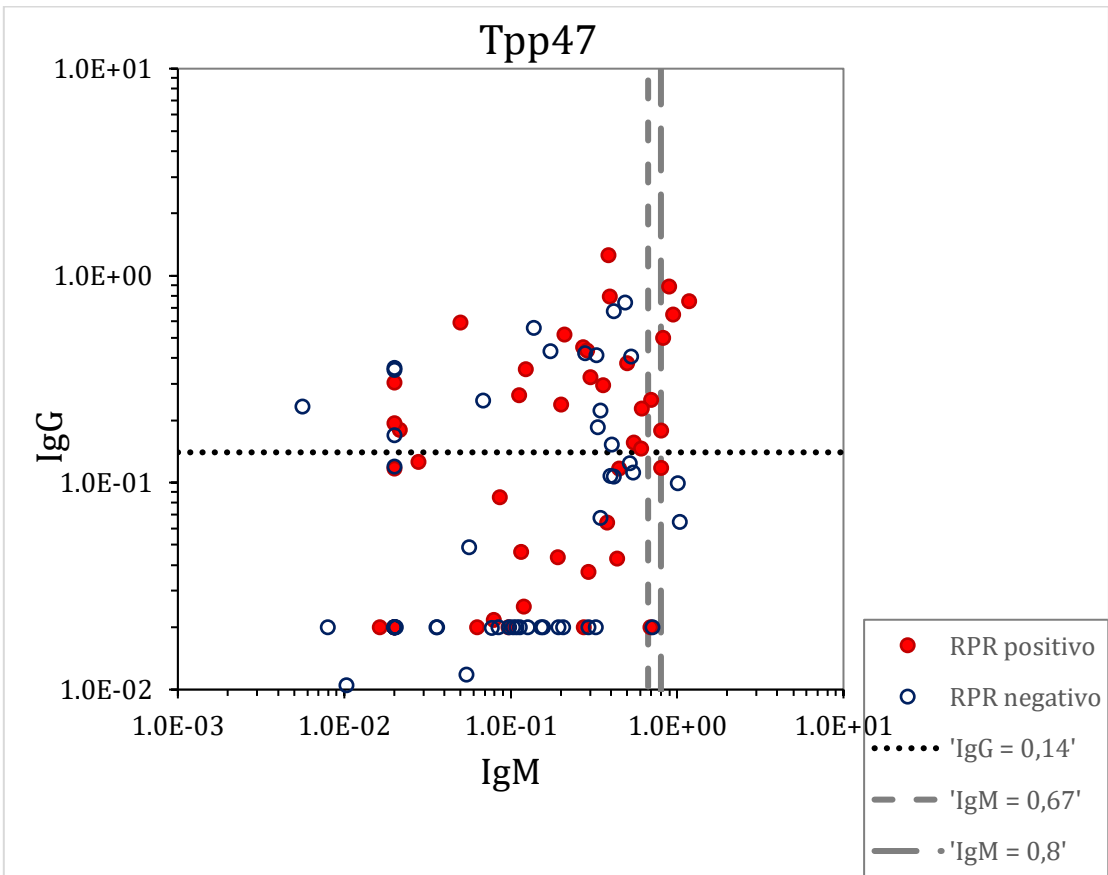


Figura 19: Muestras analizadas para Tpp 47 para detectar IgM e IgG

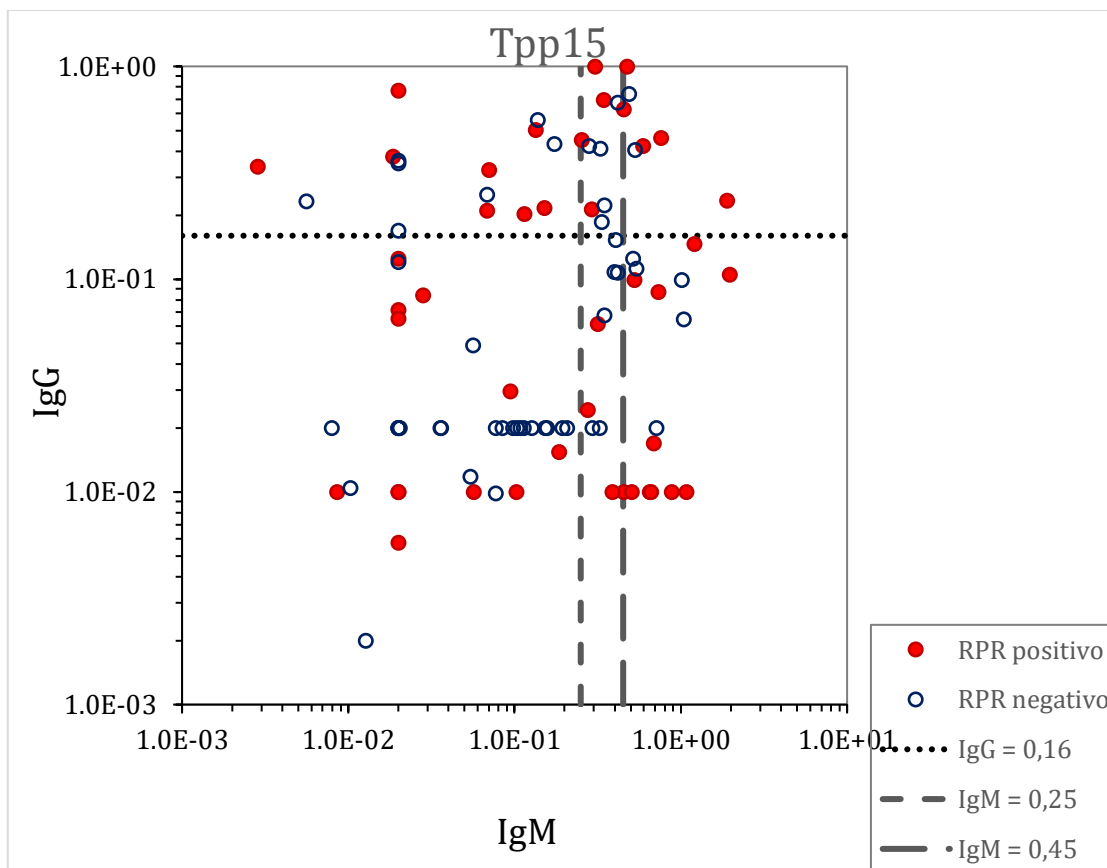


Figura 20: Muestras analizadas para Tpp 15 para detectar IgM e IgG

De los 96 sueros analizados, 22 resultaron negativas al ELISA, tanto para IgM como para IgG con los valores de corte seleccionados y 74 resultaron positivos a ELISA, con el punto de corte elegido.

En la tabla 1 se compara los datos de RPR con los obtenidos en el test ELISA.

Tabla 1: Distribución de las muestras analizadas

		Positivas IgM	Positivas IgG	Positivas IgM e IgG
RPR + / ELISA +	44	2	22	20
RPR + / ELISA -	1			
RPR - / ELISA +	30	10	15	5
RPR - / ELISA -	21			

El porcentaje de muestras que presentaron RPR positivo y valores de ELISA inferiores a el valor de corte para las tres proteínas treponémicas y para ambas clases de inmunoglobulinas fue de un 1%. En estos casos se podría tratar de una posible reacción inespecífica de RPR o de alguna otra patología que presente reacción cruzada.

