

T. D.
B/8

EL TEST DE NELSON & MAYER

EXPERIENCIA PERSONAL Y MODIFICACIONES A LA TECNICA

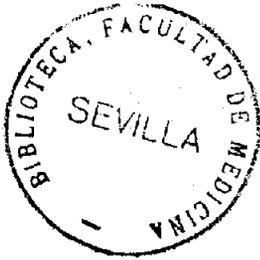
TESIS DOCTORAL

por

Juan Bermudo Fernández.

R. 3.971

T.D.
B/8



**BERNARDO LOPEZ MARTINEZ, Catedrático de Dermatología y
Venereología de la Facultad de Medicina de Sevilla,**

C E R T I F I C O: Que D. Juan Bermudo Fernán-
dés, Licenciado en Medicina y Cirujía, ha realizado
la presente Tesis Doctoral bajo mi Dirección en el La-
boratorio Central de Serología, de la Coordinación de
la Dirección General de Sanidad y la Facultad de Medi-
cina.

Lo que declaro en cumplimiento de los re-
quisitos legales sobre la presentación de Tesis Docto-
rales, en Sevilla, a ocho de Noviembre de mil novecien-
tos cincuenta y ocho.-

A large, stylized handwritten signature in black ink.

RESPETABLE TRIBUNAL:

Tengo el honor de presentar este trabajo con el que aspiro al grado de Doctor. Ha sido efectuado bajo la experta dirección del Profesor de esta facultad de Medicina, Dr. Bernardo López Martínez, Catedrático de Dermatología y Venereología y gracias a su ayuda, he podido llevar a feliz término las experiencias sobre este apasionante Tema que constituye hoy el diagnóstico de la infección luética.

Agradezco sinceramente a todos los Jefes de Servicios del Hospital Central la ayuda aportada, así como al Director y Jefes de Servicio de la Escuela Departamental de Puericultura. Así mismo, quiero hacer patente mi agradecimiento al Personal Facultativo del Laboratorio Central del Hospital Provincial y por último a la valiosa ayuda y cooperación prestadas por el personal adscrito al laboratorio Central de Serología, sin cuya reconocida su-

ficiencia hubiese sido difícil el feliz término de este trabajo.

La Organización Mundial de la Salud, al concederme una Beca para estudiar la reacción de Nelson y Mayer, me facilitó la tarea emprendida y quede constancia aquí de mi gratitud hacia los Rectores de este importante organismo, extensible a los Drs. Krag, Nielsen, Durel, Borel y Daguet, magníficos técnicos y mejores compañeros.

REACCIONES SEROLÓGICAS CLÁSICAS Y TEST DE NELSON & MAYER

El fenómeno descubierto en el año 1.901 por Bordet y Gengou abrió las puertas a una reacción universalmente conocida, que a pesar de las críticas y modificaciones sufridas a través de los años (34) aun se conserva como la instituyente de descubridores Wassermann.

El día 10 de Mayo de 1.906 publicó Wassermann su reacción por vez primera en la revista Alemana "Deutsche Medizinische Wochenschrift" y fue considerada por muchos como un caso de aplicación especial a la sífilis de la de Bordet y Gengou. Sin embargo en 1.907, Levaditi y Landsteiner demostraron que las analogías son solo aparentes pues la R. de Wassermann carece de todo sustrato inmunológico específico, cualidad básica y esencial de la de Bordet y Gengou.

Wassermann, Neisser y Bruck, idearon un antígeno capaz de reaccionar con las reagentes sífilíticas que se encuentran en los enfermos afectos de sífilis y usaron el hígado de feto herodolústico que contenía abundantes treponemas, por la imposibilidad de que ya hemos hablado de conseguir cultivos de los treponemas. Ellos obtuvieron un extracto acuoso de este hígado macerado y dieron los primeros resultados. Pory pronto empezaron las modificaciones. Se ideó el extracto alcohólico del referido hígado hasta que Bordet-Reuillon echaren por tierra la especificidad inmunológica de esta reacción al obtener antígenos de órganos normales, que contenían los lípidos esenciales de la desviación del complemento, ya que se observó, que mientras que algunos antígenos preparados por Wassermann, Neisser y Bruck eran muy sensibles, otros en cambio adolecían de poca sensibilidad, y por ello se pensó que serían los lípidos e anticuerpos del hígado los responsables de la fijación y no los treponemas. Posteriormente pudo observarse que los buenos resultados obtenidos con los extractos alcohólicos, que no contenían treponemas eran debidos a los lípidos del hígado disueltos en alcohol. Bordet-Reuillon, obtuvieron extractos de corazon humano y de vaca, sueros y que no habían tenido jamás relación con la infección lústica. Tribondeau obtuvo antígenos a partir del corazon de caballo y Sacha del de caballo. Trabajos posteriores comprobaron que existían lípidos

que perjudicaban la sensibilidad del antigeno y entonces se procedio a la extraccion con acetona de los lipoides perjudiciales y con alcohol, en un segundo tiempo de los lipoides de sensibilidad reactiva especifica. Asi nacio un termino nuevo los "haptenes", ya que en esta reaccion no se puede llamar antigeno a la parte reaccionante ya que no es especifico, aunque en la practica corriente se le sigue llamando antigeno por analogia con la reaccion de Vidal.

Multitud de variantes posteriores han sido ideadas para aumentar la sensibilidad de los antigenos y llegamos con ello al actual, descubierta por una autora americana, Mary Pangborn (28) y conocida universalmente con el nombre de cardiolipina, que es un fosfolipido extraido de corazon de buey con lecitina y colestestina, en concentracion perfectamente estabilizada y conocida, y que ha dado optimos resultados en los estudios verificados en todos los laboratorios del mundo.

Se comprende que la especificidad inmunologica de la reaccion de Bordet Wassermann es ficticia, ya que el antigeno, no tiene relacion alguna con el treponema pallidum agente causal de la infeccion.

La idea fundamental de Wassermann fue engarzar dos reacciones antigeno-anticuerpo en una. En la primera fase tenemos el anticuerpo (suero humano) en antigeno (haptene) y el complemento (suero fresco de cabuya). En el caso de que existan anticuerpos antídiftiricos en el suero a examinar, estos se unen al antigeno. Si en estas circunstancias le añadimos complemento, este no tendra a quien unirse y quedara por tanto libre. El segundo tiempo de la reaccion esta representado por la adiccion a este mismo tubo, de otro complejo antigeno anticuerpo formado por hematias de conejo lavadas (antigeno) y anticuerpo anti-hematias de conejo o hemolisina (anticuerpo). Siguiendo con el supuesto anterior, a este minutimo complejo antigeno anticuerpo se une el complemento, y por lo tanto, es capaz de reaccionar con los hematias de conejo previamente sensibilizados por la hemolisina y producir la destruccion de aquellos concentraciones entonces con una citolisis, una hemolisis de los hematias de conejo. De tal manera que gracias a este engarce somos capaces de ver una reaccion que en su primera fase es totalmente imposible.

Las reacciones de floculacion, que forman el otro gran grupo de investigaciones

aplicables a la sífilis, es una modificación del antígeno e hapteno ideado para la reacción de Wassermann, con la adición de esterina, telur, etc., según los diferentes autores. Clásicamente se usan en todos los laboratorios la reacción de Meinicke, Kahn, Citocheil, Rein-Bessak, etc. y sus modificaciones (8- 30- 40- 50- 60) y últimamente la que es conocida universalmente con el anagrama V.D.R.L.

La especificidad de todas estas reacciones es relativa, una amplia serie de enfermedades que son capaces de dar estas reacciones positivas aun estando el paciente exento de sífilis, y al contrario, algunos enfermos con sintomatología de sífilis dan reacciones serológicas negativas aun estando la lues presente en sus organismos. No obstante los casos son relativamente infrecuentes y como regla general, podemos fiarnos de estos resultados para dar a un sujeto como sífilítico o no.

Para poner de manifiesto estas falsas reacciones biológicas positivas se hicieron numerosas tentativas: Test de verificación y confirmación, reacciones de desviación de complemento o de floculación con antígenos específicos, Test de inhibición, reacciones de aglutinación, test de adherencia y desaparición de treponemas y el test de la inmovilización de Nelson y Mayer.

Todos los test de verificación de Hecht, Wassermann, Witebsky, Kahn, etc., tienen un interés teórico mas que práctico, y no permiten diferenciar con exactitud una reacción sífilítica de una biológicamente falsa. Las reacciones de floculación con antígenos específicos utilizaban extractos del treponema pallidum y entre todas hemos de recordar la ideada por Gastigens en 1.929 y conocida por pallida reacción, por las consecuencias que posteriormente ha tenido. Hoy en día, las reacciones de desviación de complemento utilizan un antígeno treponémico obtenido del treponema de Reiter, cepa apatógena, aunque no parece que estén al abrigo total de las reacciones biológicamente falsas. Sobre los tests de inhibición no parece que la experiencia haya confirmado enteramente el valor práctico de tan interesantes experiencias y sobre todos hemos de citar, los ideados por Rein-Pillemer y el de Neurath. Las esperanzas puestas al principio en la reacción de aglutinación del treponema fueron disminuyendo poco a poco. No obstante las medi-

fiaciones de la tecnica se han ido sumando hasta hoy, como MacLeod y Magnusson en 1.923 y posteriormente Cain. Los ultimos trabajos del Profesor Turner en el Johns Hopkins University demuestran que las dificultades mayores se encuentran en disponer de una cepa de treponemas suenos de presensibilizacion in vivo y por la existencia de aglutinacion con los sueros no sifiliticos que contienen reaginas.

En 1.908 descubrieron Hoffmann y Frevasak que los sueros sifiliticos poseen una accion inmovilizante sobre el treponema, pero hizo falta esperar hasta el año 1.949 para que Nelson y Mayer (47) publicaran sus primeros trabajos dando lugar a la reaccion que lleva su nombre.

Existen una serie de enfermedades clinicas que dan las reacciones biologicamente falsas positivas. (16 - 25 - 71 - 73). Las teorias expuestas por Kahn, Singer, y Becker, dando una explicacion sobre la positividad falsa no son totalmente convincentes. El Test de Nelson y Mayer, ha conseguido discriminar esta positividad en un porcentaje muy elevado, ya que su especificidad, como mas adelante veremos, es totalmente absoluta. Aunque la literatura sobre este tema es muy divergente, podemos admitir en principio el cuadro expuesto por Delacretan y colaboradores (11) y nosotros hemos podido observar serologias positivas falsas en una serie de afecciones como mas adelante hablaremos. No obstante nuestra estadistica sobre este tema es muy reducida ya que no estamos habitualmente en contacto con los enfermos, de los que recibimos los sueros con una ficha rellena, sobre antecedentes iusticos positivos e negativos. En los casos que citamos hemos podido seguir la pista de la enfermedad por haber sido vistos estos enfermos en los servicios del Hospital Central de Sevilla.

La serologia clasica ha resultado positiva en la siguientes enfermedades:
Enfermedades microbianas.- Lepra (23 - 27 - 30), tuberculosis avanzada, neumonia (por neumocecos), endocarditis, escarlatina, puerigo, infecciones por estreptococos hemoliticos, difteria y mermo. De este grupo, muestra estadisticas sobre un 45 % de falsas positividades en los enfermos de lepra, y tambien un caso especial de dar una reaccion fuertemente positiva (+++) en la R. de Wasserman Kahn, y Weibicke y un V.D.R.L. con titulo elevado a 1/32 siendo el Test de Nelson negativo. (0 %).

Enfermedades por Rickettsias.- Tifus exantemático.

Enfermedades por virus.- Varicela, rubéola, neumonía a virus, hepatitis infecciosa, mononucleosis infecciosa, enfermedad de Niésslas Favre, rubéola, influenza poliomielitís, infecciones respiratorias a virus, paratífida epidémica. En este grupo, hemos encontrado positividades falsas en: hepatitis infecciosa (dos casos), mononucleosis infecciosa (un caso).

Enfermedades por espiroquetas.- Leptospiras, fiebre recurrente, sodoku, enfermedad de Weil, angina fuscespirilar de Plant Vincent, field-fiver, Neostrea no hemos encontrado positividad falsa en las reacciones serológicas clásicas en en los enfermos afectos de leptospirosis.

Enfermedades de virus o protozoarios.- Malaria, trypanosomiasis, Kala-azar, leishmaniasis cutánea. En este grupo hemos encontrado tres casos de palúdicos con serologías positivas biológicamente falsas.

Enfermedades del colágeno.- Lupus eritematoso agudo diseminado, lupus eritematoso subagudo diseminado, periarteritis nodosa, artritis reumática. En tres casos de esta enfermedad no hemos encontrado ninguna reacción positiva.

Alteraciones del metabolismo y de la nutrición.- Hiperproteinemia, hipoproteinemia, escorbuto, malnutrición aguda de la niñez, beri-beri, pelagra. En cinco enfermos de pelagra, los resultados fueron todos negativos. Otro enfermo dió resultado positivo en la serología ordinaria y también en el Test de Helauss se trataba de un lúctico antiguo, en el que se había desarrollado esta segunda enfermedad.

Afecciones malignas.- En las diferentes estadísticas oscilan los tantos por cientos entre 0 y 24,5 % (Delacretax y col.) Hemos estudiado serológicamente doce casos de tumores malignos en diferentes localizaciones y dos enfermos afectos de leucemia y nuestra cifra es de 0 %. Otro caso de leucemia dió igualmente resultados negativos.

Afecciones medicamentosas e intoxicaciones diversas.- Narcóticas, plomo, ácido acético.

Enfermedades diversas.- Afecciones cardíacas, sarcoidosis, afecciones pulmonares, afecciones faringéas, abdominales no identificadas, ureginitales, disenteria amebiana, fiebre alta, lupus eritematoso agudo diséide, epilepsia, trem-

basis coronaria, tratamientos con sueros de babillo, transfusiones.

En los sujetos vacunados contra la tos ferina, difteria tetanos.

Estas son las enfermedades que han dado serologias positivas falsas y recopiladas de la literatura y que segun nuestras experiencias nos parecen excesivas, ya que los casos estudiados en muchas enfermedades, los autores citan un solo caso (ercubute, pelagra, pemfige agudo, etc.,) y en casos como la pelagra disponemos de un estudio superior con resultados totalmente discordantes.

En cambio existen una serie de enfermedades en las cuales tanto la serologia clasica como el Test de Nelson dan resultados equivocos, y en algunas aun en el cien por cien de los casos. Nos referimos a ciertas enfermedades tropicales (74) cuyos agentes son treponemas totalmente parecidos al productor de la sifilis y los trabajos existentes para la diferenciacion entre estas enfermedades y la lues, estan todavia mal definidos. Nos referimos al Bejel, Pian, Mal de Pinto. Entrar en las caracteristicas de estas tres enfermedades para su diferenciacion con la sifilis nos parece fuera de lugar, y ya queda dicho la intima relacion existente entre los productores de estas enfermedades y el treponema pallidum.

Por todas estas razones expuestas, y por el cumulo de enfermedades que pueden dar las reacciones serologicas clasicas positivas, nos hacen ser cautos en etiquetar a un enfermo de luetico, hasta no tener seguridad, utilizando la reaccion que hasta hoy afina al maximo, haciendo la salvedad de la triada anteriormente citada, y hablamos ahora del Test de Nelson. El error que pudiera suscitar con el Bejel, Pian, y el Mal de Pinto, es relativo ya que estas enfermedades son endemicas en nuestro pais y ademas el tratamiento actual es el mismo para las cuatro enfermedades, cosa logica ademas, ya que el agente causal es tan parecido, que muchos autores consideran como variantes raciales los causantes de estas tres enfermedades. Nosotros no hemos podido encontrar un enfermo de ninguno de estos padecimientos a pesar de los esfuerzos efectuados, por la extraordinaria rareza de ellos en nuestro pais.

El salto habido desde el descubrimiento por Wassermann, Neisser y Bruck, has-

ta el Test de Nelson y Mayer en el año 1.949 (47) es enorme, aunque como se verá más adelante este último tiene una indicación precisa, no pudiéndose desochar de ninguna manera las reacciones clásicas, que sirven perfectamente en la mayoría de los casos, y más ^{desde} ~~debido~~ el descubrimiento de antígenos perfectamente establecidos y conocidos, que le hacen tener un tanto por ciento de error muy inferior al que obtenía con el uso de los antígenos anteriores. No obstante el Test de Nelson y Mayer, ha venido a simplificar totalmente la cuestión y gracias a él tenemos una arma capaz para la lucha contra la sífilis con una seguridad, parecida a las universalmente admitidas en otras enfermedades (61).

Gracias a la ayuda y confianza prestadas por el Profesor de esta Facultad de Medicina, Dr. D. Bernarado Lopez Martinez, y por una beca concedida por la Organización Mundial de la Salud, pude estudiar esta apasionante reacción en Dinamarca, en el Statens Serum Institut de Copenhague, y en el Hospital St. Lazare de París. En estos dos centros aprendí la técnica seguida en cada uno de ellos, y con la gentileza de los médicos franceses y daneses, en especial los Drs. Krag (58) y Nielsen (59) pude comprender y conocer los problemas de la técnica, enseñanzas preciosas que me permitieron poner en funcionamiento el diverso material enviado por la O.M.S. para la instalación del Laboratorio Pilote que funciona en el Hospital Central de Sevilla, bajo la experta dirección del Prof. Lopez Martinez. La Dirección General de Sanidad, consciente del problema social que representa la sífilis, al igual que en otros países, decidió comenzar una campaña de lucha antivérea, dándole especial atención a la sífilis, en cuya lucha tienen un importante papel asignado el laboratorio pilote a que antes me he referido, habiendo resuelto el Test de Nelson & Mayer por mí practicado, una serie de problemas planteados a los clínicos encargados del despistaje de la sífilis en grandes masas de población en Sevilla y su provincia. El Laboratorio funciona oficialmente desde el día primero de Octubre de 1.954. No obstante, el Test de Nelson empezó a funcionar en el Laboratorio Central del Hospital Provincial en Enero del mismo año. Desde entonces se han analizado novecientos sueros y hemos utilizado una técnica con modificaciones propias sobre la original, algunas de las cuales han aparecido publicadas por la OMS en Octubre del año 1.957 (72) con el título Co-ope-

relative Study on the T.P.I. Test and other Treponemas Tests. Seventh collection of reports from participating Laboratories.

Las investigaciones emprendidas por D'Alessandro (13 - 14) y sus colaboradores en Italia sobre los antígenos existentes en el treponema pallidum, han venido a dar luz en estos problemas de serología lústica. Estos autores emplearon la sopa Reiter (23), y no pretendemos entrar en la crítica de estos hallazgos, ya que hay dudas sobre el significado filogenético de la sopa Reiter, serológicamente afín al espirqueta de Schaudinn, si es el representante de una variedad apatogena del treponema pallidum, o bien, una especie saprofita serológicamente parecida al referido espirqueta por un fenómeno de grupo, ya que es de un interés esencial la demostración de que posee un mosaico antigénico (D'Alessandro, Oddo, Cemas, y Dardanoni) (15), constituido por cuatro componentes diferentes:

Antígeno de naturaleza proteídica, termolábil, y designado por el alícuo con el signo T.L.

Antígeno de naturaleza polisacárido, termestable, y designado por T.S.

Antígeno lipídico, indicado por el signo L.

Cada uno de estos antígenos es capaz de originar un anticuerpo:

Anticuerpo antiproteídico: correspondiente al T.L.

Anticuerpo polisacárido correspondiente al T.S.

Dos anticuerpos antilipídicos: L (fijador del complemento) y Fl (floculante)

La importancia diagnóstica no es la misma para los cuatro antígenos. Según el concepto de disponibilidad inmunológica de Sachs, la capacidad para producir anticuerpos y reaccionar *in vitro* sería máxima en el primero y en el tercero, y más dudosa e inconstante para el segundo y el cuarto. Por lo tanto hoy día, se le reconoce importancia práctica sero-diagnóstica al antígeno proteídico específico y al lipídico. Los otros dos serían de interés secundario.

D'Alessandro y Dardanoni (14) han puesto a punto una técnica de extracción del antígeno proteídico específico en estado soluble y le han asignado el anagrama ATPS, antígeno treponémico proteídico soluble, universalmente admitido hoy (37-38)

El ATPS es una proteina compleja libre de polisacaridos y lipidos que actua como antigene completo in vivo dando lugar a la produccion de anticuerpos. Por lo tanto el antigene T.L. es altamente especifico. El T.S. tiene el valor de un hapteno; el lipideo puede ser absorbido por la cardiolipina y el Fl, ese responsable del fenomeno de la aglutinacion.

Gracias a su especificidad y sensibilidad alta el antigene T.L. constituye un elemento preciso para el diagnostico serologico de la sifilis.

Turner (38), fue el precursor directo de la reaccion de la inmovilizacion del treponema pallidum. Su reaccion consistia en inocular por via intradermica en un animal, una mezcla de suero a examinar con treponemas muy virulentos para el conejo y en presencia de el complemento. La lectura era dificil de apreciacion y en el supuesto de que existiesen anticuerpos virulicidas en el suero examinado o no habia reaccion, o engendraba una lesion atenuada en el curso de la incubacion mas prolongada. Si se originaba el caso contrario, los treponemas no lesionados, originaban un chancro tipico similar al producido por la inyeccion testigo. La utilizacion de este experimento para la practica corriente fue desgraciadamente imposible por los inconveniente ya citados de la apreciacion de las lesiones.

Dos alumnos del profesor Turner, Nelson y Mayer (47) pensaron intentar una reaccion de lectura mas sencilla. Así pudo disponerse del test de la inmovilizacion del treponema, auténtica revolucion de los sifilografos.

Extendida por el mundo entero, esta reaccion queda como la mas sensible y especifica para el diagnostico de la lues. El metodo es largo y costoso por lo que desgraciadamente no puede hacerse a todos los enfermos, solo utilizable en casos especiales.

Las estadisticas de todos los autores, de las que mas adelante hablaremos, demuestran bien claramente hasta que punto llega a afinar esta reaccion.