Y un 31% de las muestras presentaban RPR negativo y ELISA positivo. En estos casos se podría tratar de un efecto prozona en el análisis por RPR, una infección pasada en el

cual el título de anticuerpos no sea detectable o de algún problema con el valor de corte seleccionado para el ELISA que deje falsos positivos.

Las muestras que presentan RPR negativo y ELISA positivo únicamente para IgM son difíciles de explicar, porque al comienzo de la infección es poco probable que exista un efecto prozona, aunque según bibliografía es más probable encontrar falsos positivos para IgM.³⁴

En las figuras 21, 22 y 23 se pueden ver graficados los valores para las distintas muestras y como se distribuyen.

Se puede observar que tienen una distribución muy variable, donde hay muestras que tienen una alta posibilidad de ser positivas, por tener valores de ELISA altos, otras muestras que seguramente sean negativas por tener valores cercanos a 0 y muestras intermedias, que son más difíciles de clasificar.

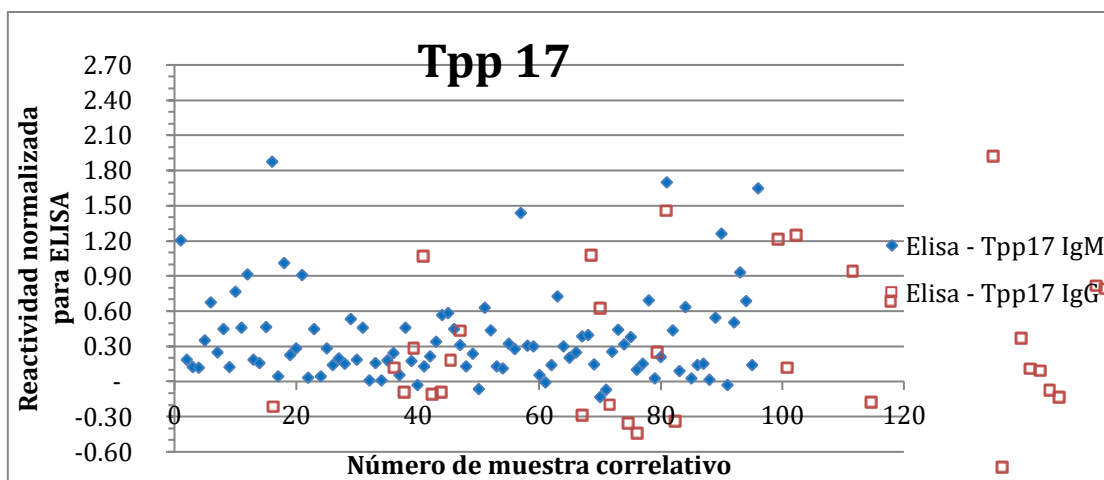


Figura 21: Reactividad normalizada por ELISA para Tpp 17 para los distintos sueros

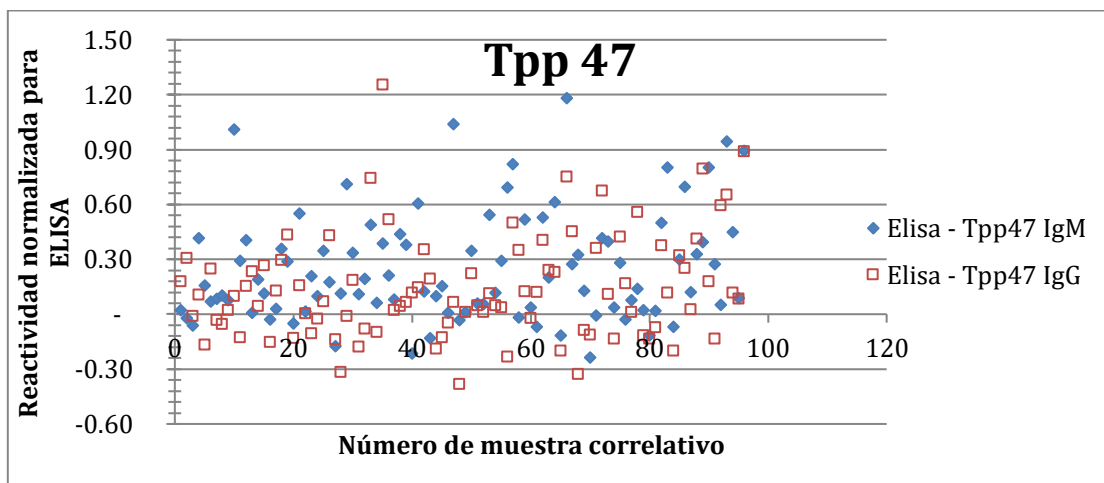


Figura 22: Reactividad normalizada por ELISA Tpp 47 para los distintos sueros

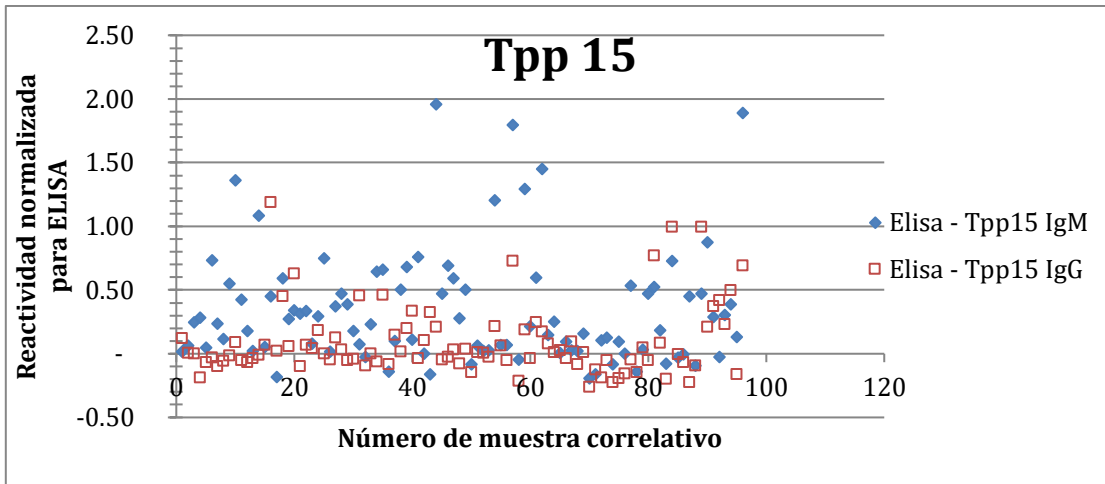


Figura 23 Reactividad normalizada por ELISA Tpp 15 para los distintos sueros

Se comparó la reactividad de las tres proteínas para IgG dado que para esta clase de anticuerpo el formato de ELISA utilizado resulta mas preciso. Esto se puede observar en las figuras 24, 25 y 26.

En la figura 24 se observa que las muestras fueron mas reactivas contra la proteína treponémica 17 frente a IgG, en comparación con la Tpp 15.

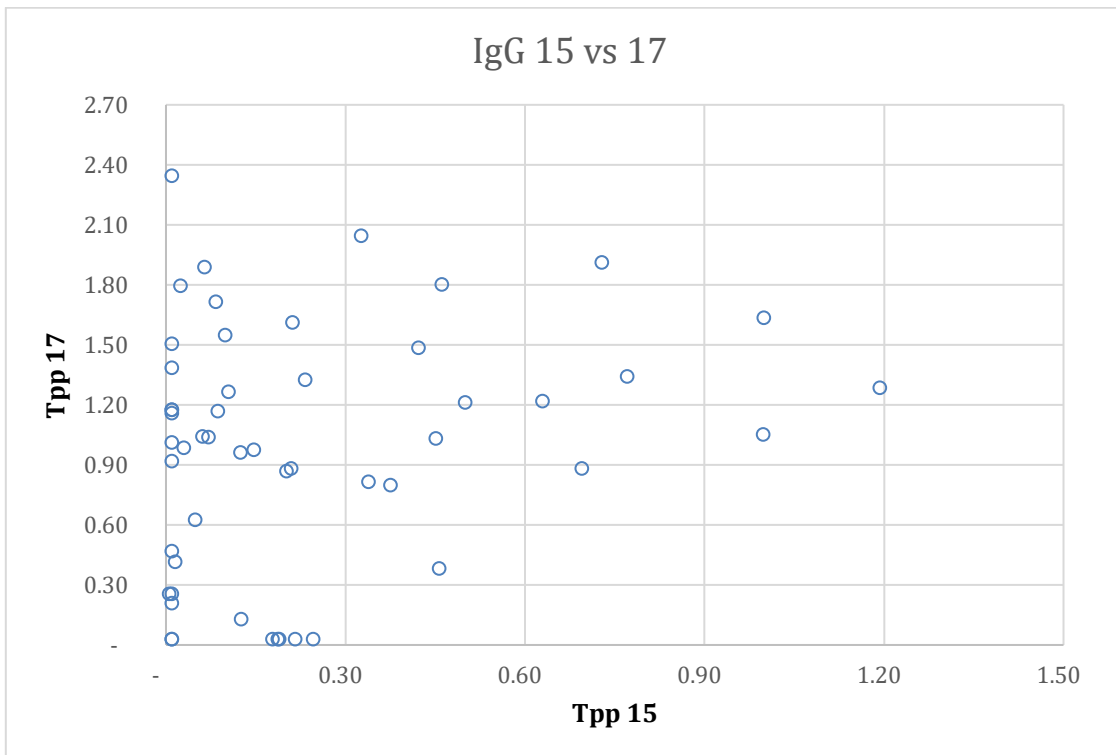


Figura 24: Comparación de muestras frente a IgG para Tpp 15 y 17

En la figura 25 se observa que las muestras fueron mas reactivas para IgG para la proteína treponémica 47 contra la proteína 15.

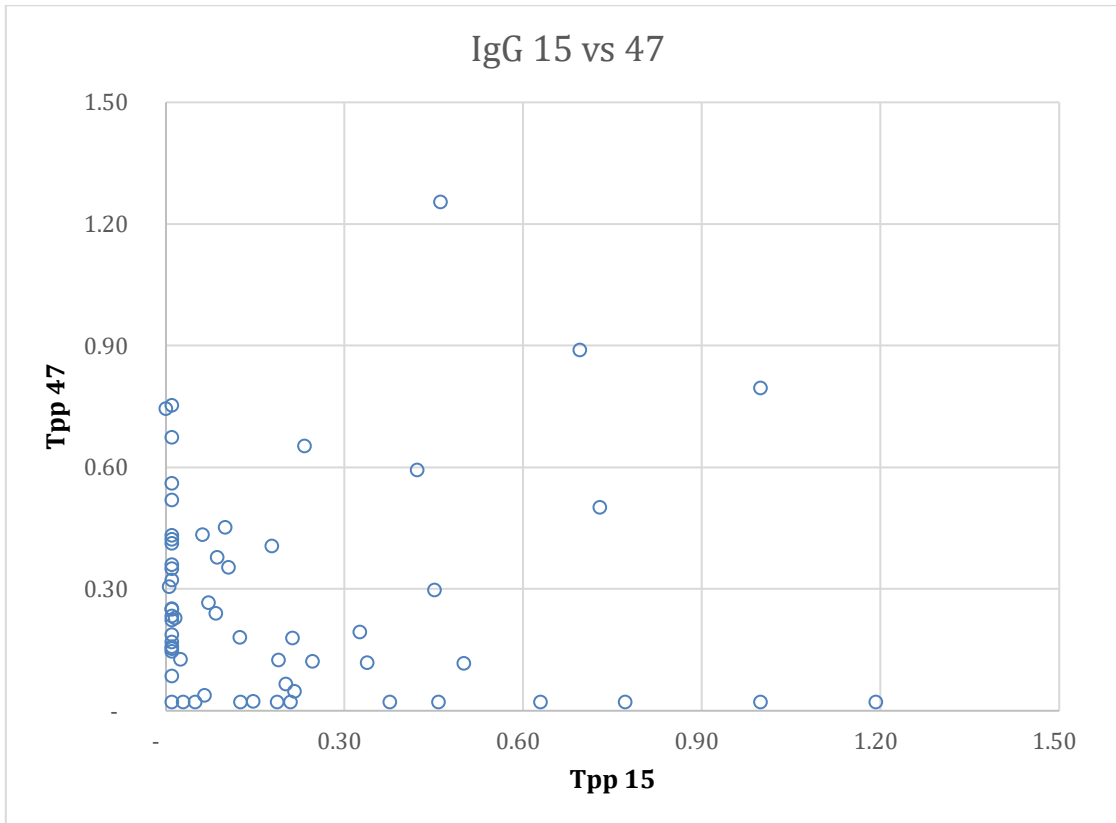


Figura 25: Comparación de muestras frente a IgG para Tpp 15 y 47

En la figura 26 se observa que las muestras fueron mas reactivas contra la proteína treponémica 47, frente a IgG, que para Tpp 17.