EL TEST DE NELSON Y MAYER

En esencia la reaccion consiste en lo siguiente: (16) en un medio de conservacion o supervivencia especial ideado por sus descubridores, y conocido en todas las laboratorios que lo practican por "medio de Nelson", los treponemas de la cepa Nichols, muy virulentos para el conejo, guardan su movilidad durante 36748 horas por lo menos. Si a esta emulsion de espiroquetas, se le añade cierta cantidad de suero sifilitico y alexina (suero activo de coneja) y se incuba a 35 grados en atmosfera inerte, los treponemas se inmovilizan en proporcion importante al cabo de veintidos horas. La movilidad en cambio queda sin alteracion si en lugar de suero sifilitico humano o de animal infectado previamente, se pone suero de sujeto exento de sifilia.

La reaccion en si, parece a primera vista facil en su ejecucion. No obstante se encuentra llena de dificultades. La primera con que treponemaron sus descubridores fue el fenomeno de la auto-aglutinacion agonica de los treponemas. Para salvar esta dificil obstaculo se inspiraron en los trabajos de Brewer y hallaron el medio, donde los treponemas, si bien no se multiplican, quedan perfectamente moviles mas del tiempo preciso para llevar a cabo la reaccion. Este medio de supervivencia, esta compuesto por una mezcla compleja, de albumina de huevo, cisteina, glutathion, piruvato sodico, ultrafiltrado de huevo, etc., perfectamente estabilizada y estudiada.

Las dificultades ya classicas para el cultivo del treponema pallidum, obligan hasta ahora a sostener las cepas por pases sucesivos en animales receptivos. Estas dificultades de las que ya nos hemos ocupado, encarecen enormemente la reaccion, ya que un laboratorio que practique el Test a que nos referimos ha de estar bien provisto de animales sanos de garantia, e someterse a la eventualidad de inocular un animal enfermo, que llega al laboratorio en periodo de incubacion de la enfermedad, aparentemente sano, y exponerse a perder la cepa, como a nosotros mismos nos ha pasado.



En la fotografia superior se observa un conejo sanos antes de inocularlo.
En la inferior destaca claramente la orquitis especifica desarrollada, des-
pues de doce dias de inoculacion e incubacion consiguiente.



El animal que usamos para este sesten de la cepa es el conejo, el mas receptivo de todas los que disponemos a nuestro alcance, siendo totalmente indiferente la raza, ya que hemos tenido ocasion de inocular, blancos y grises, y no hemos notado ninguna diferencia en la incubacion de la cepa.

La presensibilizacion de las cepas treponemas fue otro de los problemas planteados al principio. En efecto, el animal experimentalmente hecho afilice produce naturalmente sus anticuerpos y era imposible posteriormente averiguar cuales treponemas eran inmovilizados por el suero a examinar y cuales lo eran por los anticuerpos del animal. El uso de la cepa Nichols (50) altamente patogena para el conejo, les produce una orquitis especifica, con abundantes treponemas en el exudado, a los 6 - 8 dias de la inoculacion tiempo insuficiente, para que le haya dado tiempo al organismo del animal a producir sus propios anticuerpos. Por inyecciones sucesivas de esta cepa en los testiculos de los conejos se obtiene un entretamiento optimo de la cepa. El sacrificio del animal no debe exceder de un tiempo determinado para evitar precisamente la sensibilizacion de los microorganismos, y como regla general puede servir, matar al animal a los 2 - 3 dias de la aparicion de los signos clinicos de la orquitis. Nosotros hemos comprobado que los animales que mas optimos resultados dan, son aquellos que ya han estado en contacto sexual con la hembra, de tal manera que usamos, siempre que nos es posible, animales que siete dias antes han hecho copula.

Gracias a la inoculacion experimental de estos animales ha podido dar un avance al estudio de la respuesta del organismo frente a los diversos antigenos comprendidos en el treponema pallidum. Es bien conocido gracias a estas circunstancias que la aparicion de anticuerpos inmovilizantes es la mas tardia, mucho despues que los anticuerpos antibreponemicos de grupo, y que los antilipideos, apareciendo estos despues que los anteriores. Dardaneni (19), ha estudiado esta respuesta, inoculando animales y buscando la aparicion de estos anticuerpos. Nosotros hemos llegado a sus mis-

mas conclusiones, sometiendo a los conejos inculados a sangrias fraccionadas a partir del primer dia de la inoculacion. Al aparecer los primeros sintomas de la erquitia especifica, existen en el organismo del animal, anticuerpos antilipeidos y antitreponemicos de grupo, no asi los inmovilizantes, que aparecen mucho mas tardivamente. Hemos podido comprobar, que el primero en aparecer es el antitreponemico de grupo, aunque el tiempo de aparicion que afirma Dardanoni, ha sido inferior al obtenido por nosotros, ya que a las 24 horas de la inoculacion, no hemos conseguido detectar con nuestros medios serologicos, ninguna manifestacion de defensa del organismo animal. La fecha de aparicion mas precoz por nosotros obtenidas ha sido de 48 horas, aunque con resultados inconstantes, y con un porcentaje de negatividad muy elevado.

Hemos desechado la practica existente en otros laboratorios de tratar previamente a los animales que se van a inocular, ya que la epoca de la aparicion de los anticuerpos inmovilizantes es mucho mas tardia, que los siete dias que nosotros mantenemos al animal vivo, y por lo tanto, nos parece superfluo este tratamiento. Este consiste en retardar la respuesta de anticuerpo bloqueando las celulas encargadas de su fabricacion, por los rayos X, (49) la mostaza nitrogenada, (39) y la certisena (67). Es practica que en la mayoria de los laboratorios va cayendo mas en desuso, y practicada en la actualidad por una muy pequena cantidad de laboratorios. Nosotros, personalmente, no creemos que tien fundamento cientifico.

Una vez que han estado en contacto con los treponemas, con el suero humano a analizar y el complemento en atmosfera especial y a 35 grados en estufa se hace la lectura al cabo de 24 horas. Para ello se toma un asa de platino y previamente lavada, se coloca con su auxilio una gota entre porta y cubre y se observa al microscopio con fondo oscuro, y se observan los treponemas. La relacion entre los vivos, del tubo problema y tubo testigo (de los que mas adelante hablaremos) arroja un porcentaje que posteriormente va a ser el resultado total del Test.

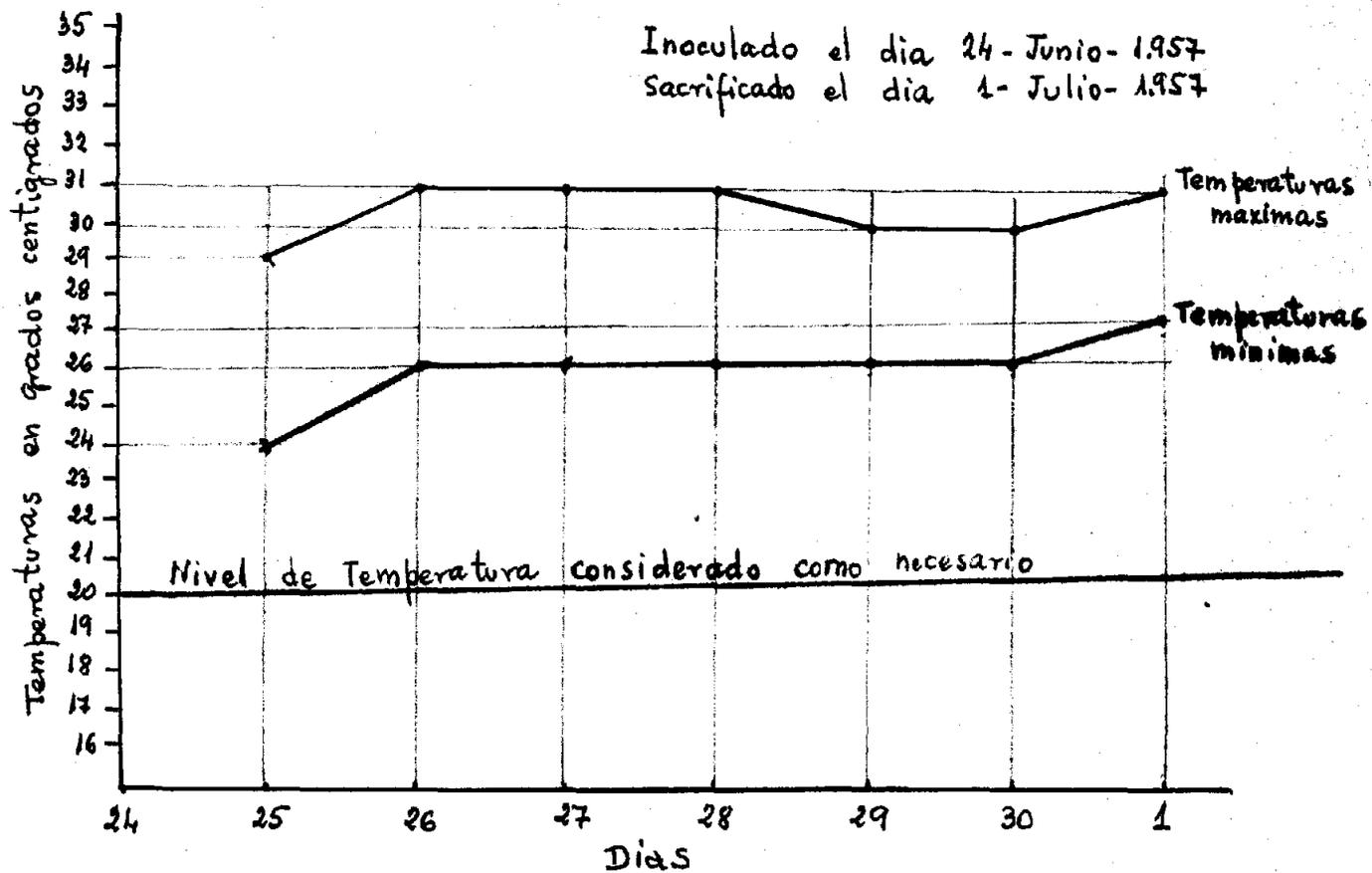
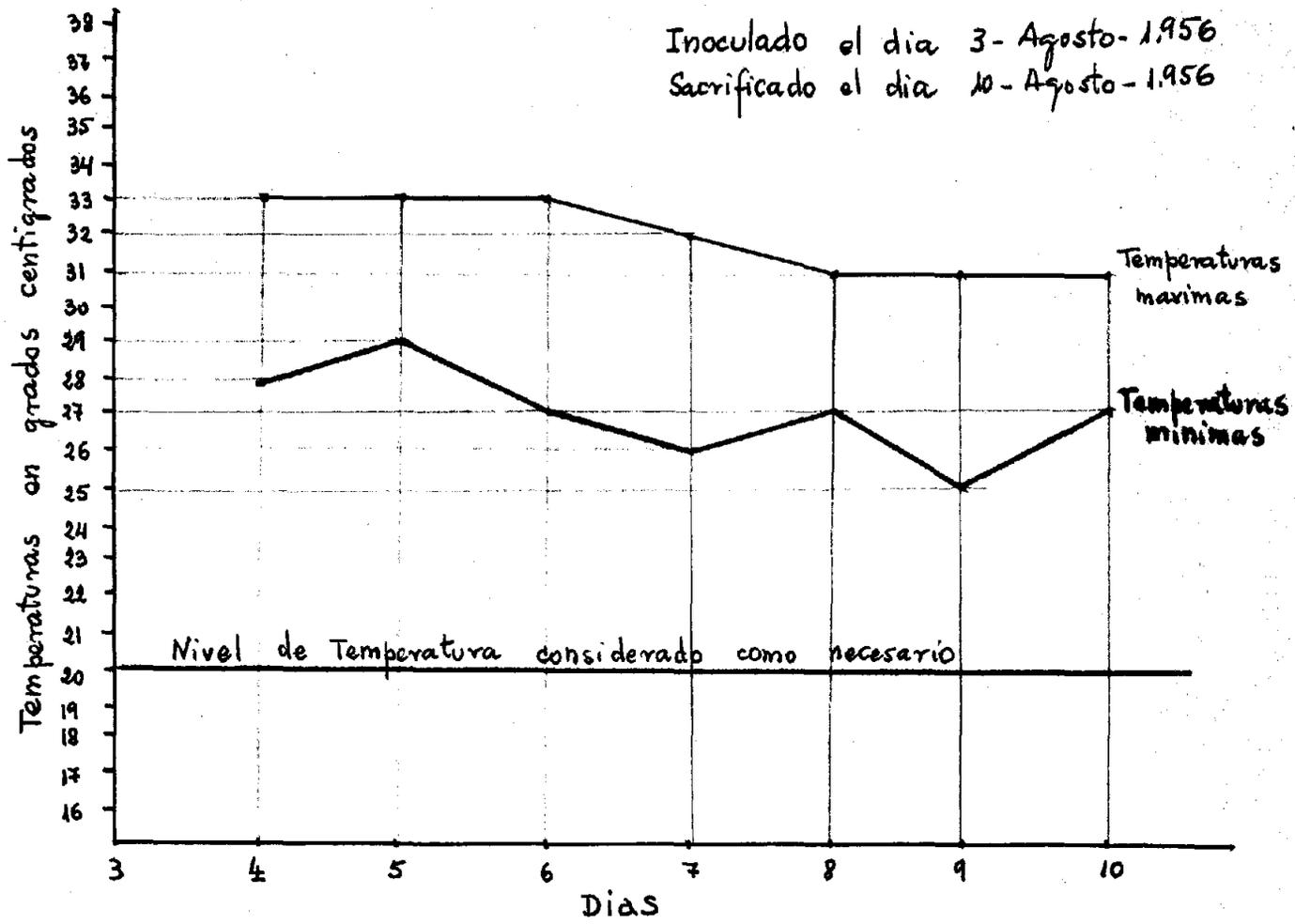
25

Existen tres interpretaciones; inmovilización de 0 a 20, se considera el Test como negativo, de 20 - 50, dudoso, y de 50 a 100 positiva. Los americanos consideran el resultado comprendido entre 20 y 50 como no satisfactorio. El trepanoma se observa muy fácilmente, y perfectamente móvil. Hay que tener en cuenta que debido al movimiento Browniano, todas las partículas que están en suspensión en el líquido tienen un movimiento, que no hay que confundir con el movimiento propio del *Trepanoma pallidum*, y del que ya dimos constancia en líneas anteriores.

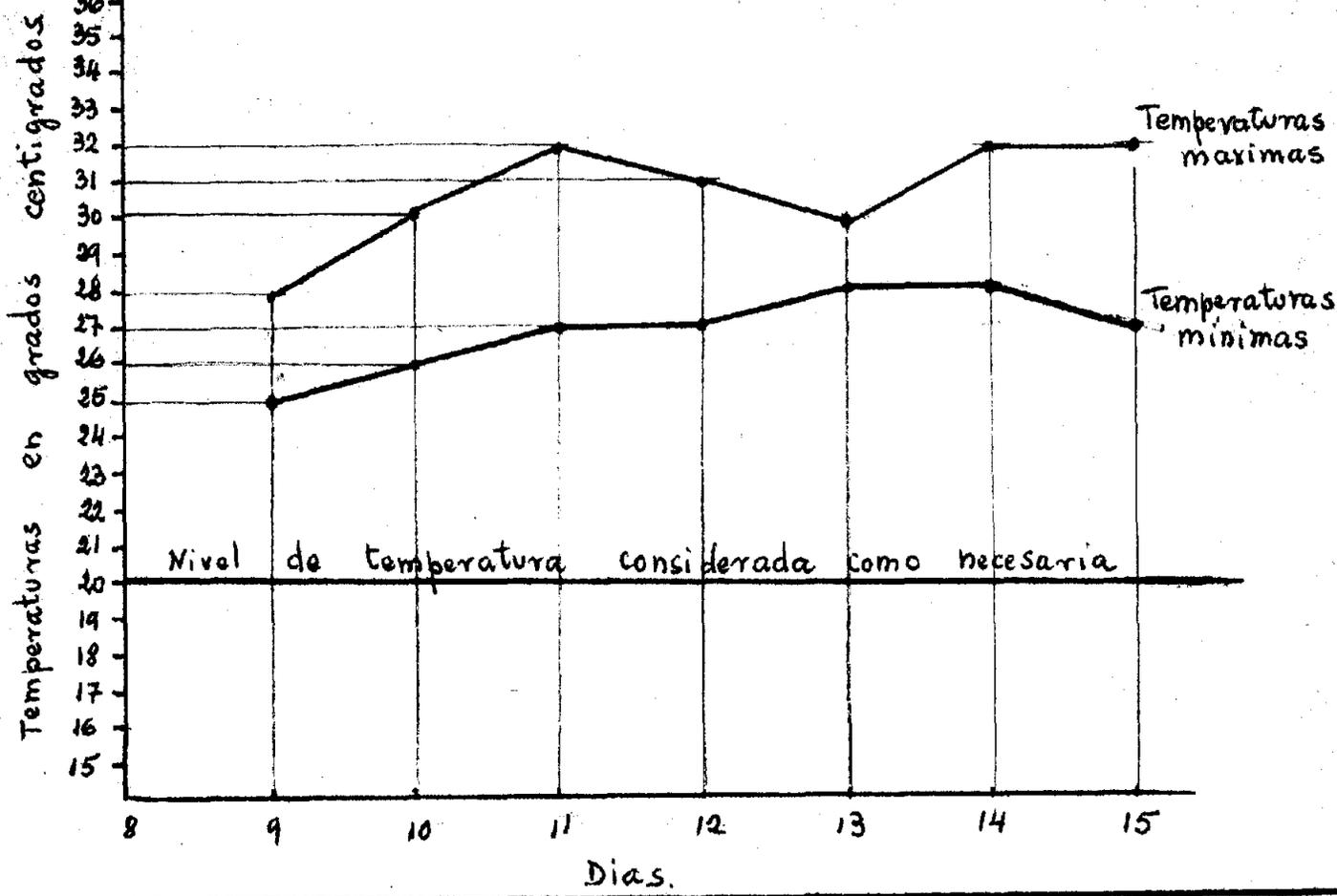
MODIFICACIONES PERSONALES ADAPTADAS A LA TÉCNICA

Ya hemos expuesto anteriormente la esencia de la reacción de Nelson y Mayer (3). La técnica para su puesta en práctica es difícil (17) (64). La primera cuestión que se plantea, es el sostenimiento de la cepa. Gracias a la amabilidad del Prof. Darel, Jefe de los servicios de Laboratorio y Director del Hospital St. Lazare de Paris, pude traer a España unos testículos, congelados a -80 grados, conservados en nieve carbonica, que sirvieran perfectamente para inocular a unos animales ya de antemano preparados a mi llegada al laboratorio. Las bajas temperaturas no modifican en nada la estructura y movilidad del treponema, y se produce artificialmente como una hibernación, pudiendo usarse los testículos en el momento deseado, con solo calentarlos a la temperatura del animal, 37 grados. Nosotros, tenemos siempre en un frigidaire, tambien apertado por la O.M.S. unos testículos ricos en treponemas a -80 g, para su uso en caso de emergencia. Hemos conseguido perfectas respuestas al inocular emulsiones obtenidas de estos testículos despues de haber estado cuatro meses a la temperatura ya referida. Según muchos autores entre ellos los descubridores de tan importante reacción, advierten que para un buen desarrollo e incubación de la orquitis, hace falta someter a los animales inoculados a una temperatura que no exceda de los 20 grados. En nuestro laboratorio disponemos de una habitación previamente construida para este fin, con un climatizador apropiado, pero hemos hecho una serie de experiencias (8), para observar si efectivamente la temperatura influye en las características de la orquitis a desarrollar. Hemos expuesto a los animales inoculados a las temperaturas estivales de Sevilla, con un termómetro de máxima y mínima para el control de temperatura.