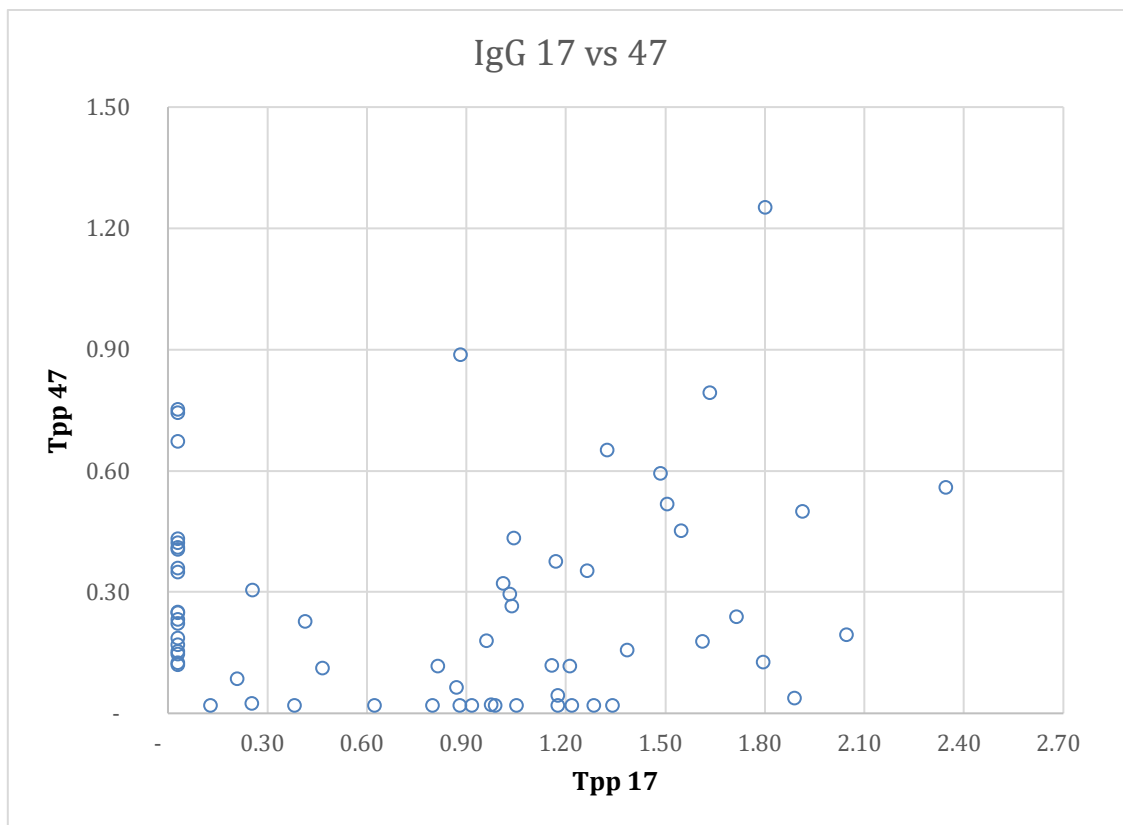


Figura 26: Comparación de muestras frente a IgG para Tpp 17 y 47

Con estas tres figuras (24, 25 y 26) se puede decir que la reactividad frente a IgG fue mayor para la proteína treponémica 47, esto se confirma con la figura 18.

De los tres gráficos se puede ver que entre las proteínas 17 y 47 hay mayor cantidad de muestras que se encuentran por encima del punto de corte para ambas proteínas en simultaneo. De las muestras que reaccionaron para IgG, 33 lo hicieron contra una única proteína treponémica, 24 lo hicieron contra 2 y 9 reaccionaron contra las tres proteínas. La proteína treponémica 15 resultó ser la menos inmunogénico, por lo que su valor diagnostico no es de mucha importancia.

Tabla 2: Resultados de ELISA para IgG con los puntos de corte seleccionados

	N° de muestra positivas para IgG
Tpp 15	4
Tpp 17	13
Tpp 47	16
Tpp 15 y Tpp 17	10
Tpp15 y Tpp 47	1
Tpp 17 y Tpp 47	13
Tpp 15, Tpp 17 y Tpp 47	9

Para las muestras que detectan IgG se realizó un esquema en donde se clasifica las muestras según su nivel de inmunoglobulinas presente. Se realizó únicamente para IgG por presentar un resultado mas robusto. Esta clasificación se realizó en base a la frecuencia con la que aparece un dato dentro del conjunto de sueros analizados.

Este esquema se observa en la Figura 27 y en el se observa que, en caso de seleccionar dos proteínas para realizar el ensayo, las de mayor importancia serían las Tpp 17 y 47. Además para los casos RPR no reactivo, únicamente en 4 muestras la reactividad de anticuerpos detectados en el test ELISA no es débil.

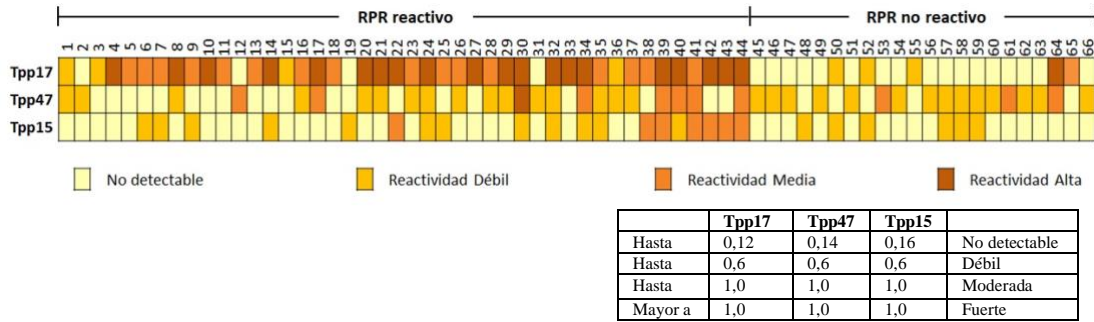


Figura 27: Esquema de reactividad por ELISA para todas aquellas muestras que se pudo detectar inmunoglobulinas de clase G para los antígenos utilizados. A los efectos de la figura las muestras se indican con números correlativos del 1 al 66.

4.4. Western Blot

Algunas de las muestras que resultaron discordantes en los resultados de RPR y los obtenidos por ELISA se analizaron por Western Blot.

En la figura 28 se muestra el gel de acrilamida con el carril correspondiente al marcador de peso molecular LMW y las tres proteínas treponémicas resueltas. Se observa en el carril de las proteínas algunos posibles agregados o contaminantes de *E.Coli.* de menor intensidad.

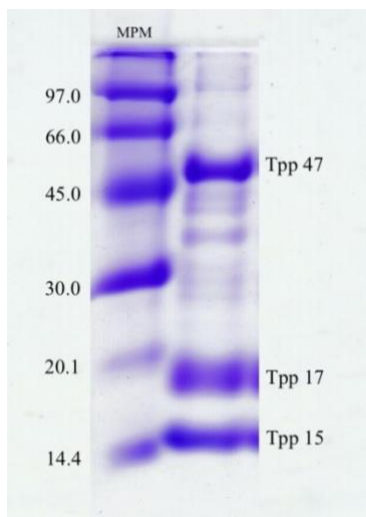


Figura 28: Gel de acrilamida con MPM LMW.

Al igual que en la separación proteica realizada en el gel de acrilamida, en la membrana del WB también se observan bandas inespecíficas que podrían ser agregados proteicos o contaminantes provenientes de el sistema de expresión de las proteínas.

En la figura 29 se muestra el resultado de Western Blot para las muestras analizadas el carril 1, 2, 3 y 4 corresponden a los controles positivo, tanto para IgG (carril 1 y 3) como para IgM (carril 2 y 4).

Los carriles 5, 6, 7 y 8 corresponden a los controles negativos para IgM e IgG.

Los carriles 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 y 25 corresponden a muestras analizadas con conjugado anti-IgG y las restantes muestras se trata de conjugado anti-IgM.

Los carriles 9, 11, 15, 19, 21 y 23 resultaron positivos para IgG y los carriles 14, 16 y 20 resultaron positivos para IgM.

La muestra que presentaba RPR positivo y valores de ELISA inferiores al valor de corte se encuentra en el carril 25 para IgG y 26 para IgM, el resultado del Western Blot es negativo por lo que se podría decir que la muestra no fue clasificada correctamente por el RPR, esto podría deberse a una reacción inespecífica contra algún otro *Treponema*. O podría ser una infección muy temprana por lo cual el titulo de inmunoglobulinas no es detectable por ELISA ni por WB.

De las muestras analizadas existen 4 que presentan RPR no reactivo, con valores de ELISA superiores al valor de corte y reactivas en Western Blot. Por lo que en estos casos se puede decir que la clasificación por RPR no fue correcta, este falso negativo sea quizás por un fenómeno de prozona. El fenómeno de prozona fue reportado principalmente en las etapas de Sífilis secundaria y de neurosífilis. ³⁵

En los casos donde la muestra es únicamente positiva para el ELISA frente a los valores corte seleccionados, se podría decir que quizás se deba a que los puntos de corte no son del todo correctos, dejando muestras sin una correcta clasificación. Al tratarse de un número arbitrario es posible que no todos los casos entren dentro de la correcta clasificación.

Para los casos en que los resultados son discordantes se debería contar con un método validado para la enfermedad y con un seguimiento del paciente. No se podría decir si en alguno de los casos se tratara de un falso positivo. Además, se debería chequear los datos de RPR provenientes del Hospital de Pando y Hospital Maciel.

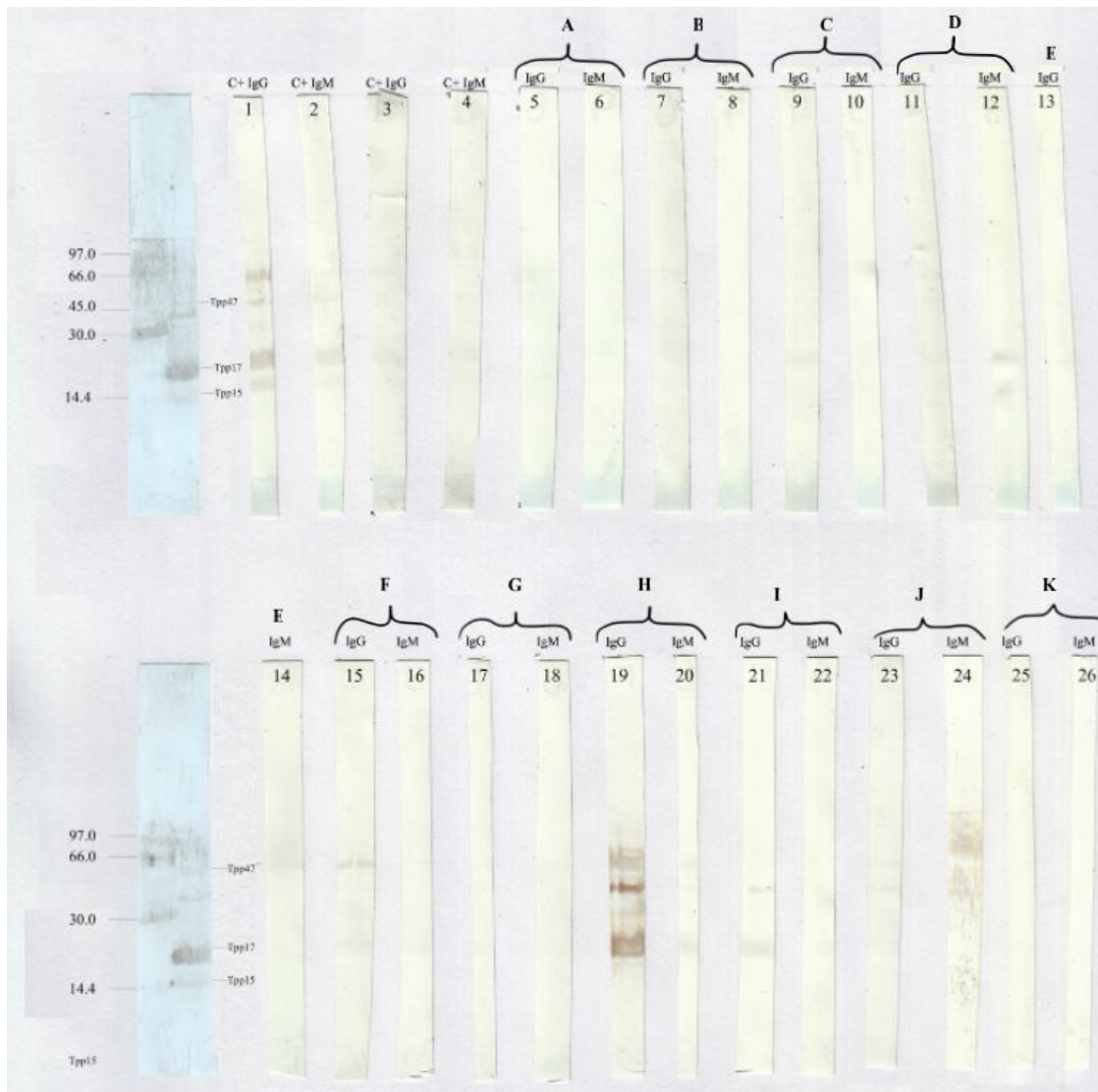


Figura 29: Resultado de Western Blot para las muestras analizadas con sus controles positivos y negativos. Tira 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 y 25 detección de IgG. Tira 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 detección de IgM.

De todas maneras, a pesar de haber resultados inconsistentes, se puede decir que la prueba ELISA diseñado presenta una alta sensibilidad diagnóstica, ya que pareciera que no deja individuos enfermos sin detectar.

Con los tres métodos se puede obtener una información más completa, aún así es necesario poder contar con un análisis más exhaustivo y con la historia clínica del paciente.

Para la detección de IgM se puede decir que el formato de ELISA utilizado no es el adecuado, se debería hacer por ELISA de captura ya que si la muestra presenta alto título de IgG esta compete haciendo más difícil la detección de IgM.

5. Conclusiones

En el presente trabajo se logró poner a punto las condiciones para un ELISA indirecto de detección de anticuerpos contra *Treponema pallidum*, a partir del cual se pudo obtener una satisfactoria discriminación entre muestras positivas y negativas a Sífilis.

Se logró detectar inmunoglobulinas principalmente para la clase IgG y para los antígenos treponémicos 15, 17 y 47. En cuanto a las inmunoglobulinas de clase M, si bien para algunas muestras se pudo clasificar, no fue así para todas las muestras. Estas dificultades se podrían resolver con un formato de ELISA que capture IgM y luego revele mediante el antígeno marcado la presencia de IgM específica.

El análisis de las muestras permitió obtener información acerca del estadio de la enfermedad en algunos casos y resolver inconcordancias en otros. Esta información resulta sumamente útil para laboratorios de análisis clínicos en donde al cambiar de un test comercial a otro los resultados no siempre coinciden, dejando incertidumbres de manejo en los técnicos.

De esta manera se evidencia la necesidad de utilizar pruebas treponémicas y pruebas no treponémicas para el diagnóstico de la enfermedad, de manera de minimizar el número de falsos positivos.

A pesar de los resultados obtenidos, contar con una prueba validada hubiera aportado para resolver los casos en que los resultados eran discordantes, ya que ninguno de los métodos utilizados está validado para el diagnóstico de la enfermedad.