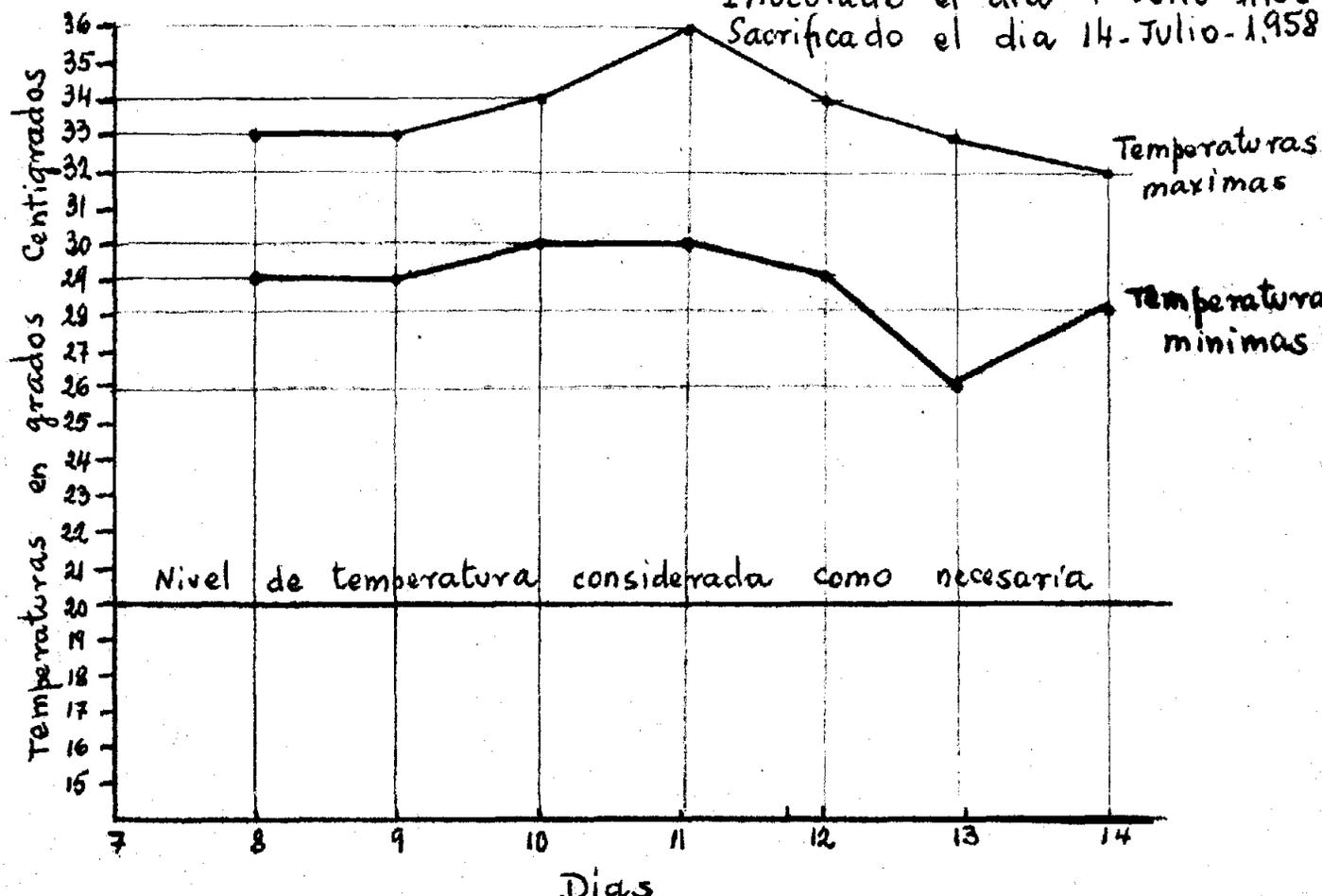
Entresacasmos unos cuantos resultados de todos los obtenidos:

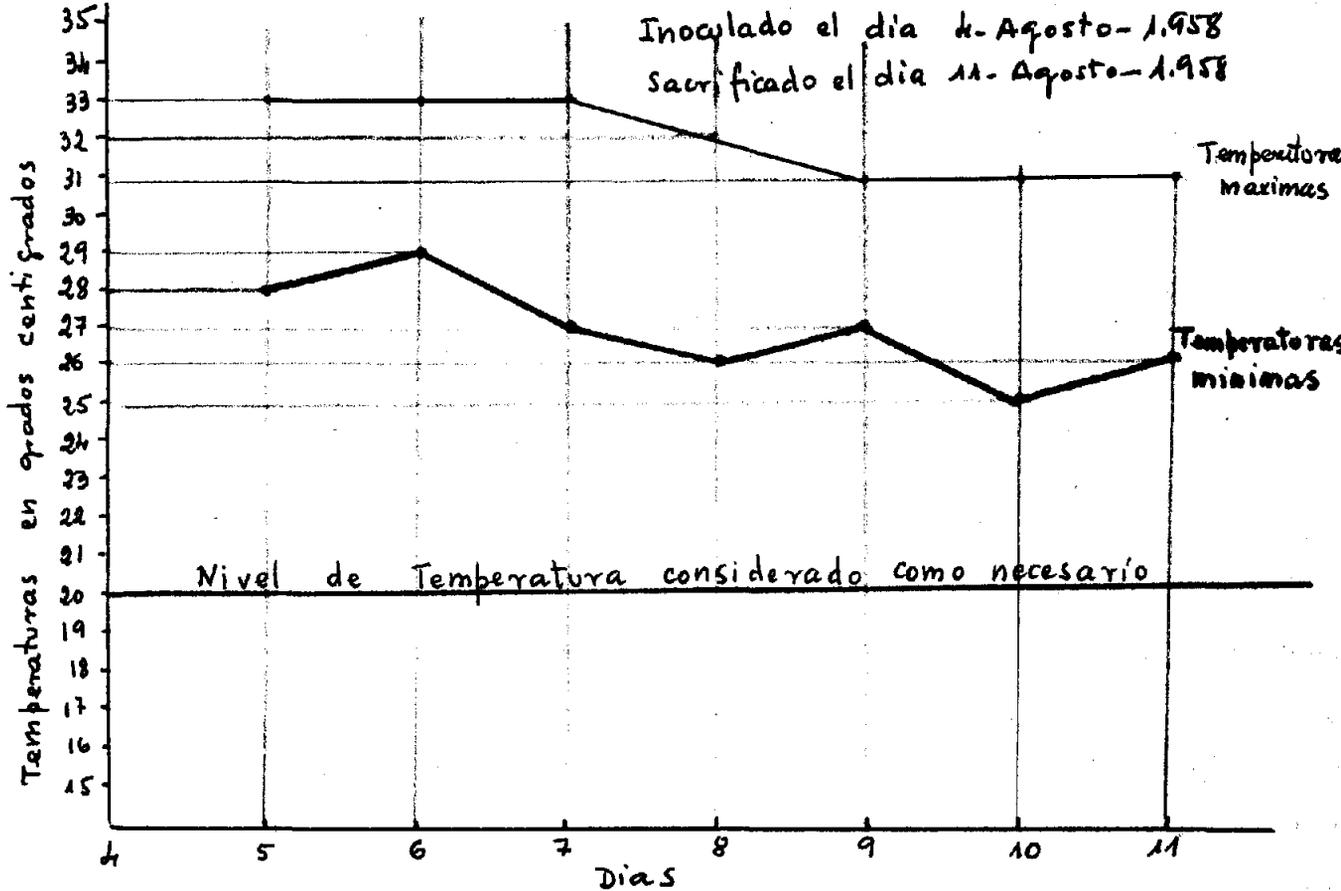


Inoculado el día 8-Julio-1957.
Sacrificado el día 15-Julio-1957.



Inoculado el día 7-Julio-1958
Sacrificado el día 14-Julio-1958





Todos estos animales presentaron una erquitis típica en el mismo tiempo que los utilizados como testigos y que permanecieron dentro de la habitación refrigerada a las temperaturas ortodoxas. La movilidad de los trepanomas fue óptima, no pudiéndose apreciar alteraciones de ningún tipo, respondiendo perfectamente a los siguientes pasos, es decir, el carácter patógeno de la cepa no sufrió menoscabo alguno, creemos pues, que no hace falta ninguna rigurosidad tan acentuada, como suponen algunos autores, en lo que respecta a la temperatura a la que deben estar sometidos los conejos inoculados y que si no es posible disponer de temperaturas que linden con los 20 grados, pueden inocularse animales, a temperaturas superiores, aunque, como es natural, si se dispone de un aparato de climatización es conveniente su uso.

Chacko (6) (51) y colaboradores, han llegado a la misma conclusión en Madras (India), demostrando estos autores, que la incubación de la erquitis es óptima a la temperatura de 35 grados, habiendo verificado 35 pasos en conejos puestos a 35 grados. Por tanto, nuestras conclusiones sobre esta materia, respaldadas por las de Chacko y colaboradores, son fundadas, aunque en nuestras experiencias hemos llegado a temperaturas superiores a las de estos autores. La temperaturas, superiores a 20 grados, no impiden el desarrollo de la

erquitia producida por la cepa Nichols en el conejo, sin que por ello se afecte, la movilidad, estructura, y patogénesis del treponema pallidum.

Otra diferencia que existe entre los diferentes laboratorios practicantes del Test de Nelson y Mayer, es el tiempo de incubación de la erquitia, es decir, el tiempo que ha de transcurrir desde la inoculación del animal hasta el sacrificio. Naturalmente este ha de ser variable, ya que estamos en presencia de una reacción biológica, ya que el organismo del animal no responderá siempre de la misma forma ante la agresión de un germen patógeno que ha entrado en su organismo. Las variaciones están sujetas naturalmente a una serie de factores que son imposibles de regular por nosotros a voluntad, y el tiempo admitido por todos es de seis a doce días. En este tiempo la erquitia debe haberse desarrollado ya que si se llegara a matar al animal en un tiempo superior, nos exponemos a que el organismo del animal tenga tiempo suficiente para producir sus propios anticuerpos antisifilíticos que posteriormente pueden interferir la reacción, no dando entonces resultados satisfactorios. Pero dentro de estas variantes existen como norma general, un número determinado de días que sensiblemente es igual para casi todos los animales de ese laboratorio, quizás por, la influencia del clima, presiones atmosféricas, grado de humedad, que hacen que la suma de todos estos probables factores, un medio ambiente igual para todos los conejos. El sacrificio del animal debe hacerse a los tres días de la aparición de los primeros síntomas de la erquitia sifilítica, y por lo tanto, esa primera sintomatología es la que decide el día exacto del sacrificio del animal. Muchos laboratorios matan al animal a los 8 días de la inoculación, es decir, que si una semana inoculan un lunes, a la semana siguiente lo han de hacer el martes, siempre una semana y un día más. Nosotros, sacrificamos sistemáticamente a los siete días de la inoculación. El Test de Nelson, se practica por sistema en nuestra Laboratorio dos veces por semana: los lunes y los jueves, ya que, sin fallas de ninguna especie, disponemos de conejos con erquitia desarrollada esos dos días. Esto simplifica una serie de inconvenientes, ya que la extracción de los sueros de los enfermos puede hacerse en un día determinado y expedir los resultados en días fijos, pudiéndose citar a los pacientes en las consultas

Con certeza. Pero sobre todas estas ventajas estan las de orden interno del laboratorio, ya que todo el material que ha de intervenir en la reaccion se puede preparar con antelacion suficiente al dia fijado, y en estas circunstancias la esterilizacion de todo el material y el instrumental es naturalmente mas reciente, y no hay que practicar las reacciones en Domingos, ya que esto acarrea una serie de inconvenientes naturales al dia de descanso del personal. Nosotros no hemos experimentado ningun fallo en la incubacion de la orquitis en los siete dias y naturalmente en este tiempo el organismo del animal no ha tenido tiempo suficiente para desarrollar los anticuerpos anti-sifiliticos, a los que anteriormente nos hemos referido. Con esta practica, el Test de Nelson va marchando bien, sin que tengamos quejas de la riqueza, movilidad y patogenicidad del *Treponema pallidum* que disponemos en nuestro laboratorio.

Nosotros inocular en cada testiculo de un animal sano, un centimetro cubico de la emulsion, previamente centrifugado a 2.000 revoluciones por minuto, durante 5 minutos. El numero de *Treponemas* por milimetro cubico se determina poniendo sobre un porta-objetos 0,005 c.c. de la suspension, cubriendola con un cobre de 18 x 18 mm. Se cuentan los *Treponemas* moviles en 25 campos con ocular 10 x 10 y objetivo 40 x. Se mide la superficie de un campo del microscopio con una escala micrometrica cuyo calculo puede servir para siempre, utilizando siempre esta combinacion de optica, con un simple calculo se averigua el volumen de 25 campos. Asi se puede hallar, la riqueza de *Treponemas pallidum* por mm.c. de la suspension. Para la inoculacion utilizamos de 10-40 millones de *Treponemas pallidum* por mm.c. (34).

Ya hemos hablado anteriormente de los graves inconvenientes que desde el descubrimiento del *Treponema pallidum*, por Schaudinn y Haffmann, en el año 1.905, han intentado salvar muchos investigadores, para la practica del cultivo in vitro de este microorganismo, y que hasta la fecha no ha podido conseguirse. Por ello, hace falta el cultivo in vivo, a traves de pasos sucesivos por animales receptivos a este germen. Este grave inconveniente, salvaron Nelson y Mayer con la puesta en practica de un medio de supervivencia en

el cual el *treponema pallidum* es capaz de vivir in vitro un tiempo determinado. Este medio es conocido por el nombre de sus descubridores y es una mezcla compleja de una serie de productos químicos, perfectamente conocidos, y del que mas adelante nos ocuparemos.

El inconveniente fundamental que se presenta al intentar preparar el medio de Nelson y Mayer, es hallar una serie de productos químicos, (54), (75) que no se encuentran en España con facilidad, y algunos de ellos, con una imposibilidad total. Conocedor de este problema durante mi estancia en el Staten Serum Institut de Copenhague, me dediqué a buscar en la biblioteca del referido centro algo que fuese capaz de ponerme sobre la pista de un medio de supervivencia capaz para verificar el Test de Nelson y Mayer a mi llegada al laboratorio de Sevilla, ya que material proporcionado por la U.N.I. C.E.F. llegaría mucho mas tarde a España, y tenía el deseo de poner en practica esta importante reaccion en el menor tiempo posible, y ademas, necesitaba un ~~un~~ medio capaz para inocular la cepa que traia de Francia, ya que necesitaba, en un periodo maximo de doce dias a partir de la inoculacion del animal, hacer la nueva inoculacion. Pero si esta necesidad era perentoria, mas se hizo necesaria cuando me informaron, que no podía pasar ningun animal de un pais a otro sin estar sometido a observacion por los veterinarios aduaneros. Por ello tuve que desistir, ya que en aquel entonces los conejos tenían prohibida su importacion, pues en el pais vecino existia la epizootia conocida por mixomatosis. El personal del Hospital St. Lazare, me dio toda clase de facilidades al conocer todas estas dificultades, y me proporcionaron unos testiculos luteicos, sacrificados el mismo dia de mi salida del pais, y que me traje en un termo, rodeado de nieve carbonica a una temperatura comprobada de menos 60 grados, con la condicion de hacer la inoculacion en un tiempo limite, que expiraba al quedarse sin nieve. Pude hacer el viaje en avion y esto solucionó la primera parte del problema: la rapidex.

En mi busqueda bibliografica pude encontrar una serie de medios de supervivencia entre los cuales pude sacar la esperanza de poder hallar uno, He de citar el de Delacretax (10) (Lausanne) y colaboradores, que precenizan el

medio obtenido con embriones de ratas esterilmente obtenidos, y macerados. Naturalmente este acarrea casi las mismas dificultades. Otros medios encontrados presentaban dificultades parecidas (1 - 59 - 63 - 69). Este preambulo está justificado para explicar el porqué intenté buscar un medio de supervivencia, y la exposición de el, que hago más adelante.

Hemos obtenido resultados excelentes con un medio compuesto por suero de conejo sano y adulto, con una solución salina, mezcladas a partes iguales (5). Hemos utilizado esta mezcla, tanto para la practica del Test de Nelson, como para su inoculación en los animales sanos, y siempre nos ha dado magnificos resultados, tanto es así, que aún después de disponer de material necesario para componer el medio de Nelson, seguimos aún en la actualidad inoculando de un animal a otro, es decir, dando los pases, con esta mezcla de suero de conejo y solución salina.

La obtención del medio la hacemos siguiendo la siguiente pauta:

Tomamos una jeringa esteril de 20 c.c. y previa pelado cuidadoso de la región precordial del animal, y desinfección previa con alcohol yodado, punzamos el corazón del conejo previa localización de este por palpación. Lentamente se extraen los 20 c.c. y se vierten en un tubo de ensayo que esteril. Así punzamos unos 20 conejos, poniendo la sangre de cada uno en un tubo de ensayo diferente sin jamás mezclar la sangre de dos animales diferentes ni utilizar la misma jeringa para más de un conejo. La importancia de esta advertencia, es porque hemos podido comprobar a lo largo del uso de este medio que el suero hemolizado da resultados mucho menos satisfactorios, que el suero sin hemolizar. Una vez obtenida la sangre total, por este sistema, se colocan los tubos de centrifuga a 37 grados, durante dos horas, con el fin de que se forme el coagulo lo más rapidamente posible. En el invierno utilizamos para este fin la estufa de cultivo y en verano, la temperatura ambiente del laboratorio. Centrifugamos después a 6.000 revoluciones por minuto durante un cuarto de hora y de esta forma obtenemos un suero limpio, transparente, y coloración ligeramente amarillenta. Este suero se separa del coagulo del fondo por medio de una pipeta de 10 c.c. esteril, poniéndolo en otro tubo esteril que pasa al baño de María a 56 grados durante una hora para su inactivación. Se deja reposar en nevera unas 24 horas

y entonces con una jeringa mentada con aguja de punción lumbar, disponemos el suero en ampollas de 5 c.c. cerradas a la llama. Estas ampollas son colocadas cinco días seguidos en baño de María a cincuenta y seis grados, con el fin de evitar el desarrollo de algunos gérmenes, que ocasionalmente pudieran haber infectado el material. Siguiendo este método, no hemos tenido que lamentar ninguna infección de un lote de ampollas. Estas ampollas así llenas, se han guardado en nevera a más 5 grados, partíendose las necesarias en el momento de su uso. Ya hemos visto al tratar la sífilis experimental, que los conejos son animales susceptibles de dar reacciones serológicas clásicas (Reacción de Wassermann, Meinicke, Kahn V.D.R.L. etc.) positivas incluso fuertemente, y ello nos acarredó un problema los primeros días, ya que un tanto por ciento muy elevado de los conejos de que disponíamos tenían las reacciones ya citadas fuertemente positivas. Sangramos en primer lugar, todos aquellos animales que tenían estas reacciones negativas y con el medio obtenido a partir de los sueros hicimos las primeras pruebas con un resultado totalmente satisfactorio. En los primeros ensayos ya nos preocupamos en analizar por medio de la reacción de inmovilización del treponema, los sueros obtenidos de conejos con las reacciones serológicas positivas. Los resultados fueron invariablemente negativos, y por ello pudimos pensar con fundamento, que el suero de los conejos con esta positividad no enmascaraba la reacción, ya que los anticuerpos que detectaban las reacciones de Wassermann, Kahn, V.D.R.L. etc. no eran específicos de la lues y por lo tanto difícilmente podían ser nocivos para el treponema pallidum. La utilización continuada de este Medio, nos ha dado a posteriori la razón a nuestros argumentos, ya que nuestras experiencias demuestran que todos los sueros de conejos, sirven para la confección de este medio de supervivencia, siempre y cuando sean esterilmente obtenidos, y no se encuentren hemolizados.

La solución salina fué puesta a punto después de muchos intentos sobre la concentración del cloruro de sodio. Según nuestra experiencia con este medio la óptima es la de nueve por mil. Tomamos un litro de agua destilada y le añadimos nueve gramos de ClNa , Merck, y le esterilizamos a dos atmós-

feras en el autoclave. Medimos el pH, y lo regulamos a 7, en el caso de que ya de por sí no lo sea. Entoncez, los repartimos en frascos previamente esterilizados, que son destapados en el momento de su uso.

Para tener la total certidumbre de la esterilidad de ambos preparados, sembramos en tubos de Agar-Agar, y de caldo, una muestra tomada al azar del suero salino al 9 por mfl, así como una ampolla de suero de conejo, a los tres días de hacer su envase, para dar tiempo al germen infectante, si es que los hay, para desarrollarse. Si todo marcha satisfactoriamente, lo declaramos apto para su uso. Todas estas operaciones las repetimos cuando nos quedan una serie de ampollas del antiguo medio preparado, con el fin de no encontrarnos sin medio en un momento determinado.

Al sacrificar el animal con orquitis sifilíticas manifiesta, procedemos a la inculación, con la técnica que más adelante se indicará, con una mezcla a partes iguales de suero de conejo estéril y sin hemolizar con la solución estéril también de la solución salina al 9 por mfl. Seguimos haciéndolo en la actualidad, como hemos dicho anteriormente, con la misma técnica que al principio, con resultados totalmente satisfactorios. Existen en otros laboratorios por mí visitados, otras formas de dar los pases: Medio de Nelson y sol. salina a partes iguales; suero fisiológico solo, sin adición de ninguna otra sustancia, etc., pero después de haber inculado animales de todas estas formas, he de decir, que la que da mayor número de treponemas y con mejor movilidad es la obtenida con la mezcla del suero de conejo y sol. salina por nosotros usada. Este medio de supervivencia así preparado, es decir, a partes iguales los dos componentes, nos han servido perfectamente para la práctica del Test de Nelson y así hemos podido efectuarlo durante un año en el laboratorio Central del Serología a plena satisfacción.

El comportamiento de los sueros de los conejos existentes en nuestro laboratorio, frente a las reacciones serológicas clásicas, y del que ya nos hemos preocupado anteriormente, fué en todo exactamente superponible al comportamiento de los sueros de los animales adquiridos, de una precedencia para nosotros desconocida. Lo cual venia a demostrar, que todos los animales tienen una positividad inespecífica con los antígenos comunmente usados para las

reacciones de Wassermann y complementarias. Estos resultados llevaron a investigar los anticuerpos de grupo, existentes en el suero de estos animales, y su comportamiento frente al treponema pallidum, y a otro germen muy parecido en su arquitectura antigénica cual es la leptospira, de las cuales pudimos usar, gracias a la amabilidad del Dr. Lázaro.

Sabido es, que muchos cultivos empleados en la práctica corriente de los Laboratorios, para el sostenimiento de las cepas de diversos microorganismos intervino como parte fundamental el suero de conejo, sano, obtenido esterilmente por punción cardíaca. A veces úsase para la inyección en animales, es decir, como vehículo en cuyo seno se encuentran gérmenes en mayor o menor proporción. En ejemplo del primer grupo, son las leptospiras (48) y como ejemplo del segundo tenemos el treponema pallidum como anteriormente hemos visto.

Utilizamos los siguientes lotes de conejos, con el fin de observar su comportamiento frente al treponema pallidum y las leptospiras, (35) con la técnica de aglutinación y cultivo para la segunda y la incubación de la orquitis lústica para el primero.

Primer lote: Suero de conejos seguramente sifilíticos, por haber sido inoculados por nosotros con suspensión de treponemas de la cepa Nichols, y con serología y Test de Nelson positivos.

Segundo lote: Suero de conejos con las reacciones serológicas clásicas para el diagnóstico de la sífilis, pero no sifilíticos por haber estado en contacto nunca con el treponema pallidum, y con Test de Nelson negativo.

Tercer lote: Suero de conejo afecto de mixomatosis, en el periodo terminal de la enfermedad. Estos sueros fueron obtenidos en el cuero de una infección de mixomatosis habida en nuestro Laboratorio. Fueron obtenidos en el periodo terminal de la enfermedad por suponer que si los anticuerpos eran capaces de interferir y destruir a los dos microorganismos en estudio, era de suponer, que en el periodo final, los sueros estarían más cargados de anticuerpos.

Cuarto lote: Suero de conejos que habrían padecido una abscesis estreptocócica con abscesos múltiples.