La técnica de Western Blot resultó ser una prueba confirmatoria confiable, permitiendo resolver gran parte de los casos en donde el resultado de RPR y ELISA eran inconsistentes. Además de esto, los resultados obtenidos utilizando los ensayos ELISA y WB presentaron consistencia, corroborando que el funcionamiento de ambos test fue correcto.

6. Referencias bibliográficas

1. Goldman L, Schafer A. *Medicine*. 26th.ed. New York: Elsevier; 2019.
2. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Treatment C for SA. Chapter 10 - Syphilis. [Internet] Rockville (MD): Center for Substance Abuse Treatment ;1993 [citado 2020 Ene 14] Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK64729/>
3. Knierim F, Schenone H. Diagnóstico serológico de la Sífilis. *Boletín Chileno de Parasitología*. 1967; 22(1): 21–26.
4. OPS/OMS. Preguntas frecuentes sobre la sífilis. [Internet]. Washington: Oficina Regional para las Américas de la Organización Mundial de la Salud; 2017 [citado 2020 Ene 14]. Disponible desde: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14867:syphilis-frequently-asked-questions&Itemid=3670&lang=es
5. Bravo TC. Sífilis: actualidad, diagnóstico y tratamiento. *Fac Med UNAM*; 2003; 46(6): 237-240.
6. Kollmann TR, Dobson S. Syphilis. En: Remington, Klein, Wilson, Nizet, Maldonado. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn*. 7th ed. California: Saunders; 2011. p 524-563
7. Tam CS, Verstovsek S. Polycythemia Vera. En: Abutalib and M. Markman. *Cancer Consult: Expertise for Clinical Practice*. Toronto.Wiley Blackwell; 2014. p. 152–155.
8. Romo H. *La Salud del niño y del adolescente*. 3er ed. Mexico: Masson-Salva; 1995.
9. Rodríguez I. Evaluación de un ensayo inmunoenzimático recombinante como prueba confirmatoria en el diagnóstico de Sífilis. [Internet] Buenos Aires: Sociedad Iberoamérica de Información científica; 2004 [citado 2020 Feb 26]. <http://www.siicsalud.com/des/expertoimpreso.php/66068>
10. Tong ML, Lin LR, Liu LL, Zhang HL, Huang SJ, Chen YY, Guo XJ, Xi Y, Liu L, Chen FY, et al. Analysis of 3 algorithms for syphilis serodiagnosis and implications for clinical management. *Clinical Infectious Diseases*; 2014; 58(8): 1116–1124.
11. Douglas JM, Mahoney JF, Arnold RC, Sterner BL, Moore JE, Mahoney JF, Schwartz W, Stokes JH, Sternberg TH, Schwartz W. Penicillin treatment of syphilis: Clearing away the shadow on the land. *Journal of the American Medical Association*. 2009; 301(7): 769–771.
12. Henao-Martínez AF, Johnson SC. Diagnostic tests for syphilis: New tests and new algorithms. *Neurology: Clinical Practice*. 2014; 4(2): 114–122.
13. Veroli V. Expresión de antígenos recombinantes de *Treponema pallidum* para el desarrollo de test de diagnóstico de Sífilis [Internet] Montevideo: Sección Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de la República Uruguay; Agosto 2016 [citado 2020 Ene 14]. Disponible desde: www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream
14. Organización mundial de la Salud. Estrategia mundial del sector de la salud contra las infecciones de transmisión sexual 2016-2021. [Internet]. Human reproduction

- program: OMS ; Junio 2016 [citado 2020 Feb 27]. Disponible desde:
<https://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/ghss-stis/es/>
15. Zecca E. Uruguay baja casos de sífilis pero no está "exento" de la enfermedad. [Internet] Montevideo, Uruguay: 180.com.uy; Marzo 2014 [citado 2020 Ene 14]. Disponible desde: https://www.180.com.uy/articulo/38676_Uruguay-baja-casos-de-sifilis-pero-no-esta-exento-de-la-enfermedad
 16. Ministerio De Salud Publica. Informe: Sistematización de auditorias de Sifilis 2016. [Internet] Montevideo, Uruguay: Ministerio de Salud Publica; 2016 [citado 2020 Ene 19] Disponible desde: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/documentos/publicaciones/Informe%20s%C3%ADfilis%202016.pdf>
 17. Ministerio De Salud Publica. Informe auditorias de Sifilis 2018. [Internet] Montevideo, Uruguay: Ministerio de Salud Publica; Feb 2018 [citado 2020 Ene 19] Disponible desde: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/informe-auditorias-sifilis-2018>
 18. Bergerson JRE, Freeman AF. Autosomal Dominant Hyper IgE Syndrome. *Encyclopedia of Medical Immunology*. Springer New York. 2018; 32(1): 1–7.
 19. Rawstron SA, Mehta S, Bromberg K. Evaluation of a *Treponema pallidum*-Specific IgM Enzyme Immunoassay and *Treponema pallidum* Western Blot Antibody Detection in the Diagnosis of Maternal and Congenital Syphilis. *Sexually Transmitted Diseases*. 2004; 31(2): 123–126.
 20. Sanguinetti-Díaz C. Pruebas de Laboratorio. *Dermatología peruana* [Internet] 2000 [citado 2020 Ene 14]. 10(1): 30-38 Disponible desde: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v10_sup1/pruebas_lab.htm
 21. Zhamungui E, Herrera E, Landázuri C. Análisis de técnicas treponémicas y no treponémicas en el tamizaje serológico de sífilis. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* [Internet]. 2017 [citado 2020 Jan 14]; 33(3): 1- Disponible desde: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/593/523>
 22. Sato E. Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA). Medición de anticuerpos anti-grupo sanguíneo. *Journal of Japan Surgical Society*. 2006, 107 (2), 455
 23. Ho EL, Lukehart SA, Ho EL, Lukehart SA. Syphilis : using modern approaches to understand an old disease. Epub. 2011; 121(12): 4584–4592.
 24. Sambri V, Marangoni A, Eyer C, Reichhuber C, Soutschek E, Negosanti M, Antuono AD, Cevenini R. Western Immunoblotting with Five *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001; 8(3): 534–539.
 25. Contreras E, Zuluaga, Sandra Ximena Ocampo V. Sífilis: la gran simuladora. *Infectio*. 2008; 12(2): 349-356.
 26. Barón C. Método ELISA. [Internet] Madrid: Hospital del Sureste; Feb 2014 [citado 2020 Mar 3]. Disponible desde: <https://es.slideshare.net/cristinupis/elisa-copia>
 27. Cecilia Sanguinetti-Díaz A, Rodríguez-Tafur-Dávila J, Almenara EsSalud GI. Actualización en el diagnóstico de la sífilis. *Dermatología peruana*. 2004; 14: 192-199.

28. Rekom Biotech S.L. Antígeno recombinante Tpp15. [Internet] Granada: Antígenos recombinantes para IVD [citado 2020 Feb 26]. Disponible desde: <https://www.rekombiotech.com/es/antigenos/humanos/tpp15>
29. Rekom Biotech S.L. Antígeno recombinante Tpp17 - Rekom Biotech S.L. [Internet] Granada: Antígenos recombinantes para IVD [citado 2020 Feb 26]. Disponible desde: <https://www.rekombiotech.com/es/antigenos/humanos/tpp17>
30. Rekom Biotech S.L. Antígeno recombinante Tpp47 - Rekom Biotech S.L. [Internet] Granada: Antígenos recombinantes para IVD [citado 2020 Feb 26]. Disponible desde: <https://www.rekombiotech.com/es/antigenos/humanos/tpp47>
31. Elena D, Ocampo A, Ana D, Mena LA, Claudia D, González De La Rosa H, López-Vallejo López A, Cuajimalpa U. Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular II. 1er. Ed. Cuajimalpa: Universidad Autónoma Metropolitana ;2016
32. Harlow E., Lane D. Immunoassays. En: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Antibodies: A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory. 1er. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1998. p 553-612.
33. Cardona N., Lora F., Gomez J. Estandarización del inmunoensayo ELISA para la detección de IgG anti-*Toxoplasma gondii* en ratón. [Internet] Mar del Plata, Argentina: Congreso Latinoamericano de Parasitología; Ago 2005 [citado 2020 May 16] Disponible desde: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/parasitol/v60n1-2/art19.pdf>
34. Maple P, Ratcliffe D, Smit E. Characterization of Treponema pallidum Particle Agglutination Assay-Negative Sera following Screening by Treponemal Total Antibody Enzyme Immunoassays. Clinical and Vaccine Immunology. 2010; 17(11): 1718–1722.
35. Geisler W. The Prozone Phenomenon in Syphilis Testing. Southern Medical Journal. 2004; 97(4): 327–328.

7. Anexos

7.1. Construcción de proteínas treponémicas

Tap47:

GSSHHETHYGYATLSYADYWAGELGQSRDVLLAGNAEADRAGDLD
AGMFDAVSRATHGHGAFRQQFQYAVEVKGEKVLSKQETEDSRGRK
KWEYETDPSVTKMVRASASFQDLGEDGEIKFEAVEGAVALADRASS
FMVDSEYKITNVKVHGMKFPVAVPHELKGIKFKFHFVEDSRVT
ENTNGLKTMLEDTSFSARKVSSMESPHDLVVDTVGTGYHSRFGSDA
EASVMLKRADGSELHREFIDYVMNFNTVRYDYGGDDASYTNLMA
SYGTKHSADSWWKTGRVPRISCGINYGDFRFKGSFGPGYYRLTLIAN
GYRDVVADVRFLPKYEGNIDIGLKGKVLTI GGADAETLMDAAVDVF
ADGQPKLVSDQAVSLGQNVLSADFTPGTEYTVVRFKFEFGSVRAKV
VAQH HHHHHH

Tap17:

VSCCTVCPHAGKAKAEKVECALKGGIFRGTLPAADCPGIDTTVTFNA
DGTAQKVELALEKKSAPSPLTYRGTWVMVREDGIVELSLVSSEQSKAP
HEKLYELIDNSVRYMGAPGAGKPSKEMAPFYVLKKTCKHHHHHHH

Tap15:

SFSSIPNGTYRATYQDFDENGWKDFLEVTFDGGKMVQVVYDYQHK
EGRFKSQDADYHRVMYASSGIGPEKAFRELADALLEKGNPEMVDV
VTGATVSSQSFRRLGAALLQSARRGEKEAIISRHHHHHHH

7.2. RPR

Resultados RPR (dato del Hospital)

Tabla 3: Resultados de RPR para las muestras analizadas por ELISA

Muestra	RPR (U) última dilución positiva al Test
132	8
134	1
172	-
173	-
174	-
175	-
177	-

180	-
182	-
183	-
184	-
186	-
189	-
191	2
192	4
193	128
194	8
195	16
196	8
197	64
198	8
199	-
200	-
201	-
203	-
204	-
205	-
206	-
207	-
223	-
224	-
225	-
226	-
246	2

248	8
249	4
250	4
251	2
252	2
253	2
254	8
257	2
258	8
259	2
260	-
262	-
265	-
270	-
276	-
285	-
291	-
304	-
317	-
318	4
320	8
321	2
322	128
323	-
329	-
348	-
355	-

362	-
365	4
366	16
367	2
368	2
369	4
370	-
382	-
400	-
401	-
402	-
403	-
404	-
405	-
406	-
407	-
408	-
409	-
410	-
2634	4
2636	16
2637	2
2638	16
2639	4
2644	1
2645	1
2646	-

2647	16
2649	4
2650	4
2651	8
2652	16
2653	2
2655	
2659	16

7.3. Ejemplo de cálculos de normalización

					Promedio		Dif C+ - C-
C+	0,628	0,635	0,651	0,638	0,638		0,4655
C-	0,175	0,168	0,176	0,171	0,1725		
Muestra					Prom. muestra - C-	(Prom. muestra - C-)/ (Dif C+ - C-)	
132	0,607	0,62	0,612	0,642	0,44775	0,961869	
134	0,286	0,297	0,286	0,297	0,119	0,255639	
174	0,124	0,144	0,104	0,163	-0,03875	-0,08324	
180	0,142	0,136	0,137	0,126	-0,03725	-0,08002	
184	0,082	0,079	0,078	0,071	-0,095	-0,20408	
186	0,151	0,157	0,139	0,144	-0,02475	-0,05317	
189	0,091	0,087	0,101	0,09	-0,08025	-0,1724	
192	0,703	0,649	0,638	0,633	0,48325	1,038131	
195	0,63	0,669	0,678	0,634	0,48025	1,031686	
204	0,14	0,102	0,107	0,105	-0,059	-0,12675	
206	0,095	0,085	0,094	0,09	-0,0815	-0,17508	
207	0,073	0,123	0,183	0,074	-0,05925	-0,12728	
224	0,35	0,353	0,339	0,36	0,178	0,382385	
250	0,667	0,609	0,609	0,621	0,454	0,975295	
259	0,565	0,583	0,612	0,569	0,40975	0,880236	
260	0,169	0,142	0,142	0,136	-0,02525	-0,05424	
270	0,065	0,074	0,066	0,064	-0,10525	-0,2261	
304	0,155	0,124	0,136	0,131	-0,036	-0,07734	
317	0,397	0,377	0,401	0,385	0,2175	0,46724	
367	0,689	0,598	0,645	0,595	0,45925	0,986574	

370	0,092	0,085	0,088	0,088	-0,08425	-0,18099	
-----	-------	-------	-------	-------	----------	----------	--

7.4. Calculos para definir valor de corte

Muestra	Elisa - Tpp17		Elisa - Tpp47		Elisa - Tpp15		RPR
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	
134	0,19	0,26	0,02	0,30	0,06	0,01	1
2644	0,14	0,03	0,70	0,25	0,02	0,01	1
2645	0,15	0,25	0,12	0,03	0,45	0,01	1
191	0,16	1,18	0,19	0,04	1,08	0,01	2
246	0,01	0,92	0,06	0,02	0,65	0,01	2
251	0,46	0,03	0,44	0,04	0,51	0,02	2
252	0,17	0,87	0,38	0,06	0,68	0,20	2
253	0,01	0,82	0,02	0,12	0,11	0,34	2
257	0,22	1,26	0,12	0,35	0,00	0,10	2
259	0,57	0,88	0,10	0,02	1,96	0,21	2
321	0,28	1,18	0,69	0,02	0,07	0,01	2
367	0,21	0,99	0,02	0,02	0,01	0,03	2
368	0,25	0,03	1,18	0,75	0,09	0,01	2
2637	0,09	1,16	0,80	0,12	0,02	0,01	2
2653	0,69	1,21	0,45	0,12	0,39	0,50	2
2655	0,14	0,21	0,09	0,08	0,13	0,01	2
192	0,47	1,04	0,11	0,26	0,06	0,07	4
249	0,24	1,51	0,21	0,52	0,02	0,01	4
250	0,06	0,98	0,08	0,02	0,10	0,15	4
318	0,11	0,03	0,12	0,05	1,20	0,22	4