Quinto lote: Suero de conejos, que no habían padecido ninguna enfermedad,

y con serología negativa, y test de Nelson negativo.

Todos los lotes de sueros dieron las pruebas de aglutinación-lisis negativas, frente a todas las cepas de leptospiras de que disponíamos.

En los cinco lotes de medio de Kortoff-Babudieri preparado con los diferentes lotes de sueros, el crecimiento de las leptospiras fué normal, tanto en número como en motilidad y al mismo tiempo de incubación que normalmente.

Los conejos que dan las reacciones serológicas clásicas positivas sin ser sífilíticos presentan a los 7 a los 10 días de su inoculación intratesticular, una orquitis específica en todo comparable a las que padecen los animales con serología negativa.

En conclusión de estas experiencias, podemos afirmar que las alteraciones observadas tanto en los cultivos practicados con suero de conejo para las leptospiras, no están en relación con la seropositividad falsa de los sueros, y las inoculaciones practicadas con la cepa de Nichols en animales sanos, responden perfectamente, desarrollándose la lesión sin interferencias acahables al comportamiento de los sueros frente a las reacciones de Wassermann y complementarios.

Por ello, nosotros usamos indistintamente conejos seropositivos y seronegativos para la práctica del sostenimiento de la cepa Nichols en nuestro Laboratorio y su uso permite llevar a cabo felizmente la reacción de inmovilización del Treponema.

Antes de llegar a esta mezcla idónea de suero de conejo sano, estéril, inactivado y no emulsificado, con solución salina al 9 por mil, hicimos una serie de experiencias buscando el mejor medio de supervivencia agregándole una serie de productos químicos que resultan indispensables para la vida del microorganismo.

Durante nuestra estancia en el Hospital St. Lazare, confeccionamos un medio que llevaba en su composición suero de conejo, solución salina y Thio-glycolato de sodio en diferentes concentraciones. Estas investigaciones segui-

guinos haciendolas a nuestra llegada a este Laboratorio. Los resultados como puede comprobarse en las gráficas que reproducimos, dan una exacta idea de la bondad de cada uno. El medio de Nelson por nosotros empleado para comparación, era el mismo que se utilizaba en los diferentes días para la práctica del Test de Nelson con resultados satisfactorios, siendo la supervivencia de los treponemas normal al cabo de 48 horas. La supervivencia en el medio con Thioglycolato de sodio no mejoraba la calidad del medio, tanto usando las cantidades utilizadas de este cuerpo químico en el Hospital St. Lazare, como las del Statens Serum Institut, que es este último laboratorio cuatro veces superior al del primero. Por ello hemos usado el suero de conejo sin adimento de ninguna clase. Este medio nos ha dado buenos resultados a lo largo de 150 pruebas de sueros, y se han obtenido resultados siempre acertados, cada suero fué examinado dos veces, en dos días diferentes, con treponemas obtenidos de dos animales diferentes, y siempre se han obtenido resultados totalmente equiparables en las dos reacciones. Además, cuando por causas especiales, no hemos podido disponer del medio de Nelson, como por ejemplo: no disponer de algunos de los reactivos que lo componen, dificultades en el filtrado (de las que más adelante hablaremos) etc., hemos practicado la reacción con este medio de supervivencia quedando igualmente satisfecho de sus resultados. Aún hay más: hemos practicado la reacción con los medios a la vez, y los resultados obtenidos no han discrepado nunca, por lo cual podemos asegurar totalmente que es satisfactorio, pudiéndose usar perfectamente para la inoculación y sostenimiento de la cepa, como seguimos practicándolo hasta la fecha en nuestro laboratorio, y para la práctica de la reacción.

No se nos escapan las críticas a que está sujeto el medio por nosotros utilizado (65). Muchos autores opinan, que la complejidad del medio de Nelson, que son ellos los primeros en reconocer, es necesaria, ya que si es verdad que el treponema pallidum es capaz de sobrevivir en el suero de la

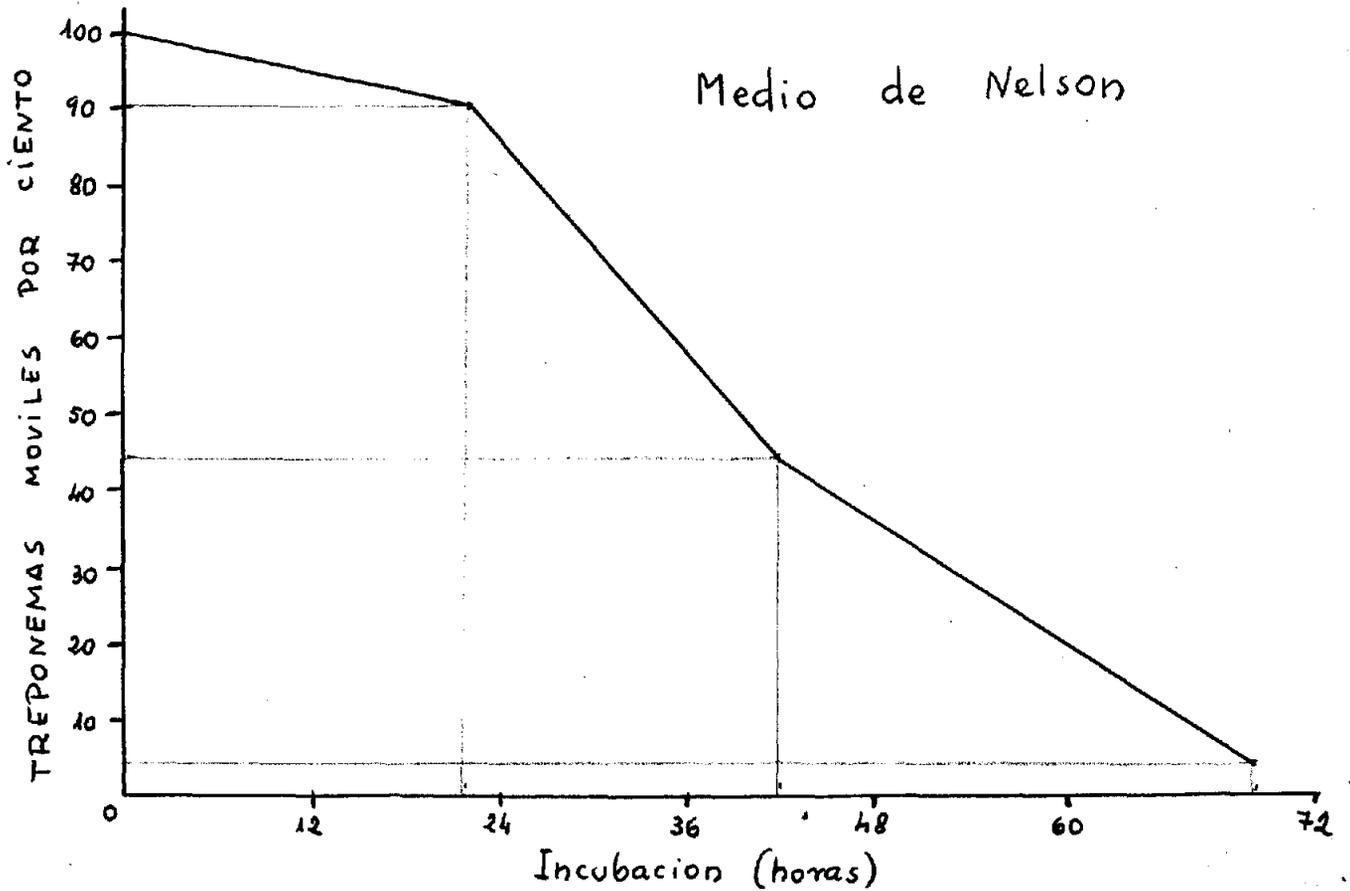
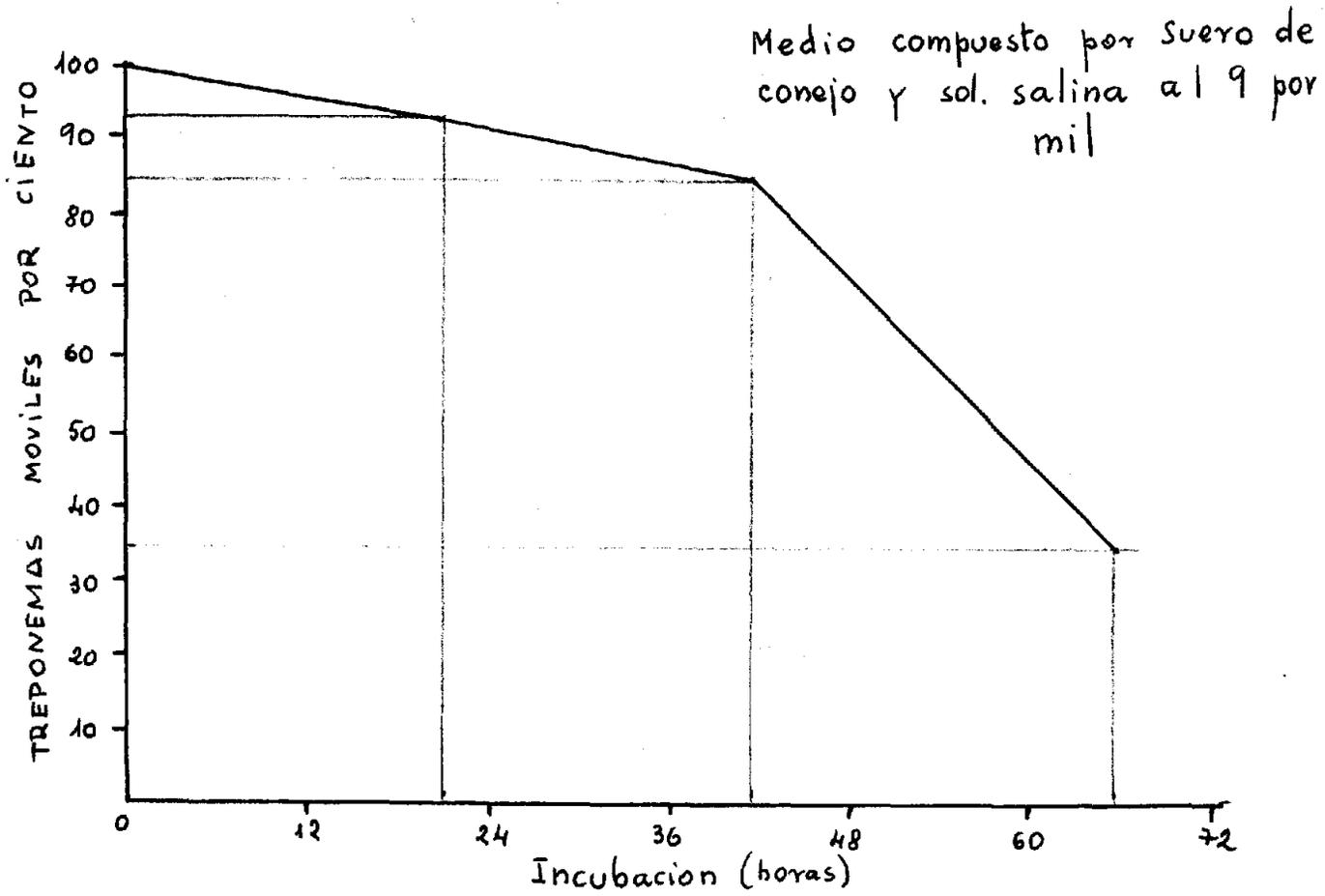
mayor parte de animales de sangre caliente, si se mantiene en atmósfera estrictamente anaerobia, hay que suprimir la mayor cantidad de variaciones o variantes, y por ello el suero de estos animales, no puede ser comparado como medio de supervivencia con el medio de Nelson, y Mayer, ya que este es sintético, compuesto por elementos químicos perfectamente definidos y siempre iguales. Además, es evidente, según estos autores, que las variaciones individuales de los sueros, pueden hacer aparecer substancias letales para el treponema, para los anticuerpos o para el complemento que pueden hacer fracasar la reacción.

Todas estas críticas eran por mi conocidas. El suero humano fué desechado para estas investigaciones, por la dificultad que acarrea su obtención, ya que habría de ser de sujetos sanos, difícilmente de obtener. El suero de que podemos disponer, procede del enfermo hospitalario, sometidas las más de las veces a tratamientos con fármacos treponemocidas, (Penicilina, Bismuto, Cloromicetina, etc), enfermos mal nutridos con un desequilibrio albumino-glubulina frecuente, y por si estas variantes no fuesen suficientes existe un tanto por ciento elevado de sujetos con lisis ignorada con anticuerpos inmovilizantes, totalmente letales para el treponema. De tal manera que un solo enfermo lúctico puede echar por tierra la práctica del Test de Nelson de un día, con las consiguientes molestias secundarias que esto acarrea. Por ello, a nuestro parecer, las críticas a que antes me he referido, son perfectamente achacables a este medio que hipotéticamente pudiera hacerse y que probablemente daría muy buenos resultados unos días, y otros el treponema estaría totalmente inmovilizado a pesar de estar en presencia de sueros negativos.

Fuimos desechando otros sueros y el primero que fué probado se obtuvo del cobaya, que en nuestras manos ha dado un resultado bastante mediocre. La obtención del medio de supervivencia con suero a partir de animales no habituales nos parecía absurdo en el Laboratorio, ya que suponía crearse

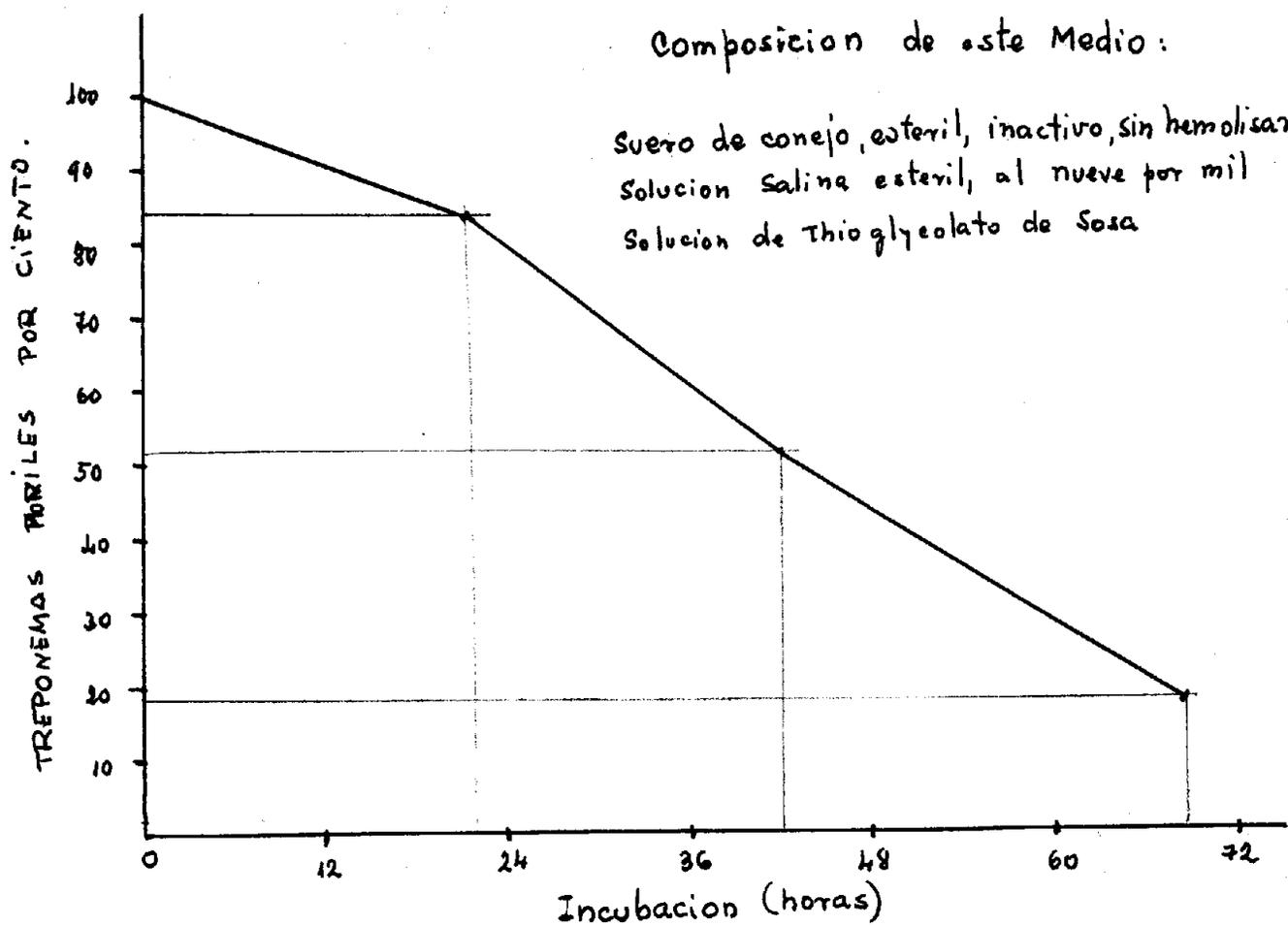
un problema muchas veces insoluble y no apto para el uso en un día determinado. Así pensamos en el suero de caballo, de buey, cabra, gato, perro, etc. Por ello, nos quedamos por exclusión con el suero de conejo. Estos animales son muy regulares como ha podido ser observado a lo largo de nuestras experiencias, si se les somete a una alimentación regular, aseó de las conejeras, separación de los machos y hembras en los diferentes corrales, cuidado especial de las madres embarazadas, cuidado posterior con las crías, etc. Lo fundamental es que el animal está sano y en estas condiciones, las variaciones individuales que puedan aparecer, no dañaran en absoluto, y para nada al *treponema pallidum*. Al largo de dos años de uso continuado, y de once o de cuatro de utilizarlo esporádicamente, podemos asseverar, que los resultados que hemos obtenidos son tan satisfactorios, como los obtenidos son tan satisfactorios, como los obtenidos con el medio de Nelson, y por ello, recomendamos su uso.

Hemos llegado incluso a tomar sangre de animales mixotéticos, en el curso de la epidemia de esta cinestia ya relatada, que padecimos entre los conejos. Ni esta enfermedad es capaz de interferir los buenos resultados a que nos hemos estado refiriendo reiteradamente, y eso que hemos utilizado animales totalmente coqueóticos y cerca de su muerte. Nos propusimos añadirle toda serie de inconvenientes al medio que hemos descrito, para comprobar si podría resistir a las críticas que sabíamos habían de venir, y solo podemos decir que por nuestra parte lo hemos encontrado satisfactorio y a los resultados no hemos de remitir forzosamente.

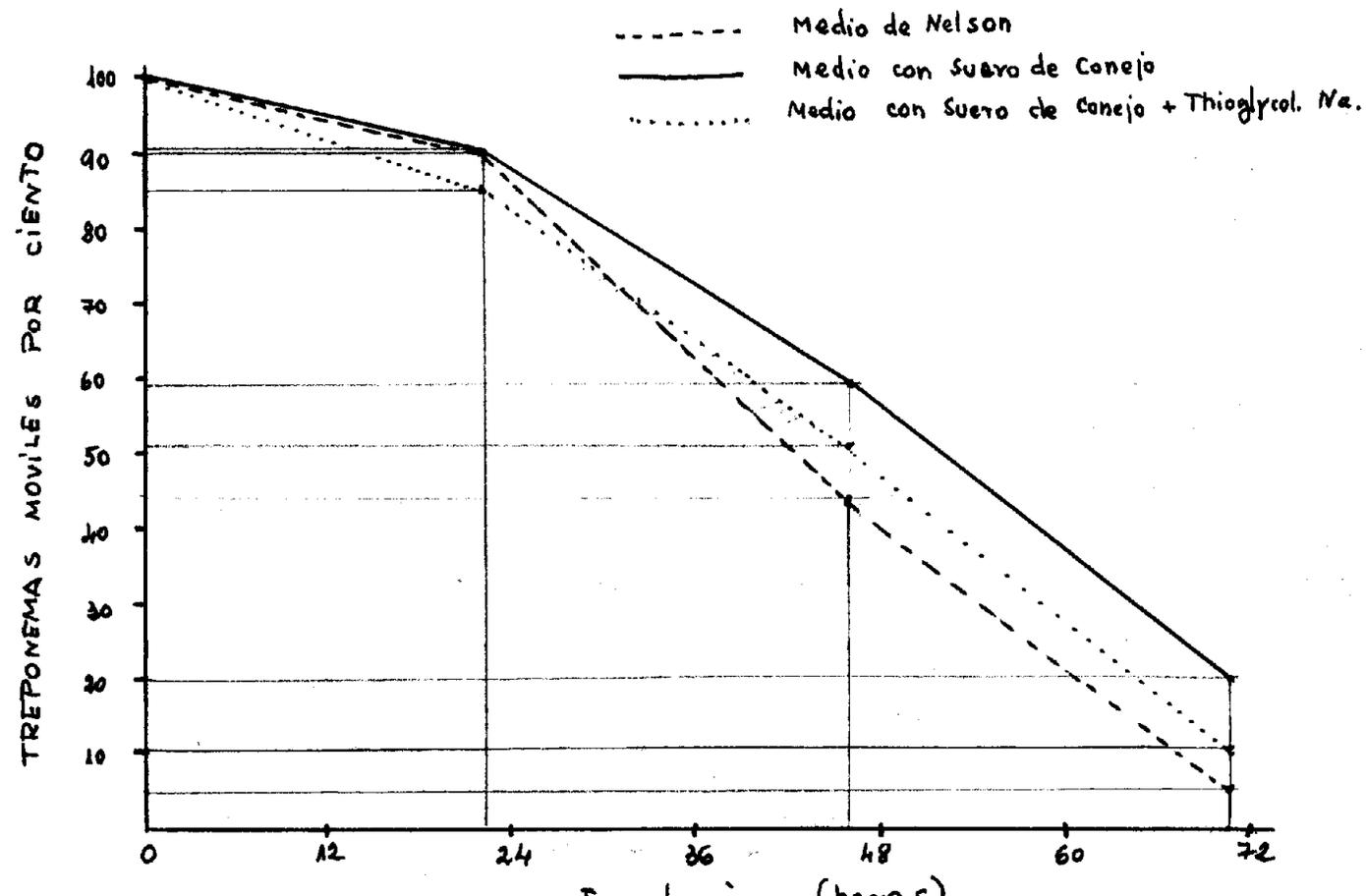


Composicion de este Medio:

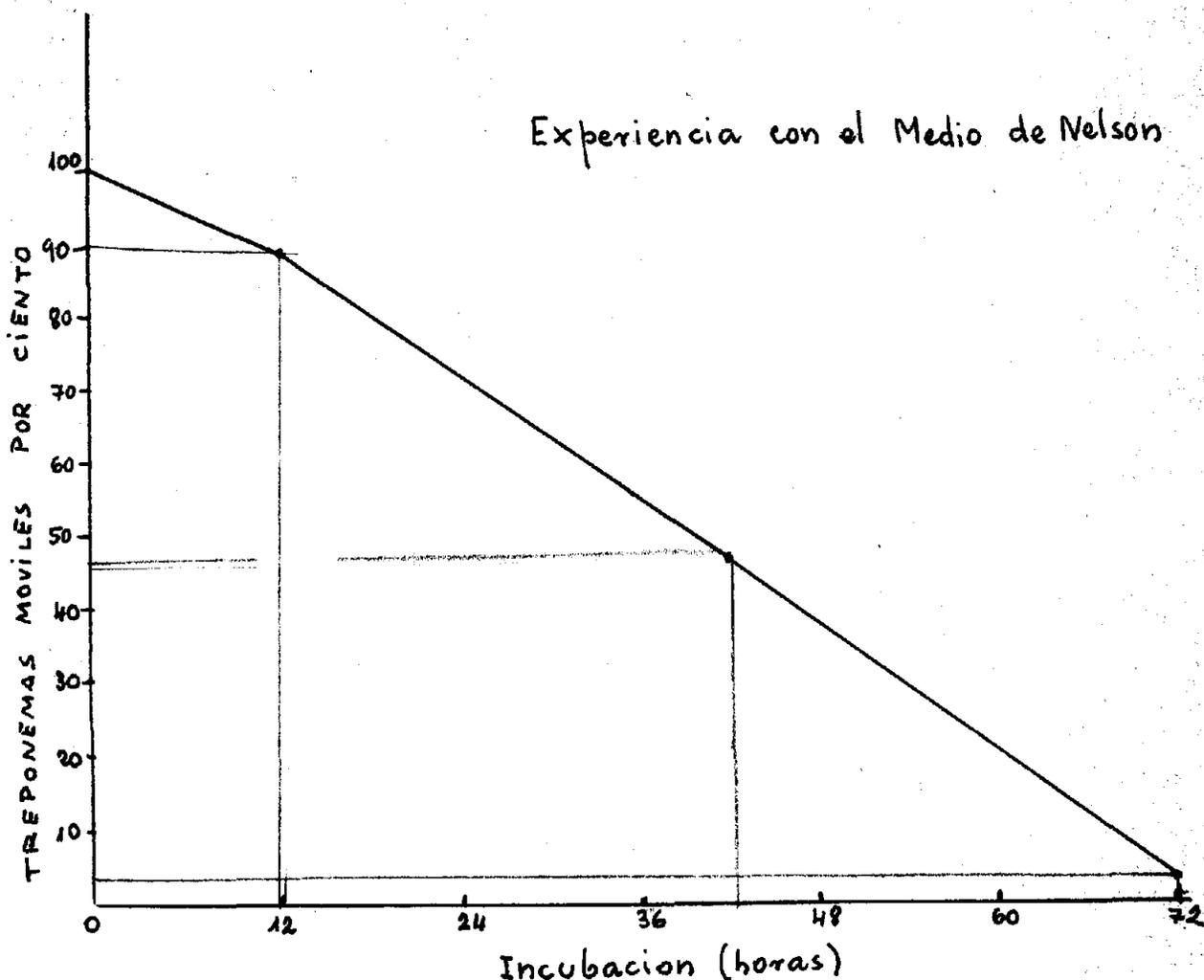
Suero de conejo, esteril, inactivo, sin hemolizar = 10 c.c.
 Solucion Salina esteril, al nueve por mil = 99 c.c.
 Solucion de Thioglycolato de Sosa = 0.1 c.c.



VALORES MEDIOS HALLADOS EN TODOS LOS PROTOCOLOS.



Experiencia con el Medio de Nelson



Un progreso enorme verificado por Nelson y Mayer, en lo que respecta a la supervivencia de los treponemas, es la utilización de una atmósfera en la que queda excluida casi por completo el oxígeno, totalmente letal para la espiroqueta de Schaudinn y Hoffmann. Es conocido por todos los que practican el Test de Nelson el caso curioso que sucedió en París, ya que por un error de transcripción de la técnica de la reacción que dió el propio Nelson, fué exigida una bala que tuviera CO₂ y N₂ en proporción de 95 y 5% respectivamente, con un contenido máximo de 0,4 % de oxígeno libre y puede verse que la supervivencia era mejor en el medio puesto en la primera atmósfera. Nosotras hemos solicitado a la Sociedad Española de oxígeno a nuestra llegada a ésta, una bala de gas con las siguientes proporciones: CO₂

95 % , H₂, 5 % y una máxima de 0,05 % de oxígeno libre. Nos lo sigue con 0,02 %, cantidad insignificante que no es capaz de matar al treponema. El gas que contiene una cantidad superior de oxígeno, hay que hacerle pasar por un tubo de cuarzo, relleno de virutas de cobre y puestas al rojo. Este cobre retiene el oxígeno, y purifica la mezcla, regenerándose a posteriori el cobre haciéndole pasar a su través una corriente de hidrógeno, con los peligros consiguientes que esto puede acarrear. Nosotros disponemos de los diferentes aparatos necesarios para la instalación referida, pero no la hemos necesitado. Cada vez que recibimos un tubo de menola, y una vez por semana, hacemos el análisis del gas para comprobar que el contenido en oxígeno sigue siendo el óptimo. Para ello hacemos pasar el gas por un tubo que contiene una solución de sosa al 5 por ciento. Hacemos que burbujee 5 minutos aproximadamente, y entonces, sin retirar la espita por donde sale el gas, añadimos una pequeña cantidad de Pirogárol (ácido pirogálico). Este producto tiene la particularidad de reducirse rápidamente en contacto con el oxígeno, pasando de un color blanco, a un negro fuerte. Si el color de la solución de sosa, permanece inalterable, damos por buena la mezcla de gas. En caso contrario mandamos traer una nueva baía.

En la práctica corriente de la recolección de la inmovilización del treponema usamos el Medio de Nelson y Mayer, (46), aunque en ciertos casos, ya citados anteriormente, utilizamos el anteriormente referido. El medio de Nelson lo hacemos instituyendo algunas variantes, con respecto al de otros laboratorios, y nos es posible usarlo, por el envío de los materiales que lo componen por la U.S.I.C.E.F. nosotros preferimos hacer una cantidad determinada, suficiente para cuatro reacciones, a que según nuestras observaciones, si una vez preparado se p-

ne a una temperatura de -20 grados, se conserva durante un mes aproximadamente. Estamos en desacuerdo, con los que opinan que el medio a estas temperaturas bajas se mantiene inalterable durante más tiempo, ya que hemos observado, que la supervivencia del treponema se va haciendo cada vez menor a medida que pasa el tiempo, y en cambio mantiene toda su potencia al cabo de un mes aproximadamente. El método seguido en otros laboratorios, de su preparación exclusivamente para el día, nos parece una tarea ardua, pudiéndose simplificar. Por los tanto preferimos hacer una cantidad determinada, envasándolas esterilmente, evitando así los inconvenientes observados con la utilización de las otras formas de preparación por nosotros conocidas. Obtuvimos así una buena supervivencia, en la que se limitan al máximo las posibilidades de contaminación, ya que al preparar el medio cada vez que se va a hacer el Test, supone el empleo de mucho material, y aumenta la posibilidad de contaminación del medio que si se usa menos.

Así pues se preparan de cada vez 80,4 cc. en total. Pesamos los productos químicos puros, y en un mortero, mezclamos todas las sustancias sólidas, añadiéndole agua bidestilada. Una vez homogeneizada la mezcla, le añadimos la solución de cloruro de sodio previamente preparada, y el ultrafiltrado de suero de buey. Las cantidades son las siguientes:

| | | |
|---|---------|--------|
| Albúmina seca de buey (V fracción de Conn) | 2 | gramos |
| Sodium thioglycollate | 0,2,16 | " |
| L-Cysteine Hydrochloride | 0.01587 | " |
| Glutathione (Reduced) | 0.064 | " |
| Sodium Pyruvate | 0.0124 | " |

| | | |
|--|----------|--------|
| Bicarbonato de sosa (Marok) | 0,0569 | gramos |
| Tampón (phosphate disodique + phosphate mono- potassique) | 12,52 | c.c. |
| Serum ultrafiltrante | 5 | c.c. |
| Cloruro de Sodio al 0,85 % | 46,66773 | c.c. |
| Agua destilada | 13,9191 | c.c. |

A toda esta mezcla le añadimos 80 miligramos de Estreptomicina, único antibiótico de que disponemos, que no ataca al *treponema pallidum*; así evitamos en lo posible la contaminación eventual del medio.

Una vez que tenemos el medio de supervivencia preparado, se ha de esterilizar. Hay que rechazar los aparatos destinados a este fin de que disponemos habitualmente en los laboratorios, ya que todos actúan por el calor y en estas condiciones los productos que integran el referido medio, pierden su actividad y se estropean. Por ello recurrimos al filtrado. Este filtrado, fué uno de los grandes inconvenientes con que tropesamos para la puesta en marcha de la reacción con el medio de Nelson y Mayer, inconveniente que conseguimos salvar en la primera época del funcionamiento del laboratorio, con el uso del suero de conejo como medio de supervivencia. La albúmina de buey a la concentración necesaria, tenía el inconveniente, que inutilizaba los filtros de porcelana por nosotros recibidos, y sólo conseguimos filtrar una tercera parte del total del medio preparado; la albúmina producía un verdadero taponamiento de porer de los filtros y los hacía inservibles. Intentamos esterilizar por separado la albúmina, haciendo pasar por el filtro de porcelana todos los reactivos y esterilizar la solución de albúmina de buey en agua destilada, por medio del calor, introduciendo el tubo de ensayo que la contenía, al baño de María a 56 grados, durante una hora, repitiendo este calentamiento en días

sucesivos hasta un total de cinco. Después mezclábamos todo y lo utilizábamos. Esta técnica no nos dió óptimos resultados, y pudimos observar, que a pesar de permanecer en nevera a -20 grados, perdía eficacia el medio con el transcurso de los días, y el tanto por ciento de la nevilización del treponema era cada vez más bajo, por lo que tuvimos que reemplazarlo. Probamos a regenerar los filtros con una serie de productos químicos sin obtener resultados satisfactorios. Se hizo una solución de permanganato de sodio al 5 %, introduciendo los filtros hasta que el líquido los cubría totalmente; la decoloración posterior la hacíamos con una solución de ácido oxálico. Previo fuerte lavado y filtrado de los mismos con agua destilada, pasábamos a su uso. Si por este medio quedaban a pesar de todo restos de ácido oxálico, no pudimos comprobarlo (pH del líquido filtrado, 7), pero el treponema no conseguía sobrevivir en este medio así preparado, el tiempo suficiente como para llevar a feliz término la reacción. En la actualidad hemos conseguido resultados inmejorables con las bujías de Chamberlan, del tipo L-5, regenerándolas con solución salina al 0,85 %. El medio se filtra con estas bujías rápidamente. Enseguida de finalizar llenamos la bujía de la solución salina ya referida, y se deja a la temperatura del laboratorio. Cuando al día siguiente ha filtrado toda la cantidad, se vuelve a llenar, haciendo esta operación diariamente hasta su nueva utilización. Cuando va a tener lugar, se secan bien en estufa y se colocan en el autoclave a 2 atmósferas durante 30 minutos, y en estas condiciones se procede al filtrado del medio, regenerándola nuevamente de la misma forma descrita. Una vez que tenemos el medio de Nelson y Mayer, ya estéril, lo disponemos en frascos de 100 c.c. previamente esterilizados en la estufa a 180 grados en cantidad de 20 c.c. en cada uno. Se ponen entonces a -20 gra-

dos, en nevera, hasta el momento de su uso. Hemos adquirido la costumbre, de sembrar el medio de Nelson en medios de cultivos apropiados, egroborar la esterilidad del medio así preparado y tomamos un centímetro cúbico, para un tubo de agar-agar, y otro centímetro cúbico para un tubo de caldo-agar. A los cuatro días, se toman unas muestras y se analizan al microscopio previa coloración. Siempre hemos podido utilizar el medio, no habiendo que lamentar ninguna infección que lo haya hecho inservible.

Existen una serie de factores, que según nuestras experiencias, son fundamentales para la buena marcha de este medio de Nelson. A lo largo de los años de su uso, hemos ido dando soluciones, a una serie de problemas que por pequeños que parezcan al principio, redundan en el buen funcionamiento del Test. La primera sobre la que hay que llamar la atención, es que el agua destilada sea de buena calidad. Es totalmente inservible la obtenida con aparatos de cobre, como generalmente se usa en el comercio. Hemos tenido que preparar un destilador, en el cual destilamos el agua para este uso, quemando las sustancias orgánicas con un poco de permanganato. Una vez obtenida el agua, la redestilamos, y así pudimos esquivar, una serie de fallos observados al principio. El agua destilada, ha de tener un pH de 7, y con este agua, hacer la solución de cloruro de sodio, que hay que añadirle al medio. En el momento de hacer el medio, preparamos la solución salina al 0,85 %.

El bicarbonato de sosa, ha de ser, según nuestras experiencias de buena calidad. El thioglycollate de sosa, ha de estar en buenas condiciones. Este producto es poco estable y por ello requiere una conservación especial. Se reduce muy fácilmente, y este cuerpo químico, es el culpable de una serie de anomalías habidas en distintos laborate-

rios que practican el Test de Nelson. El thioglycolate de Na. es un producto de color blanco, que al contacto con el aire pasa rápidamente a amarillento, desprendiendo un olor característico por liberación del grupo SH₂. Para evitar este inconveniente se conserva en un desecador, al que se le ha extraído previamente el aire, sustituido por la mezcla del gas de carbónico y nitrógeno usado para el Test, y permaneciendo a la temperatura de + 5 grados en un refrigerador.

La conservación de los productos en nuestro laboratorio es como sigue: inmediatamente después del uso de cualquiera de los frascos que contengan las sustancias, se parafinan los tapones. Entonces colocamos en el desecador junto al thioglycolate ya referido, el glutatión, la cisteína y el piruvato. El cloruro de sodio y el bicarbonato de sodio, se colocan a 37 grados en estufa de cultivo. La albúmina de buey, permanece en nevera a + 5 grados igual que el ultrafiltrado en atmósfera normal.

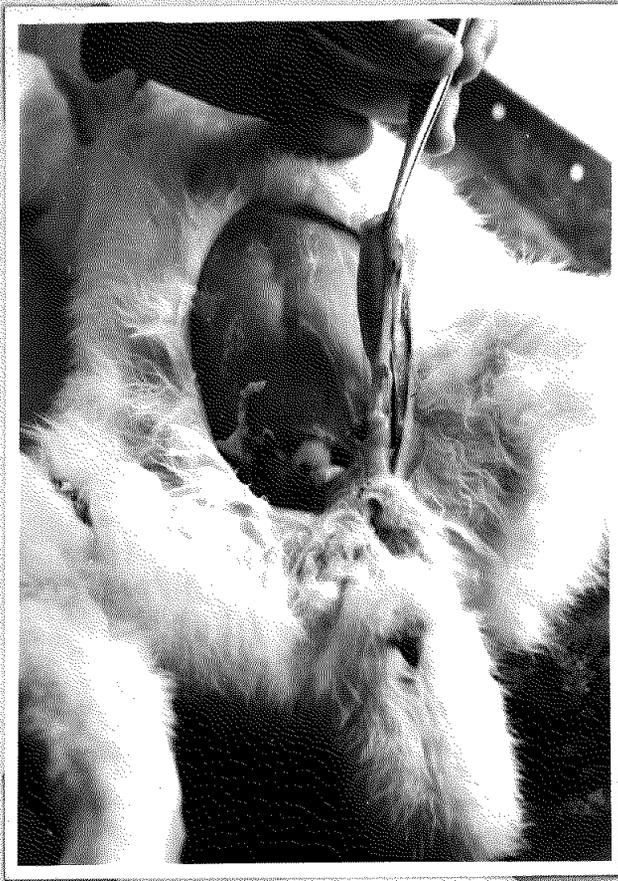
Tenemos pues, la reunión de factores que van a componer el Test de Nelson y Mayer, y por lo tanto podemos pasar a la práctica mecánica del mismo.

El conejo inoculado con antelación desarrolla una orquitis sífilítica, con abundante treponemas en los testículos. Se sacrifica el animal, por punción cardíaca, previa anestesia éterea, pareciéndonos mejor este medio que el utilizado en otros laboratorios (inyección de 50 c.c. de aire en la vena marginal de la oreja, corte de la carótida, etc.) Entonces se coloca el animal en una bata y se le hace una incisión en la piel del abdomen en la línea media, sin lesionar el peritoneo. Se obtienen los testículos en la parte baja de esta incisión, por el conducto inguinal y se colocan en una cápsula de Petri esterilizada. Se limpian los testículos de todo lo que no sea tejido noble y se parten en peque-

Primer tiempo necesario para la extraccion de los testiculos si filiticos, practicando una incision media, respetando el peritoneo.



Segundo tiempo: liberacion del testiculo izquierdo, por incision del conducto inguinal correspondiente.



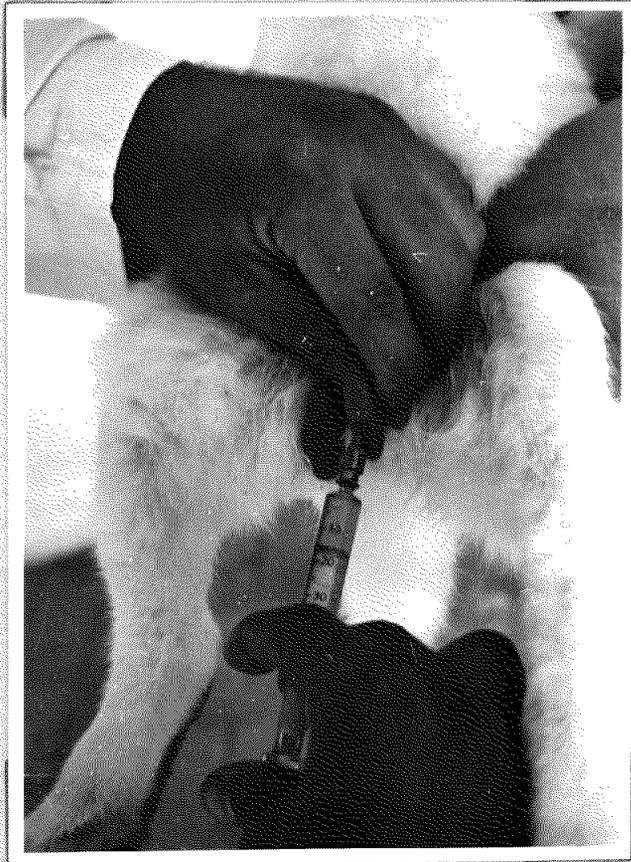
Tercer tiempo: liberacion del testiculo derecho, abriendo el conducto inguinal del mismo lado.



Una vez extraidos los testiculos, se colocan en una capsula de Petrix esteril, cortandolo en rodajas, como representa el inferior. El otro testiculo se ha fotografiado entero.



Matraz, provisto de llave y tapon esmerilado, donde se procede a cambiar el aire, por la mezcla de CO_2 y N_2 . Una vez hecho esto, se agita el matraz con los testiculos y el liquido elegido, durante quince minutos



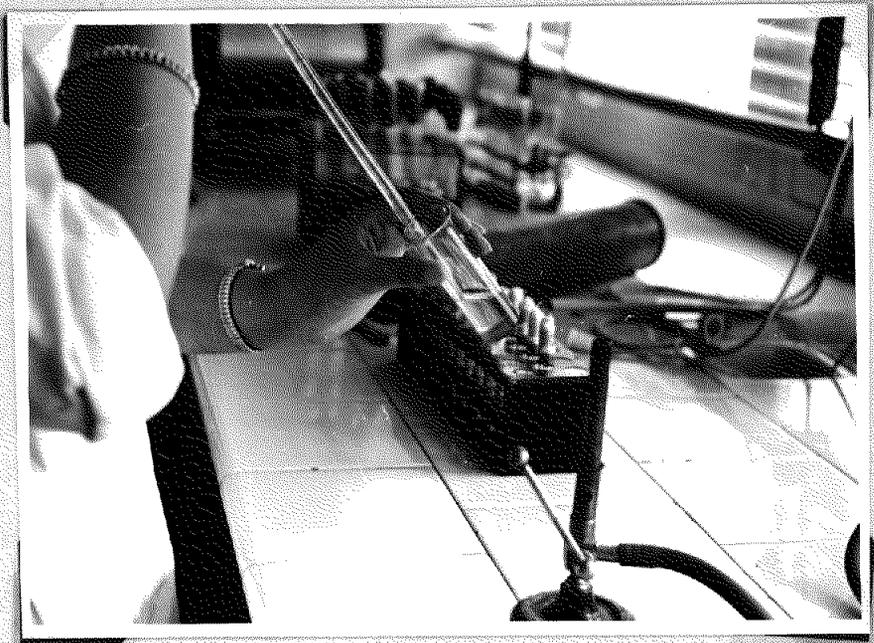
Inoculacion intratesticular de la emulsion de treponemas. Inyectamos un centimetro cubico en cada testiculo

Las rodajas. Así preparados, se ponen en una matras de 250 c.c. provisto de un tapón-llave esmerilado: para el mejor ajuste se embadurna con un depresor de lengua de madera esteril con vaselina también esterilizada y se le añaden 3 centímetros cúbicos de suero de conejo obtenido como ya ha quedado relatado y 3 centímetros cúbicos de solución salina al 9 por mil. Se le hace el vacío y se llena con la mezcla de gas. Se agita así, a la temperatura ambiente durante un cuarto de hora. Hemos introducido una modificación en este punto, en la técnica usada por los demás laboratorios. Preferimos siempre hacer la extracción de los treponemas del testículo para inocular, ya que entonces se necesita una mayor riqueza, y por ello espesamos por la inoculación. La mayoría de los laboratorios, prefieren primero poner los testículos en contacto con el medio de Nelson para la práctica del Test, y después hacer una extracción fuerte, poniendo el matras en un aparato de Kahn, y obtener así el material para inocular. Otros laboratorios, usan un testículo para inocular, y el otro para la práctica del Test. Creemos que lo más importante es el sostenimiento de la cepa, y por ello supeditamos todo a este fin, y así, usamos ambos testículos bañados en el líquido ya citado, obteniendo una emulsión con una cantidad de treponemas que nos asegura por completo la continuidad de la cepa Nichols. Después de agitar fuertemente, sacamos el líquido del matras, previa apertura de la llave del tapón con una pipeta estéril de 10 centímetros cúbicos y ponemos el medio de Nelson en la cantidad de 20 centímetros cúbicos que previamente se ha sacado del frigidaire que lo mantenía a -20 grados, y ya llevado a temperatura de 30 a 35 grados. Hacemos nuevamente el vacío del matras, e inoculamos el gas, carbónico y nitrógeno. La emul-

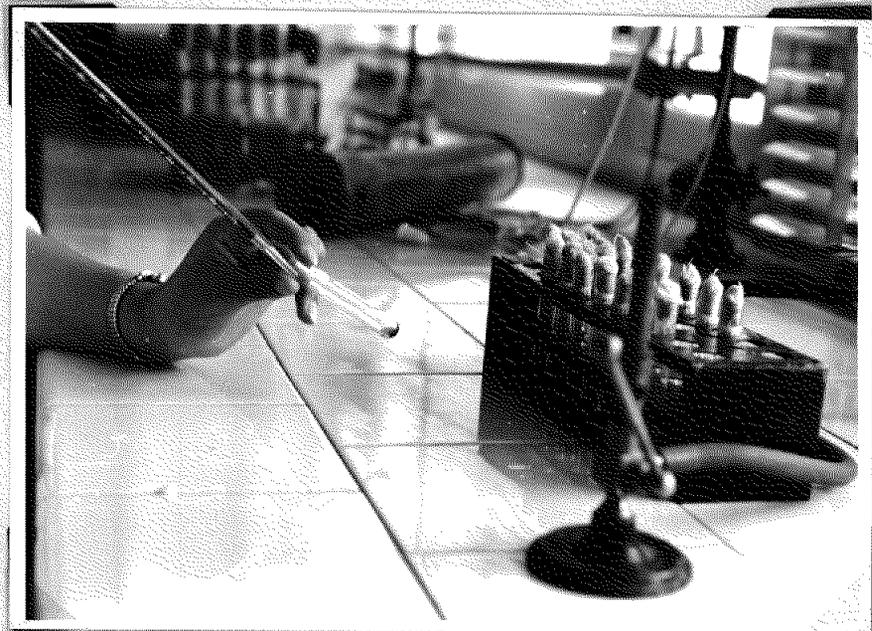
sión de treponema obtenida anteriormente (suero de conejo, solución salina al 9 por mil, y treponemas), se centrifuga a 2.000 revoluciones por minutos durante cinco, y de aquí se toma una gota, que se coloca entre porta-objeto y cubre, y se mira al microscopio con condensador de fondo oscuro. Si la riqueza es óptima, se procede a la inoculación de un centímetro cúbico en cada testículo de un animal sano, que se sacrifica a los siete días, si algún factor no impide el buen desarrollo de su orquitis. Nosotros preferimos inocular esa cantidad a pesar de que se prexioniza solamente medio centímetro cúbico, por haber podido observar que así da resultados óptimos y se obtienen orquitis con una riqueza en treponemas, superior a las obtenidas con el otro método.

Después de esperar diez minutos, obtenemos con una pipeta estéril de 20 centímetros cúbicos el medio de Nelson, del matras (segunda extracción de treponemas) y se centrifuga a 5.000 revoluciones durante diez minutos. El líquido sobrenadante, exento de hemáticas, espermatozoides, restos de tejido etc. se mira al microscopio con la misma técnica anteriormente citada, y buscamos la concentración óptima, que es de cuatro por campo aproximadamente con ocular 10 x 10 y objetivo de 40. En el caso de que haya más treponemas, diluimos con nuevo medio de Nelson, y en el caso de que no los haya, vertemos nuevamente el líquido en el matras que aún contienen los testículos, y hacemos una nueva agitación. De esta forma queda preparado el antígeno, que es por lo tanto una emulsión de treponemas, perfectamente móviles y fácilmente perceptibles al microscopio.

Cuando, para obtener este antígeno o emulsión de treponemas, utilizamos el suero de conejo diluido a partes iguales con solución salina



En la fotografía superior, se esta tomando 0,35 c.c. de emulsion de treponemas, del liquido sobrenadante del centrifugado, del medio de Nelson que ha estado en contacto con los treponemas. La cantidad antes expresada, se añaden los tubos de la prueba que contiene previamente el complemento y el suero del enfermo, momento que esta representado en la fotografia inferior.



na al 9 por mil, en vez del medio de Nelson, se hace exactamente igual, con la única salvedad, de que al obtenerlo se ha de centrifugar con más rapidez y durante más tiempo: nosotros centrifugamos quince minutos a 4.000 revoluciones ya que hemos observado varias veces, que al permanecer posteriormente en la estufa a 35 grados durante 22 horas, si queda algo en un tubo, de testículo, alguna partícula que haya podido ser absorbida por la pipeta, el líquido entere se coagula.

Para obviar esta desagradable dificultad, basta con seguir la técnica descrita anteriormente. Hemos observado, que el pequeño resto de suero de conejo que puede quedar en matras, no impide en absoluto la reacción, al añadirsele el medio de Nelson, ya que es tan pequeña, la cantidad que queda, que practicamente es despreciable. No obstante esto, entre una y otra adición de líquido a los testículos bañamos este con solución salina estéril.

Ya tenemos pues el antígeno. Como estamos en presencia de una reacción antígeno-anticuerpo complemento, nos faltan aún, estas dos últimas fracciones del complejo. El anticuerpo se obtiene, por función venosa de la flexura del codo del enfermo cuyo suero se desea analizar. Ha de ser obtenido con absoluta esterilidad, y para ello se utiliza jeringa estéril, naturalmente seca, y previa buena desinfección de la zona elegida para la punción. Es recomendable que el enfermo, llegue en ayunas al sitio de la extracción ya que un suero quiloso, dificulta mucho la marcha normal del Test. Es muy conveniente que el suero se obtenga sin hemolizar. Nosotros obtenemos la sangre, y la colocamos en un tubo estéril seco, esperamos una hora, hasta que el coagulo empieza a retraerse y entonces centrifugamos. Para favorecer la coagulación colocamos los tubos de los diferentes enfermos, en estufa a 37 grados

en invierno, y a la temperatura ambiente en el verano, y al cabo de cierto tiempo centrifugamos durante quince minutos a 5.000 revoluciones y obtenemos así un suero perfectamente claro. Este suero es recogido con pipeta, y puesto en tubos, que se llevan al baño de María a 56 grados para su inactivación; aquí permanecen por espacio de medio hora.

El complemento o alexina, es obtenido mediante punción cardíaca de cobayas, con jeringa seca y estéril. Nosotros hacemos una pool, de los sueros obtenidos de por lo menos 20 animales, para así estar seguros que la tasa, es siempre lo más uniforme posible. Para la extracción de este complemento, usamos la misma técnica que se describió para la obtención del suero de conejo que antes queda referido. La mitad de este suero así obtenido, es inactivado a 56 grados durante media hora, quedando la otra mitad activo. Preferimos obtener el complemento el día anterior al de la práctica de la reacción ya que se ha demostrado, que la mayor actividad de éste, es a las 24 horas aproximadamente de su extracción.

Para cada suero a examinar, es decir, para cada enfermo, colocamos dos tubos de 12 por 75 m.m., uno que denominamos problema, y otro que va a ser el testigo. El primero va a recibir, 0,05 c.c. de suero de enfermo inactivado, 0,10 c.c. de complemento activo, y 0,35 c.c. de la emulsión de treponemas. El testigo, recibe: 0,05 c.c. del suero inactivado del enfermo a examinar, 0,10 c.c. de complemento inactivo, y 0,35 c.c. de la emulsión. En estas circunstancias la única diferencia que existen entre ambos tubos es que en uno existe complemento para (activo) y en el testigo, prácticamente no existe. (Inactivo). Es muy importante este testigo, ya que es llamado poner de manifiesto cualquier



Los tubos conteniendo el suero del enfermo, la emulsion de treponemes y el complemento, se colocan en desecador donde quedan 22 horas en la estufa a 35 grados, previo vacio y haciendo llegar, la mezcla de CO₂ y N₂.



Bujias para filtrar el medio de Nelson y dispositivo completo, usando una matraz Kitasato, tal y como lo usamos en nuestro laboratorio.

anomalía que puede existir en el suero, anomalía totalmente ajena al anticuerpo inmovilizante que pudiera existir. La lectura del Test, posteriormente explicada ha de supesarse por el tubo testigo; y en este, los treponemas estan en perfecta condiciones de movilidad, la prueba es satisfactoria, pero sin este tubo los treponemas están inmovilizados, como este tubo practicamente no lleva complemento, la inmovilización no es especifica y entonces la prueba de este tubo determinado no es utilizable ya que esto demuestra que existe algo en el suero que mata al treponema, dandose caso frecuentes de este tipo cuando el enfermo se ha puesto con antelación algún medicamento treponemicida, como la penicilina, neo, bismuto, etc. En estas circunstancias es imposible discriminar, si en el tubo problema aparecen los treponemas inmóviles si es debido a la presencia de anticuerpos inmovilizantes reales, o es debida a la presencia de la sustancia tóxica para el treponema. En estas circunstancias hay que rechazar la muestra y hacer venir al laboratorio nuevamente al enfermo, para una nueva extracción, una vez pasado el tiempo necesario para la total reabsorción del medicamento causante de esta anomalía. Por ello, nosotros recomendamos el envío del enfermo, a los quince dias cuando menos de la última administración de cualquier producto químico, y sistemáticamente se lo pregunta al enfermo, antes de la extracción de la sangre, si está sometido a algún tratamiento específico.

En caso negativo, procedemos a la toma de sangre, y en el contrario citamos al paciente, quince dias aproximadamente de la última administración. No obstante, podemos intentar destruir la penicilina que se encuentre en el suero del enfermo, adicionando penicilinasas,

(42) (21), pudiendo así llevar a feliz término la reacción que sin su adición sería totalmente imposible.

Una vez resprido todos los sueros con el complemento activo y la emulsión de treponemas, los ponemos en un desecador, con tapón esmerilado previsto de una llave, le hacemos el vacío, hasta 76 m.m. de mercurio, y entonces le hacemos llegar el gas (mezcla de CO₂ y nitrógeno), hasta que la aguja del manómetro se acerca al cero. Entonces repetimos este vacío dos veces más, con el fin de obtener una atmosfera dentro del desecador, que no tenga más oxígeno que el contenido en la bala del gas, (0,02-0,05 %). La última vez, cerramos la llave del tapón del desecador, que no tenga más oxígeno que el contenido en la bala del gas. La ultima vez, cerramos la llave del tapón del desecador cuando la aguja del manómetro llega a 10 m.m. de mercurio, con el fin de tener un vacío negativo que impide que la tapa del desecador se despegue y pueda entrar el aire atmosferico. Este desecador, lo colocamos en estufa a 35 grados, donde permanecerá durante 22 horas, y entonces procedemos a la lectura del Test de inmovilización.

La lectura, se hace con microscopio con condensador de fondo oscuro, como ya ha quedado dicho anteriormente. Se abre la llave del desecador y se colocan los tubos en una gradilla. Con un asa de platino, previamente puesta al rojo en lallama de un mechero de Bunsen, y enfriada, se agita el líquido que contiene cada tubo, y se toma una gota que se coloca entre porta y cubre. En el condensador se pone una gota de aceite de inmersión, y se contactan el condensador y la preparación, de tal manera que el aceite pega, una, moja, la superficie inferior del porta, y la parte frontal del condensador. Hemos hecho una pequeña modificación en esta parte de la lectura. El aceite de cedre comunmente usado en microscopía, es muy adherente y cuesta bastante limpiar el

microscopio sin recurrir al alcohol o al xilol, que estropea el sistema optico del microscopio. En vez de este aceite usamos el de oliva, y obtenemos resultados excelentes ya que da una visión mucho más clara y uniforme del campo del microscopio: se limpia facilmente, y el microscopio se deteriora mucho menos. Así venimos usándolo hace dos años.

Al cabo de las 22 horas en la estufa se hace pues la lectura. Los treponemas móviles, se observan con los tres movimientos citados, al tratar de la biología del germen y se diferencia perfectamente del treponema inmobilizado, y además los primeros están dotados de movimientos mucho más activos que los observados en T.P. tomados de lesiones sífilíticas humanas. Se cuentan los treponemas inmóviles, sobre un total de 50 solamets, y es necesario hacer una lectura relativamente rápida para así evitar la inmobilización accidental.

La apreciación de los resultados se basa en el porcentaje de inmobilización. Ahora bien, a la inmobilización específica hay que restarle la inmobilización accidental, constatada perfectamente por la inmobilización en el tubo testigo, por ello la inmobilización específica es función de las encontradas en el tubo testigo y en el tubo problema. Nelson, ha dado su fórmula donde podemos previos faciles cálculos obtener la inmobilización específica, que va a ser el resultado del Test:

$$\frac{Mt - Mr}{Mt}$$

En esta fórmula, Mt es el porcentaje de treponemas móviles en el tubo testigo y Mr es el mismo porcentaje en el tubo problema.

Se dan los siguientes resultados:

- Inmovilización de 0-20 % Negative
- Inmovilización de 20-50 %. Dudosa (no satisfactoria)
- Inmovilización de 50-100 % Positive.

Nosotros damos como resultado ilegible, aquel suero que presenta en el tubo testigo anormal. (Como en los casos anteriormente citados de tener en el suero una tasa elevada de un medicamento treponemioide).

Los resultados dudosos, son repetidos en nuestro laboratorio dos veces antes de dar el informe, y hemos visto casos, en que la segunda prueba ha resuelto satisfactoriamente el problema planteado.

Una vez verificada la lectura de todos los tubos, problemas y testigos, y apuntadas las supervivencias de cada tubo, pasamos a la última fase de la reacción, o control del complemento. Cada tubo recibe una cantidad determinada por valoración diaria de hemolisina y hemáties de carnero. Es decir, añadimos a cada tubo un complejo antígeno anticuerpo. La hemolisina por nosotros usada, es preparada en el laboratorio por inoculariones sucesivas con intervalos de 5 días, de cinco centímetros cúbicos de hemáties de carnero, lavados, en la vena marginal de la oreja de un conejo adulto y sano. Aproximadamente a la cuarta inyección, se toma sangre del animal y se valora la tasa de anticuerpos anti-hemáties de carnero que haya creado el organismo del animal. Si es elevada, sangramos al animal, centrifugamos la sangre y se envasan en ampollas de un centímetro cúbico añadiéndole un conservador compuesto por ácido fénico 5 c.c., Glicerina, 5c.c. y solución salina al 9 por mil, 90 c.c. Por cada 10 c.c. de suero hemolítico añadimos de 0,6 a 0,8 c.c. de la mescla anteriormente citada, pudiendo así disponer de la

6

hemolisina en el momento necesario. Los anticuerpos del conejo (hemolisina) sensibilizan los hematíes de carnero, y en el caso de existir complemento libre, este ataca al hematí ya sensibilizado y da lugar a la hemólisis, que es perfectamente visible. Por ello la prueba final del Test de Nelson, ha de dar una falta total de hemólisis en los tubos testigos, ya que el complemento no existe en estos tubos por haber sido inactivados previamente, y en el tubo problema debe haber hemólisis producida por el exceso de complemento, ya que el puesto por nosotros está calculado, para que exista el final, a pesar de que la reacción en sí, consume complemento, y que la permanencia en la estufa inactiva parte del mismo. Puede darse el caso, de que un tubo problema no presente hemólisis. En este caso si el resultado ha sido positivo 100 % de inmunización, el resultado puede darse como satisfactorio, ya que demuestra que ha existido complemento suficiente como para llevar la reacción a feliz término, y que ha sido consumido todo. En cambio, si el resultado no es el anteriormente referido, habrá que repetir la prueba con el suero ya que podemos discriminar si es ese efectivamente el resultado, o si es que le ha faltado complemento para llevar a término la prueba. No obstante esta aclaración, parece ser que estos casos se dan con mucha rareza ya que nosotros no hemos tenido la ocasión en el tiempo que llevamos trabajando en estos temas, de ver un caso como el anteriormente citado. Precisamente para evitar este error que es producto de la baja tasa de complemento, sangramos a un lote grande de animales (cobayas), y equilibrar unos con otros el título del complemento. Nosotros ponemos el complemento puro; no estamos de acuerdo según nuestra experiencia con la marcha de esta reacción en

algunos laboratorios, que preconizan usar el suero de cobaya diluido a la mitad, para así poder manejar mayores cantidades de líquido.

Hemos de añadir, para finalizar la técnica de la reacción usada en nuestro laboratorio, que siempre ponemos sueros positivos y negativos como control de toda la prueba, y poder poner de manifiesto así, las irregularidades que pudieran haber, en los diferentes componentes de la reacción. Cada suero conocido, negativo o positivo, recibe la misma cantidad de emulsión y de complemento que los problemas a examinar cada día, y usándose los mismos treponemas y el mismo suero de cobaya. Así pues empezamos por los sueros conocidos, que naturalmente exigimos den resultados positivos o negativos según sea: unos u otros. En caso favorable, continuamos la lectura de los demás sueros.

La aplicación práctica del Test de Nelson, aumenta considerablemente, al poder investigar el título de la tasa de anticuerpos inmovilizantes existentes en un determinado suero. Todas las reacciones modernas ideadas para el diagnóstico de la lues, consiguen titular los anticuerpos antisifilíticos, y un hallazgo importante en este sentido ha sido el uso de la cardiolipina descubierta por Pangborn, en un método asequible a todos los laboratorios y de fácil ejecución: es la reacción conocida por el anagrama V.D.R.L. en este método, es fácil obtener el título, con una pequeña cantidad del suero del enfermo, y de antígeno, por ello significa un ahorro de material considerable y utilizable para el examen serológico de grandes masas de población.

El título de reacción, es la dilución mayor de un suero que aún es capaz de reaccionar de manera positiva con un antígeno determinado. Es imprescindible conocer el título para comprobar si un tratamiento

da buenos resultados, ya que si nos limitamos a dar un resultado como negativo o positivo unicamente no expresamos la cantidad de anticuerpos que existen en el suero examinado. En cambio, si hacemos la reacción cualitativa, podemos deducir al descender este, que efectivamente el tratamiento va dominando la enfermedad. En la práctica corriente del laboratorio de análisis, existen muchas reacciones que se expresan por el título, pero el avance en serologías lúeticas con estos modernos métodos han venido ha resolver cuestiones importantes, ya que existen una serie de reacciones, que si bien utilizamos para designar la positividad, el signo +, dándole al más intenso +++, al menos positivo ++ y vamos bajando con la intensidad de la reacción hasta una +, e incluso discriminamos una reacción dudosa, que catalogamos con el signo $\frac{1}{2}$, facilmente se comprende que esta capitulación es un factor personal, que si bien en investigadores muy experimentados, en apreciación de rutina coincidieran las más de las veces, aunque hay que tener en cuenta que puede prestarse a error. Por ello, las reacciones como el V.D.R.L. que especifican la positividad de una dilución, que es igual para cualquier analista, han tomado un auge inusitado y son usadas en el mundo entero, habiendo sido últimamente ordenadas como imprescindibles en todos los centros estatales españoles que se dedican a estas cuestiones en la lucha antiluetica ordenada.

El Test de Nelson y Mayer, es utilizado en todos los laboratorios para seguir la marcha de un tratamiento antiluetico, practicando el test cualitativo. El título es obtenido diluyendo progresivamente el suero sospechoso, y es dado por el inverso de la dilución que aún es capaz de inmovilizar la mitad de los treponemas de la reacción, es decir el 50 por ciento. Este porcentaje de inmovilización es función de la tasa de anticuerpos y es casi rectilínea y por tanto de la máxima

regularidad. Se puede afirmar que es posible obtener una reproducción satisfactoria de los títulos, pudiéndose así conocer la demanda antigénica y la formación de anticuerpos, y su evolución en función del tiempo y de la terapéutica.

La capacidad reaccionante de un organismo frente a una dosis determinada de anticuerpos, es influenciada por una serie de factores aún mal conocidos. Pero se conoce por las diferentes infecciones tributarias de reacciones de antígeno anticuerpos, que el margen de la variación de la producción de los anticuerpos, sea en varios enfermos, o en el mismo sujeto, no suele sobrepasar ciertos límites, y que las variaciones se encuentren alrededor, por una parte y por la otra, de una línea media que resulta ser la más frecuente, siguiendo la ley de las estadísticas. La producción individual de la producción de anticuerpos en un individuo es, por otra parte temponada por la velocidad de sedimentación. El estudio de la eliminación de los anticuerpos inmovilizantes en recién nacidos sanos, de madres sífilíticas, demuestra que hace falta esperar durante seis - diez meses para obtener la desaparición de estos anticuerpos. Naturalmente, este tiempo sería mucho más largo, cuando tuviere la madre en su suero una tasa de anticuerpos muy alta.