365	0,73	1,71	0,20	0,24	0,15	0,08	4
369	0,38	1,55	0,27	0,45	0,03	0,10	4
2634	1,70	1,34	0,02	0,02	0,53	0,77	4
2639	0,03	1,01	0,30	0,32	0,02	0,01	4
2649	1,26	1,61	0,80	0,18	0,88	0,21	4
2650	0,01	0,80	0,27	0,02	0,29	0,38	4
132	1,20	0,96	0,02	0,18	0,02	0,12	8
194	0,05	1,80	0,03	0,13	0,02	0,02	8
196	0,23	1,04	0,29	0,43	0,28	0,06	8
198	0,91	1,38	0,55	0,16	0,32	0,01	8
248	0,18	1,80	0,39	1,25	0,66	0,46	8
254	0,13	0,03	0,61	0,15	0,76	0,01	8
258	0,34	2,05	0,02	0,19	0,02	0,33	8
320	0,33	1,89	0,29	0,04	0,07	0,07	8
2651	0,51	1,48	0,05	0,59	0,02	0,42	8
195	1,01	1,03	0,36	0,30	0,59	0,45	16
366	0,30	0,41	0,61	0,23	0,25	0,02	16
2636	0,44	1,17	0,50	0,38	0,19	0,09	16
2638	0,64	1,05	0,02	0,02	0,73	1,00	16
2647	0,54	1,63	0,39	0,79	0,47	1,00	16
2652	0,93	1,33	0,94	0,65	0,30	0,23	16
2659	1,65	0,88	0,89	0,89	1,89	0,69	16
197	0,28	1,22	0,02	0,02	0,34	0,63	64
193	1,88	1,28	0,02	0,02	0,45	1,19	128

322	1,44	1,91	0,82	0,50	1,80	0,73	128
172	0,12	0,03	0,02	0,02	0,25	0,00	negativo
173	0,12	0,03	0,42	0,11	0,28	0,01	negativo
174	0,35	0,03	0,16	0,02	0,05	0,01	negativo
175	0,68	0,03	0,07	0,25	0,74	0,01	negativo
177	0,25	0,03	0,08	0,02	0,24	0,01	negativo
180	0,45	0,03	0,10	0,02	0,12	0,01	negativo
182	0,13	0,03	0,08	0,02	0,55	0,01	negativo
183	0,77	0,03	1,01	0,10	1,36	0,01	negativo
184	0,46	0,03	0,29	0,02	0,42	0,01	negativo
186	0,92	0,03	0,40	0,15	0,18	0,01	negativo
189	0,19	0,03	0,01	0,23	0,03	0,01	negativo
199	0,03	0,03	0,01	0,00	0,34	0,07	negativo
200	0,45	0,06	0,21	0,02	0,08	0,05	negativo
201	0,05	0,03	0,10	0,02	0,30	0,19	negativo
203	0,29	0,03	0,35	0,07	0,75	0,00	negativo
204	0,14	0,03	0,17	0,43	0,02	0,01	negativo
205	0,20	0,13	0,02	0,02	0,37	0,13	negativo
206	0,15	0,03	0,11	0,02	0,47	0,03	negativo
207	0,54	0,03	0,71	0,02	0,39	0,01	negativo
223	0,19	0,03	0,33	0,19	0,18	0,01	negativo
224	0,46	0,38	0,11	0,02	0,07	0,46	negativo
225	0,01	0,03	0,19	0,02	0,02	0,01	negativo
226	0,16	0,03	0,49	0,74	0,24	0,00	negativo

260	0,59	0,03	0,15	0,02	0,47	0,01	negativo
262	0,45	0,03	0,01	0,02	0,69	0,01	negativo
265	0,31	0,03	1,04	0,06	0,59	0,03	negativo
270	0,13	0,03	0,02	0,02	0,28	0,01	negativo
276	0,24	0,03	0,01	0,01	0,50	0,04	negativo
285	0,01	0,03	0,35	0,22	0,02	0,01	negativo
291	0,63	0,03	0,06	0,05	0,06	0,01	negativo
304	0,44	0,03	0,05	0,01	0,02	0,01	negativo
317	0,13	0,47	0,54	0,11	0,03	0,01	negativo
323	0,31	0,03	0,02	0,35	0,02	0,01	negativo
329	0,30	0,03	0,52	0,12	1,30	0,19	negativo
348	0,05	0,03	0,04	0,02	0,22	0,01	negativo
355	0,01	0,03	0,02	0,12	0,60	0,25	negativo
362	0,14	0,03	0,53	0,41	1,45	0,18	negativo
370	0,40	0,03	0,32	0,02	0,02	0,01	negativo
382	0,15	0,03	0,13	0,02	0,16	0,01	negativo
400	0,01	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	negativo
401	0,01	0,03	0,02	0,36	0,02	0,01	negativo
402	0,25	0,03	0,42	0,67	0,11	0,01	negativo
403	0,44	0,03	0,40	0,11	0,13	0,01	negativo
404	0,32	0,03	0,04	0,02	0,02	0,01	negativo
405	0,38	0,03	0,28	0,42	0,10	0,01	negativo
406	0,10	0,03	0,02	0,17	0,00	0,01	negativo
407	0,15	0,03	0,08	0,01	0,54	0,01	negativo

408	0,70	2,35	0,14	0,56	0,02	0,01	negativo
409	0,03	0,62	0,02	0,02	0,04	0,05	negativo
410	0,21	0,03	0,02	0,02	0,47	0,01	negativo
2646	0,02	0,03	0,33	0,41	0,02	0,01	negativo
Corte	0,91	0,12	0,80	0,14	0,43	0,16	promedi o de valores negativo s + 3 SD
	0,93	0,82	0,80	0,34	0,38	0,17	promedi o de valores positivo s - 1 SD
	1,29	1,24	0,94	0,57	0,83	0,47	promedi o de valores positivo s
	0,35 9	0,427671 13	0,134607 57	0,224671 35	0,449235 71	0,293966 66	desviaci on estandar (SD) de valores positivo s
	0,57	0,39	0,67	0,12	- 0,07	- 0,12	promedi o de valores positivo s - 2 SD

7.5. Marcador de peso molecular

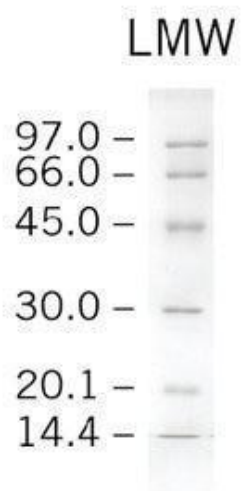


Figura 30: Marcador de peso molecular LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis 17-0446-01 (GE Healthcare) utilizado en la electroforesis de acrilamida.