Así pues, queda explicada la técnica que usamos normalmente en nuestro Laboratorio e indistintamente practicamos la reacción con los medios de supervivencia explicados con anterioridad sin que hallamos observado ninguna supervivencia efectiva de uno sobre otro ya que las variaciones débiles encontradas en diferentes días no son achacables al medio de supervivencia según nuestro parecer, sino más bien a las variaciones individuales habidas en el organismo, del conejo en el

curso de la incubación y desarrollo de la erquitia, y quizás achacable, a algunas de las manipulaciones a que hay que someter los treponemas, germen muy delicado, y por lo tanto, hemos de considerar ambos medios francamente satisfactorios.

El test que nos ocupa es desgraciadamente un proceso caro y que solamente pueden hacerlo, una serie de Laboratorios especializados. Toda el test ha de hacerse, bajo condiciones de absoluta asepsia, con material esterilizado, y el material de vidrio que interviene en la reacción ha de ser vidrio neutro (nosotros usamos con magníficos resultados el vidrio Firex, suministrado por la U.N.I.C.E.F.) y además, el sostenimiento de la cepa de Nichols ha de ser a través de animales que enriquecen aun más la reacción. La práctica original, presenta un sin fin de dificultades para muchos laboratorios y ello ha sido la causa de que algunas laboratorios hayan dejado de practicarlos. Para vencer estas dificultades, nosotros hemos modificado la técnica original. Hemos expuesto en líneas anteriores, las principales modificaciones que hemos conseguido introducir sin detrimento de la especificidad de la reacción. Por ello, quisimos hacer las primeras experiencias con el medio a base de suero de conejo, en un centro, como el Hospital Sant Lazare, donde pudieramos comparar los resultados, de supervivencia. Allí, hacíamos la lectura tres personas distintas, con el fin de hallar una media que se acercara lo máximo posible a la realidad. Creemos que, con la técnica seguida por nosotros, puede hacerse realidad una reacción tan importante, y que tanta ayuda significa para la lucha antisifilítica, ya que como adelante veremos es capaz de poner de manifiesto esta infección en un tanto por ciento vecino al cien, sobre todo en ciertos estadios de la sífilis humana, aunque hay que repetir que no es capaz de

distinguir una serie de enfermedades, principalmente tropicales, pero, que son de una rareza extraordinaria en nuestro país, y por ello, este pequeño error es perfectamente susanable con la ayuda que presta a los especialistas sifilógrafos de todo el mundo.

En nuestro laboratorio recibimos con cierta periodicidad muestras de sueros para la práctica de las reacciones serológicas, e infermanos posteriormente los resultados al laboratorio Central de la Organización Mundial de la Salud, con sede en Copenhague, a cuya Organización está adscrito este Laboratorio. Anualmente recibimos también la visita del Inspector General de la Organización, para observar la marcha del laboratorio y poner al día las técnicas, o las últimas noticias habidas en los laboratorios de investigación de la O.M.S. sobre estas cuestiones. Esto indica dos cosas: la importancia mundial que ha adquirido la infección sifilítica, con especial atención de la sífilis de los recién nacidos, y la indiscutible calidad de la reacción puesta a prueba por Nelson y Mayer.

No por existir este medio de diagnóstico, hay que olvidar los magníficos resultados que siguen prestando las reacciones serológicas llamadas clásicas, (7) máxime cuando con el descubrimiento de la tan citada cardiolipina, se le ha conseguido sacar a estas el máximo rendimiento en lo que se refiere a especificidad. Nosotros sistemáticamente practicamos en el suero obtenido de los enfermos, enviados para la reacción Nelson y Mayer, una reacción de desviación de complemento (modificación de la de Wassermann), un método de aclaramiento (Meinicke) y dos de floculación (Kahn y V.D.R.L.) con este complejo de reacciones, pretendemos acercarnos lo más posible a la realidad de la infección en los pacientes.

IMPORTANCIA DEL TEST DE NELSON Y MAYER

Nos parece de interés, abordar esta importante cuestión, para poner en claro una serie de hechos, relativamente poco conocidos: los casos en los cuales se recomienda el uso del Test de Nelson (43). O dicho de otra manera: que es lo que el médico especialista puede exigirle al Test de Nelson, al hallarse ante un paciente con sospecha de lues. La primera cuestión que se plantea, por primordial, es saber si el Test tiene un interés práctico efectivo, acoplable a la rutina diaria, si además es más específico que las reacciones serológicas, y si su uso puede permitir, el diagnóstico y la evolución de la infección producida por el *treponema pallidum*. Hasta hoy, la respuesta es categóricamente afirmativa, y todos los investigadores ayudados por la clínica, piensan que la reacción que nos ocupa ha de ser la base principal en el diagnóstico biológico de la sífilis.

Todas las fases de la infección lúctica en el organismo humano (70) tiene para su empleo una justificación clara y precisa. Naturalmente, hace falta observar una serie de directrices, ya que solicitar en una lues florida, con las reacciones serológicas clásicas intensamente positivas, una reacción cualitativa, es totalmente superfluo. Pero si se solicita en estas condiciones un Test cualitativo con el fin de poder seguir la tasa o título de los anticuerpos inmovilizantes, para seguir la pauta del tratamiento, es perfectamente recomendable. Por ello, existen una serie de recomendaciones, de las que se han ocupado todos los sifilógrafos, de poner en su justo punto cuando los esfuerzos y los resultados habidos en los diferentes países, y que nos permitimos poner aquí, antes de pasar a los resultados obte-

nidos, en nuestro laboratorio, contando con un número de total de 915 pacientes examinados.

Para poner aquí estos resultados hemos recopilado las diferentes publicaciones españolas y extranjeras, aparecidas hasta hoy, las comunicaciones obtenidas por comunicaciones personales con los Dres. Krag y Nielsen (33) (53), y las enseñanzas obtenidas por nosotros en los tres años que llevamos haciendo esta reacción.

Los casos a que nos hemos referido anteriormente, pueden recopilarse en tres fundamentales:

1º - Se recomienda con alto interés, la prescripción del Test, a personas con serología positiva usual, que no han tenido ni tienen, ni evidencia clínica de padecer la enfermedad, ni anamnesica, como por ejemplo, donantes de sangre, a los que debe hacerse por sistema; mujeres embarazadas, etc. Naturalmente, y ya lo hemos dicho antes, hay que tener en cuenta, que para hacerle la investigación de sífilis a los recién nacidos, hay que esperar un tiempo determinado, al organismo del niño para destruir los anticuerpos reagínicos e inmovilizantes, que atraviesan pasivamente la placenta.

2º - Pacientes con síntomas dudosos de sífilis o con sospecha de haber padecido la enfermedad y que tengan resultados negativos e positivos en los test serológicos usuales. Según nuestra estadística, estos enfermos, son perfectamente cardíacos, mentales, nerviosos y en los cuales conviene hacer la reacción también en líquido cefalorraquídeo.

3º - Enfermos con síntomas evidentes de sífilis, diagnosticados como casos primarios y secundarios con los test usuales negativos e positivos. No se puede dar un resultado negativo en estos enfermos, por el exámen en fondo oscuro al no verse los treponemas. En estos

casos en una ayuda al T.P.I. constituyendo una fuerte evidencia de sífilis en el caso de que este último sea positivo, pero sin excluir la posibilidad de sífilis cuando el resultado sea negativo.

En estos tres casos se encuentran incluidas las principales indicaciones del T.P.I. (4). Nosotros incluimos, por la experiencia habida, que sería útil practicar esta reacción, en futuros cónyuges, para así poder detectar, una infección que puede acarrear graves lesiones a los hijos.

Es importante la interpretación correcta de los resultados que se obtienen con esta reacción, y para ello, hemos de discriminar entre el Test cualitativo y cuantitativo (24) (52).

En el primero, el resultado se expresa simplemente por el tanto por ciento de inmovilización específica. Para un suero que tenga anticuerpos, es de 0 por ciento, aunque se admite una inmovilización hasta de un 20 por ciento. Pero un suero que contenga anticuerpos, dará una inmovilización calculada que estará comprendida entre el 20 y el 100 por ciento. Se consideran como dudosos los resultados comprendidos entre 50 y 20 por ciento. Fribourg-Blanc, (25) opina que esto es un error: dice que existen sueros, más o menos tóxicos o anticomplementarios, etc., pero que no se observa jamás una inmovilización específica débil, ya que controlada perfectamente puede verse que es debido a otros factores que no tienen nada que ver con el anticuerpo inmovilizante. Nosotros, opinamos con un sentido menos estricto, que el expuesto anteriormente, ya que la expresión de resultados comprendidos entre el 20 y el 50 por ciento, se puede dar o bien en infecciones sífilíticas recientes, en los cuales la demanda de anticuerpos es aún baja, o en lues bien tratadas, en las que los anticuerpos inmovilizantes, van decayendo al ir venciendo la enfermedad con un tratamiento correctamente instaurado. No obstante esto, es indispensable en estos casos repetir sistemati-

amente el test ya que la inmovilización puede ser debida a pesar de todas las precauciones tomadas, a impurezas contenidas en el suero o en los tubos, que van a resultar tóxicas o anticomplementarias, o en defecto de la técnica del reparto de los diferentes componentes que componen la reacción. En estos casos conviene mandar repetir la prueba, sin asentar que el personal del laboratorio es inepto, y sin opinar que el test es inservible.

El test de inmovilización del treponema tiene relativamente poco interés (Durel), ya que el líquido cefalo-raquídeo no está en contacto directo con las células encargadas de elaborar los anticuerpos. Así pues, la demostración de los anticuerpos inmovilizantes en este líquido, solamente indican que existe una modificación de la permeabilidad de las meninges. La tasa, es siempre inferior a la encontrada en el suero del mismo enfermo, y siempre que un test es positivo en el líquido cefalorraquídeo, es positivo así mismo en el suero sanguíneo. No existe más que un paralelismo inconstante entre las lesiones nerviosas y la positividad del test de Nelson en el líquido cefalorraquídeo.

En lo que respecta al test cuantitativo, tiene una mayor aplicación, ya que puede jugar con precisión la intensidad de la formación de anticuerpos en todas las fases activas de la infección.

Hasta ahora es imposible de discriminar los títulos cuantitativos exactos correspondientes a los diversos estadios de la infección. No obstante parece, para algunos investigadores, por la práctica adquirida con esta reacción que se pueda considerar todo resultado positivo 100 %, como manifestación fiel de la persistencia de una infección treponémica, y que los resultados considerados como dudosos, no traducen más que la existencia de anticuerpos residuales después de remitir la infección microbiana por completo, o como máximo que existen formas extremadamente latentes o disimuladas del germen.

En lo que se refiere al título es conveniente advertir que existen variaciones en el título de un mismo suero, analizando en días diferentes, por una serie de factores de variabilidad existentes aún en las técnicas más exactas, oscilando esta variación de un 30 a un 40 por ciento, es decir, que un título de 200, tiene la misma significación que uno de 260. El título de un suero positivo cualitativamente 100 por 100, oscila entre 50 y 3.000. La mayor parte de los casos, éste está comprendido entre 150 y 500. En la sífilis latente no tratada, el título del Test se remonta hasta 2.000 a 3.000. Para terminar este capítulo diremos que se presentan casos de lústicos antiguos, latentes, con un título poco elevado del orden de 50 a 200. Fribourg-Blanc, (25) opina que más que en una insuficiencia funcional de las células encargadas de producir los anticuerpos, se trataría de una infección discreta, y que por lo tanto, las defensas orgánicas naturales, se han mostrado particularmente eficaces.

La reacción de Nelson, es inútil, para controlar una investigación con el ultramicroscopio, que ha resultado positiva, para asseverar una sífilis clínica evidente, y para controlar una serología total e indiscutiblemente positiva.

Nos parece oportuno antes de terminar esta exposición, dar una idea del comportamiento de esta reacción en los enfermos sífilíticos tratados. Naturalmente, la importancia del Test es mayor en casos no tratados, ya que alta especificidad, permite diagnóstico retrospectivos en el 90 % de los casos, exceptuando los casos de sífilis primaria y secundaria, donde este tanto por ciento se reduce hasta un 40 por ciento.

En los casos tratados, la positividad depende del grado de intensidad de la infección. En la sífilis primaria el Test puede no llegar a ser positivo si el tratamiento ha sido instaurado prontamente, e en el caso de

que haya sido positivo, puede negativizarse en el periodo comprendido entre algunos meses y dos años. Mientras más larga ha sido la duración de la infección antes del tratamiento, más larga será también la respuesta positiva del Test. En general, la mayoría de los pacientes tratados, dan positivo al Test de Nelson, durante un periodo muy superior al de la serología clásica, e incluso puede quedar aquel positivo para toda la vida. Aunque no está aclarado perfectamente todavía esta positividad, de permanecer siempre con el Test positivo, se considera necesario, seguir tratando a estos enfermos periódicamente. No obstante, no hay que olvidar que hay que aunar los juicios clínicos y los resultados del laboratorio, para formar un juicio claro sobre cada enfermo en particular.

RESULTADOS OBTENIDOS EN NUESTRO LABORATORIO

En el curso de los tres años que lleva en funcionamiento el Laboratorio Central de Serología, se ha practicado el análisis por el T.P.I. de 735 pacientes, es decir, para diagnosticar, a firmar o desechar el diagnóstico de lues. La conclusión que obtenemos de los resultados obtenidos concuerda con las estadísticas del resto de los laboratorios practicantes de esta reacción; el Test de Nelson es un arma eficaz e imprescindible para una lucha bien organizada contra esta enfermedad.

Los resultados que damos a continuación se han obtenido verificando la reacción indistintamente con el medio original de Nelson y el compuesto por suero de conejo, estéril, inactivado y sin hemolizar mezclado a partes iguales con solución salina al nueve por mil, por considerarlo perfectamente apto como sustitutivo del medio de supervivencia de Nelson.

Hemos agrupado los resultados obtenidos en una serie de cuadros que dan claridad a las conclusiones que pueden sacarse del trabajo realizado en el laboratorio desde su fundación. Las agrupaciones han sido efectuadas, por edades, por centros remitentes de los sueros o enfermos, en relación con la serología reaginica, y en pacientes con antecedentes bien y defectuosamente tratados.

RESULTADOS OBTENIDOS DEL TOTAL DE SUEROS EXAMINADOS

En total se realizaron 735 T.P.I. utilizables para esta estadística, con las correspondientes pruebas de serología clásica (reacción de Wassermann, R. de Meinicke, R. de Kahn, y R. de V.D.R.L.). De la relación se separan 20 casos, por encontrarse en el tubo testigo del Test sustancias tóxicas para el treponema, resultado probablemente de tratamientos previos realizados, con fines antilúéticos o no, que naturalmente quitan valor al resultado de la reacción.

Es de interés exponer algunos datos estadísticos de estos 715 casos del trabajo.

El T.P.I. resultó positivo en el 294 del total y negativo en el 421, es decir positividad en el 41,1 % y negatividad en el 58,9 % (fig. nº 1). En el mismo grupo de individuos, 213 casos, es decir el 29,7 % presentaba serología lúética positiva y negativa el 70,3 % restante.

Estos sencillos datos porcentuales nos hablan ya del extraordinario interés de la prueba de inmovilización de Nelson y Mayer, y su superioridad sobre la serología habitual.

El T.P.I. resultó positivo en el 68,8% de 294 sueros examinados y negativo en el 2,6 % de 422. Estas separaciones en dos grupos se ha realizado con la idea de discriminar entre los individuos de los no lúéticos, sin embargo no se llega a una solución definitiva del problema, pues el agrupamiento

to se basa en la positividad serológica de 213 individuos y en la negatividad de 502, y como ya se ha insistido en páginas anteriores una serología positiva no es siempre taxativa de lues, ni la negatividad serológica excluye la sífilis. Precisamente es esta posibilidad de detectar casos de lues seronegativos una de las bases más firmes para la introducción del T.P.I. en la clínica.

De 213 individuos con serología positiva, el 94,84 % presentaba un T.P.I. positivo. El 5,16 % de T.P.I. negativos en personas con serología positiva, indicaría o fallo del Test o serologías falsamente específicas.

En el segundo grupo que abarca 502 investigaciones hubo coincidencia de T.P.I. negativo y seronegatividad en el 81,67 % de los casos, en los que se puede descartar por completo la presencia de lues, mientras que en el 18,33 % la positividad del T.P.I. y la negatividad de la serología indica mayor especificidad en la prueba de la inmovilización del treponema, confirmando su gran valor clínico.

Con objeto de discriminar las causas de la falta de coincidencia, es especial en el grupo primero se han agrupado en forma de tabla los diagnósticos clínicos que acompañaban a los sueros enviados (tabla I) en la que se reseñan las positividades del T.P.I. junto al diagnóstico. Al tratarse de una investigación en gran escala donde se estudiaron tanto los casos de investigación dirigida, cuando existía certeza o sospecha de lues, como aquellos sueros de personas afectas de otros procesos no luéticos, no es posible deducir datos homogéneos ante la gran cantidad de variantes que entran en juego, pero sí merece destacar la ausencia de positividad en la lues primaria y los altos porcentajes en individuos luéticos, aunque no se dispenga de datos de si con anterioridad han sido tratados o no. El clínico puede de

ducir la importancia de los resultados positivos en la sospecha de lues, en las enfermedades vasculares, y encefalomeningéas, vértigos, paladas y embarazo. Es de interés la positividad en la cirrosis hepática, lepra e hipernefrona.

En el gráfico o figura 2 se exponen las positividades (cuadros rayados) y las negatividades (cuadros blancos) del T.P.I. con respecto al centro médico de procedencia. Fácilmente destacan en el gráfico que tanto el número absoluto de sueros como el de positividades máximas proceden de la Escuela Departamental de Puericultura y de la Cátedra de Dermatología y otros servicios de la Facultad de Medicina de Sevilla. Cerca de la mitad de los sueros enviados de Puericultura han resultado positivos, lo cual indica la gran importancia de la sífilis en la edad infantil y madres con la enorme trascendencia que para la lucha contra la sífilis tiene el despistaje de estos casos. En la Facultad de Medicina, solo uno de cada cuatro pacientes⁷ sometido a la exploración presentó un T.P.I. positivo.

En los restantes centros asistenciales que figuran en el gráfico el número de pruebas solicitadas han sido mucho menor y destaca el predominio de los positivos sobre los negativos en los sueros enviados por los Dispensarios Antivenéreos de la Capital. Así mismo es de gran interés para la lucha antiluéica, el gran porcentaje de positividades en el Seguro Obligatorio de Enfermedad. Una investigación en gran escala en este amplio sector de la población asistida, se hace indispensable para una lucha eficaz contra la sífilis en nuestro medio.

El T.P.I. no ha entrado aún en la práctica rutinaria de investigación etiológica de la consulta privada, sin embargo de los 130 sueros Analizados, la positividad del 26,8 % es un toque de llamada al médico general y especialista privado. Es cierto que la mayoría de los sueros enviados, lo

han sido por facultativos que trabajan así mismo en los centros asistenciales ya señalados, pero cada vez van siendo más numerosos paralelamente a la divulgación de los resultados del Test, las pruebas requeridas del sector de facultativos del ejercicio privado.

En la figura 3 se exponen las positivities del T.P.I. (rayado) junto a las negatividades (liso) en relación con los grupos de edad. Hay que destacar, como las positivities globales no son muy acusadas en la infancia y adolescencia que sufre un gran incremento a partir de los 21 años con un máximo en la tercera década de la vida y manteniendo cifras altas en las décadas posteriores. Se puede interpretar la gráfica, en el sentido ya conocido, de la mayor exposición al contagio en la época de la vida de mayor actividad sexual arrastrando las consecuencias de la infección en la madurez y senilidad y con repercusión en la descendencia. Mas precisamente en la disminución absoluta y relativa de positivities que se advierten en la infancia y juventud, no son a mi juicio signo exclusivo de la mayor mortalidad por sífilis en la primera época de la vida sino a su vez, fruto del resultado de la eficaz labor de lucha antisifilítica y de la mayor cultura sanitaria de la región. Y es de esperar que en años venideros gracias a la acción de la lucha, de los reconocimientos serológicos prenupciales y de embarazadas y del tratamiento actual más eficaz, se vea disminuir sensiblemente el número de positivities tanto en la parte inicial, como en la central de la curva. Basta un somero examen de la Tabla I, en la relación de diagnóstico la casi ausencia de diagnósticos de sífilis terciarias, otro punto positivo que puede apuntarse ya la lucha antilúética emprendida.

A continuación, exponemos las tablas y figuras a que nos hemos estado refiriendo en líneas anteriores:

T A B L A I

RELACION DE TEST DE NELSON & MAYER, AGRUPADOS POR ENFERMEDADES

| <u>ENFERMEDAD</u> | <u>T.P.I. +</u> | <u>T.P.I. -</u> | <u>Totales</u> |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Acne | 0 | 1 | 1 |
| Aortitis | 3 | 6 | 9 |
| Artropatia | 1 | 3 | 4 |
| Adenopatia Inguinal | 0 | 1 | 1 |
| Asma Pulmonar | 0 | 1 | 1 |
| Arteritis | 3 | 1 | 4 |
| Anemia | 0 | 1 | 1 |
| Amiloidosis | 0 | 1 | 1 |
| Cefaleas | 14 | 13 | 27 |
| Ciática | 1 | 1 | 2 |
| Cereza Minor | 0 | 1 | 1 |
| Cardiopatias | 3 | 9 | 12 |
| Cirrosis hepáticas | 1 | 0 | 1 |
| Colecistopatias | 0 | 1 | 1 |
| Diabetes | 0 | 3 | 3 |
| Diplopia | 3 | 1 | 4 |
| Duchenne-Erb | 0 | 2 | 2 |
| Epilepsia | 0 | 3 | 3 |
| Embarazo | 7 | 8 | 15 |
| Embarazo (abortos anteriores) | 7 | 14 | 21 |
| Esclerostaxia | 0 | 1 | 1 |
| Endocarditis | 1 | 1 | 2 |

(Continuación de la tabla L)

| <u>ENFERMEDAD</u> | <u>T.P.I. +</u> | <u>T.P.I. -</u> | <u>Totales</u> |
|--------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Enanismo hipofisario | 0 | 1 | 1 |
| Hemiplejia | 0 | 2 | 2 |
| Hepatopatía | 0 | 1 | 1 |
| Hipernefroma | 1 | 0 | 1 |
| Idiocia | 1 | 0 | 1 |
| Leptospirosis | 1 | 0 | 1 |
| Linfogranuloma | 0 | 1 | 1 |
| Linfosarcoma | 0 | 1 | 1 |
| Leprosia | 1 | 5 | 6 |
| Meningitis | 1 | 2 | 3 |
| Neuralgia del trigémino | 0 | 1 | 1 |
| Pelada | 4 | 0 | 4 |
| Polineuritis | 0 | 1 | 1 |
| Parestesias | 4 | 0 | 4 |
| Psoriasis | 0 | 1 | 1 |
| Parálisis de Miembros | 0 | 1 | 1 |
| Quiste hidatídico Pulmón | 0 | 1 | 1 |
| Reuma | 1 | 2 | 3 |
| Retardo mental | 0 | 2 | 2 |
| Rinoscleroma | 0 | 1 | 1 |
| Sordera | 1 | 13 | 14 |
| Síndrome medular | 0 | 1 | 1 |
| Sinusitis | 0 | 3 | 3 |
| Tabes | 2 | 0 | 2 |
| Trismus | 0 | 1 | 1 |
| Trastorno Gástrico | 1 | 0 | 1 |

(Continuación de la Tabla L)

| <u>ENFERMEDAD</u> | <u>T.P.I. +</u> | <u>T.P.I. -</u> | <u>Totales</u> |
|--------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Linfogranuloma | 0 | 1 | 1 |
| Linfosarcoma | 0 | 1 | 1 |
| Lepra | 1 | 5 | 6 |
| Meningitis | 1 | 2 | 3 |
| Neuralgia del trigemino | 0 | 1 | 1 |
| Polada | 4 | 0 | 4 |
| Polincuritis | 0 | 1 | 1 |
| Parestesias | 4 | 0 | 4 |
| Psoriasis | 0 | 1 | 1 |
| Paralisis de miembros | 0 | 1 | 1 |
| Quiste hidatídico Pulmón | 0 | 1 | 1 |
| Reuma | 1 | 2 | 3 |
| Retardo mental | 0 | 2 | 2 |
| Rinoscleroma | 0 | 1 | 1 |
| Sordera | 1 | 13 | 14 |
| Síndrome medular | 0 | 1 | 1 |
| Sinusitis | 0 | 3 | 3 |
| Tabes | 2 | 0 | 2 |
| Trismus | 0 | 1 | 1 |
| Trastorno Gástrico | 1 | 0 | 1 |
| Tuberculosis | 2 | 2 | 4 |
| Trombosis de ojo | 1 | 0 | 1 |
| Trombosis encefálica | 0 | 1 | 1 |
| Úlcera tréfica | 1 | 0 | 1 |
| Vertigo de Menier | 1 | 4 | 5 |
| Vertigos | 2 | 1 | 3 |

(Continuación de la Tabla L)

| <u>ENFERMEDAD</u> | <u>T.P.I. +</u> | <u>T.P.I. -</u> | <u>Totales</u> |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Histeria | 0 | 2 | 2 |
| Escrofula | 0 | 1 | 1 |
| Tos Perina | 0 | 1 | 1 |
| Diagnóstico no especificados | 28 | 265 | 293 |
| Lues primaria | 0 | 4 | 4 |
| Lues secundaria | 2 | 2 | 4 |
| Lues congénita | 21 | 0 | 21 |
| Lues latente | 118 | 2 | 120 |
| Lues conyugal | 21 | 1 | 22 |
| Lues nerviosa | 3 | 0 | 3 |
| Lues (sin especificar estadio) | 43 | 33 | 76 |

T A B L A I I

| | TOTAL | T.P.I. neg. | T.P.I. pos. | % negat. | % post. |
|---|-------|----------------|----------------|-------------|------------|
| Embarazadas con anteceden- tes sifilíticos, bien tra- tadas y con serología ne- gativa | 30 | 22 | 8 | 73,4 | 26,6 |
| Embarazadas con anteceden- tes dudosos bien tratadas anteriormente | 15 | 1 | 14 | 3,4 | 96,6 |
| Madres con antecedentes ciertos y tratadas mal... | 18 | 0 | 18 | 0,0 | 100,0 |
| Madres con abortos sin an- tecedentes y no tratadas. | 21 | 16 | 5 | 76,2 | 23,8 |
| Niños con antecedentes ma- ternos con serología ac- tual negativa | 61 | 53 | 8 | 86,9 | 13,1 |
| Niños con antecedentes ma- ternos, con serología ac- tual positiva | 17 | 0 | 17 | 0,0 | 100,0 |

A la vista de estas cifras se pueden sacar una serie de conclusiones:

1º - A pesar de someter a tratamiento efectivo a mujeres con antecedentes sífilíticos, un 26,6 % dio el Test de Nelson positivo. Por lo tanto es necesaria la práctica de la reacción a toda mujer que haya tenido anteriormente síntomas lúeticos, hasta quedar convencidos del estado actual de la infección.

2º - Se han analizado 15 pacientes con serología discordante, arrojando 96,6 % de positividad. El único caso negativo tenía únicamente positiva la R. de Kahn (++). En estos casos, la reacción de inmovilización de Nelson, vino a solucionar la duda planteada ante el diagnóstico dubitativo.

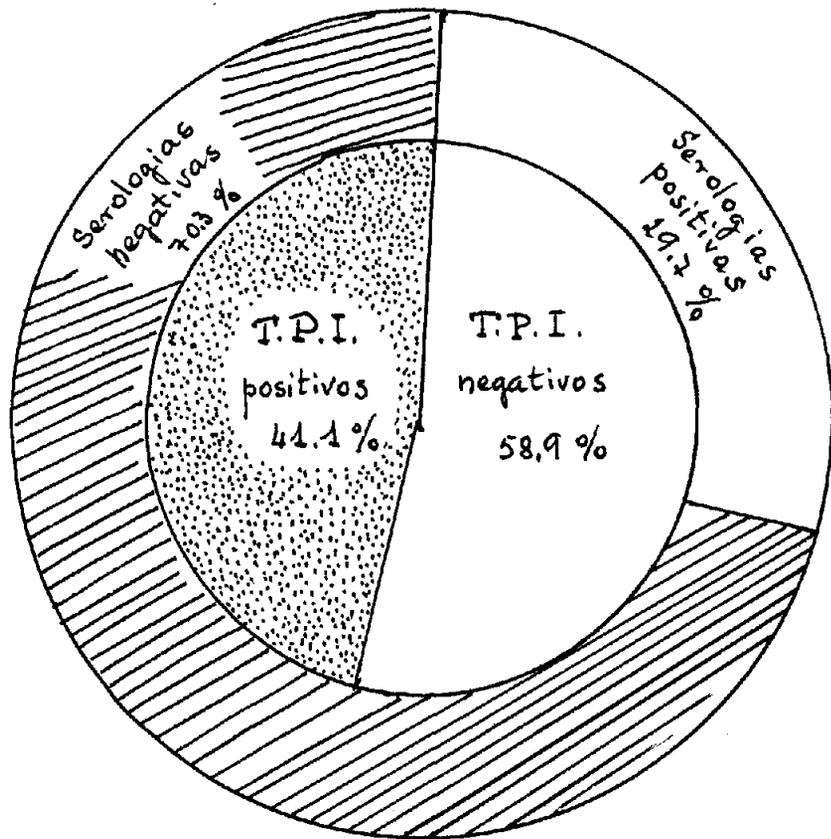
3º - El T.P.I. resuelve el problema en el caso 3º, de las seronegativas, y corrobora la especificidad de las seropositivas. Como puede verse la cifra de positividad es total.

4º - Los accidentes obstétricos que tan comúnmente se han vinculado a la infección sífilítica, son especificados por la reacción que nos ocupa demostrando que existen casos realmente achacables a esta infección, pero que existen otras causas que son capaces de ocasionar abortos totalmente alejados de la lues.

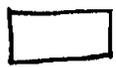
5º - Hemos entresacado un grupo de niños, todos mayores de seis meses de edad, cuyas madres ciertamente sífilíticas no efectuaron tratamiento profiláctico prenatal, y acusaron respectivamente, los que dieron serologías negativas un 13,1 % de positividad al T.P.I., y los que proporcionaron serología reagínica positiva un cien por cien.

Figura n° 1

Porcentajes globales de Test's de Nelson
y serologías en los mismos
sueros examinados



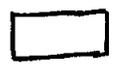
serologías negativas



serologías positivas (arco exterior)



T.P.I. positivos.



T.P.I. negativos (arco central)

Figura nº 2
Test de Nelson y Mayer agrupados por centros

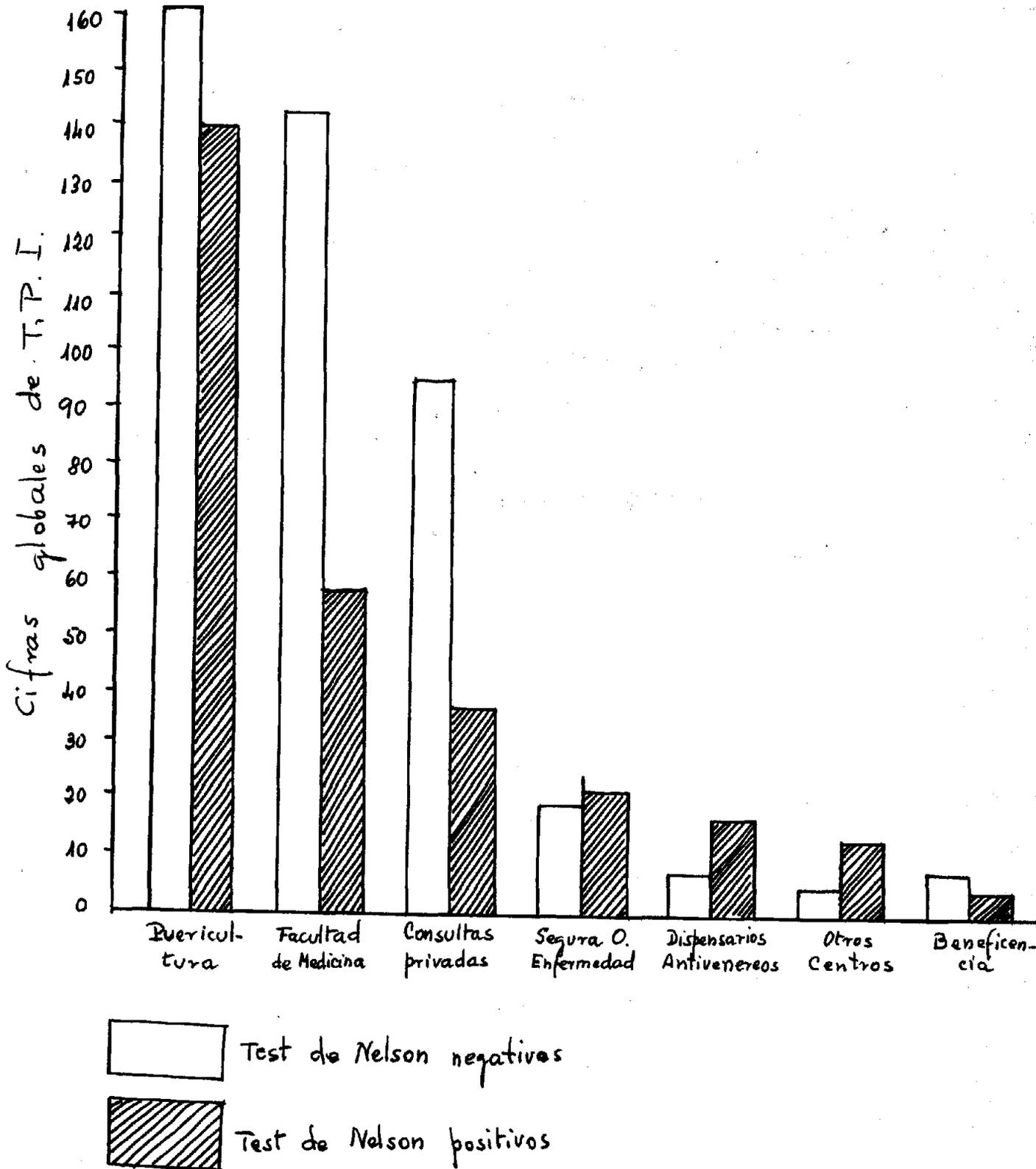
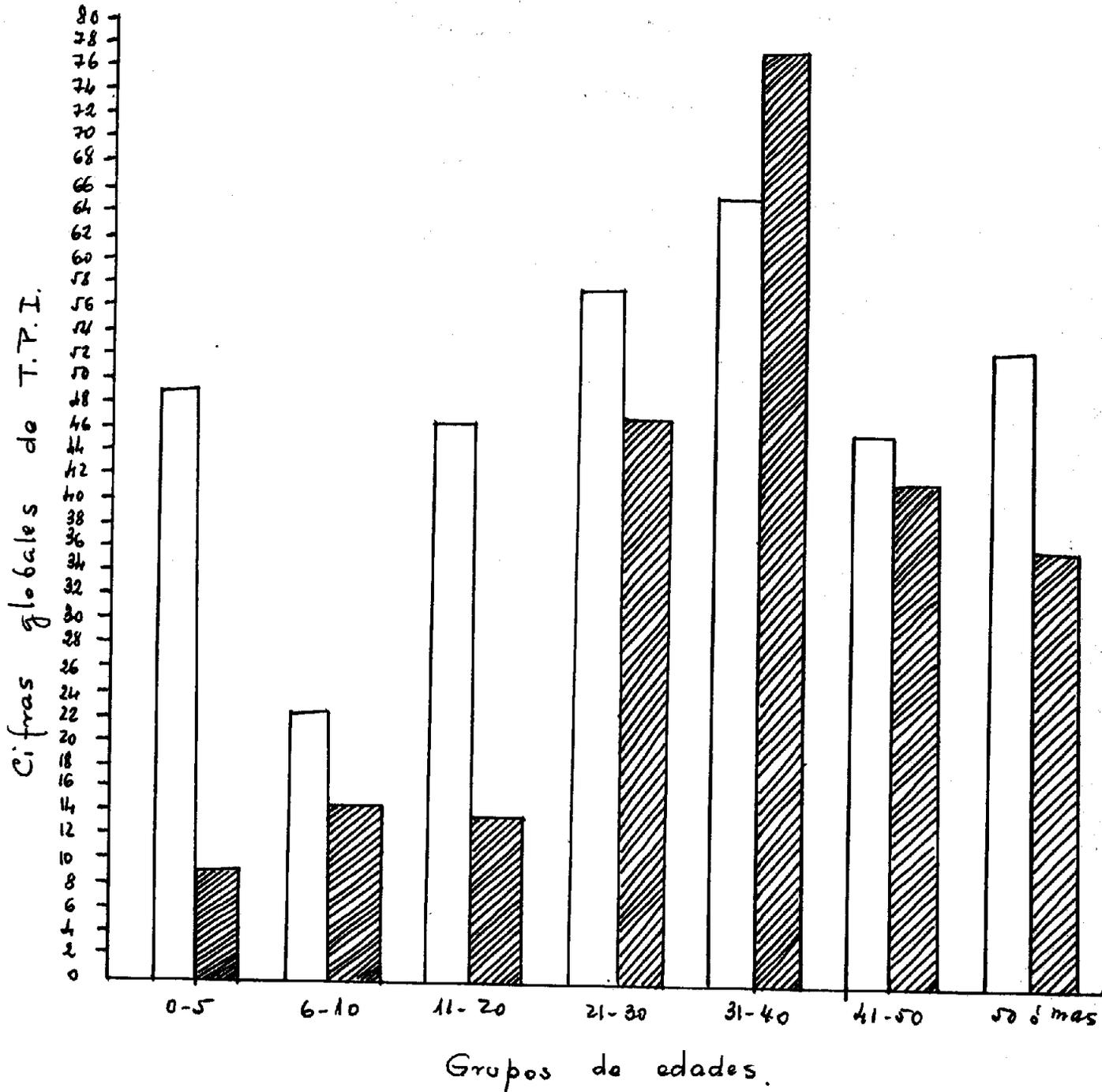


Figura nº 3

Test de Nelson y Mayer agrupados por edades.



Test de Nelson negativos

Test de Nelson positivos.

CONCLUSIONES

Según lo referido anteriormente creemos, se pueden sacar las siguientes:

1º - Hemos encontrado en el hombre una positividad serológica falsa en una serie de enfermedades, debidas a diferentes causas que conviene tener en cuenta para el posterior tratamiento del enfermo. Estas enfermedades son: Lepra (enfermedad microbiana); Hepatitis infecciosa y mononucleosis infecciosa (enfermedad por virus); Leptospirosis (enfermedad por espiroquetas); Paludismo (enfermedad por protozoarios).

2º - Hemos podido comprobar que la orquitis sifilítica se desarrolla mejor, en la inoculación con la cepa Nichols, en conejos que previamente han hecho copula, por lo que nosotros, programamos poner en contacto la hembra y el macho, siete días antes de la inoculación del último.

3º - Los ensayos verificados por nosotros, coinciden plenamente con los efectuados por Dardanoni, siendo los anticuerpos inmovilizantes los últimos que aparecen de la triada formada por los anticuerpos antilipoides, antitreponémicos de grupo e inmobilizante. En cambio la precocidad de la aparición de los anti-

cuerpos treponémicos de grupo, varia en nuestro Laboratorio en un tiempo más largo que en el expuesto por Dardanoni: Según nosotros tiene lugar después de las 48 horas de la inoculación. Dardanoni dá 24 horas.

4° - Desechamos, por creerla superflua la práctica de tratar a los animales que se van a inocular con mostaza nitrogenada, Rayos X, o Cortisona, para bloquear la aparición de los anticuerpos sífilíticos. Creemos que no es necesaria esta medida ya que el tiempo de inoculación, es suficientemente precoz.

5° - Según muchos autores, entre los que podemos citar Nelson y Mayer, la temperatura a que han de estar sometidos los conejos inoculados no ha de sobrepasar los 20 grados, ya que en caso contrario la incubación se llevaría a cabo de manera defectuosa. Nosotros hemos hecho un total de 64 experiencias, sosteniendo a los animales a temperaturas muy superiores que a veces han alcanzado hasta los 40 grados.

Los resultados entresacados entre todos, han quedado expuestos anteriormente, y podemos aseverar que no se ha notado ninguna diferencia entre estos y los testigos inoculados y sometidos a temperaturas consideradas como ortodoxas. Para esta experiencia hemos puesto a los animales a las temperaturas estivales de nuestro clima. Los treponemas eran perfectamente móviles, patógenos y la riqueza de la cepa en nada se diferenciaba en la habitual hallada en todos los laboratorios y por nosotros mismos.

6º - El tiempo de la incubación de la orquitis, es decir, desde que se inocular hasta que se sacrifica, es motivo de diferencias entre los diversos laboratorios practicantes del Test de Nelson y Mayer. Nosotros, sacrificamos a los 7 días de la inoculación con resultados magníficos, probablemente debido a la serie de fenómenos temperamentales de los conejos usados por nosotros, y condiciones climatológicas, a que anteriormente nos hemos referido.

7º - Las dificultades que entraña la preparación del medio de supervivencia de Nelson, nos han hecho intentar buscar uno que supliera a este sin causar efectos nocivos para el treponema. Hemos conseguido poner en marcha la reacción con un medio de supervivencia que está compuesto por suero de conejos estéril, no hemolizado y solución salina al 9 %, con el que los resultados obtenidos han sido tan satisfactorios como cuando se ha usado el medio de Nelson. Ha sido laboriosa la búsqueda de la concentración óptima de la solución salina según ha quedado referido anteriormente; de todas las pruebas verificadas, solamente el suero de conejo ha dado resultados óptimos, y por ello lo preferimos al obtenido del cobaya, perro, gato, etc. La supervivencia ha quedado expuesta en gráficos, pudiéndose comprobar que es ligeramente superior a la encontrada en el medio de Nelson. El suero de conejo se ha de obtener por punción cardíaca, centrifugado a 6.000 revoluciones por minuto, durante 1/4 de hora, dejando previamente la sangre total obtenida en estufa a 37 grados hasta que se forme el coágulo, con el fin de evitar así la hemólisis. Se inactiva el suero en baño de María a 56 grados durante una hora, repitiendo esta operación 4 días seguidos. La solu-

ción salina se esteriliza en autoclave a 2 atmósfera. La adición de algunas sustancias (Thioglycollate, por ejemplo) a este medio no aumenta el rendimiento en supervivencia del treponema. Los resultados obtenidos en pruebas dobles, usando los dos medios de supervivencia, han ido siempre acordes.

8° - Al utilizar el medio de Nelsen, se presenta la dificultad de su esterilización; no pueden utilizarse los medios usuales, porque destruyen algunas de las sustancias que entran en su composición que son termolabiles. Por ello hay que filtrarlo, acarreado esto serios inconvenientes, salvados por nosotros con la utilización de las bujías de Chamberlan 1-5, con succión de bomba de vacío en un matras Kitasato. La prueba del filtrado que verificamos sistemáticamente, ha sido siempre negativa. Este control se hace, sembrando en Agar-Agar y caldo común.

9° - Las experiencias hechas con el T.P.I. y las leptospiras en lotes de animales bajo diversas condiciones, demuestran que las alteraciones observadas en los cultivos practicados con suero de conejo para las leptospiras, no están en relación con la seropositividad falsa de los sueros, y que las inoculaciones practicadas con la cepa Nichols en animales sanos, responden perfectamente a la incubación, a pesar de que tengan serología positiva fuertemente, aunque inespecíficos.

10° - La episcotia conocida por mixomatosis no interfiere la aparición de las orquitis según hemos podido observar en el curso de una epidemia habida entre nuestros animales. La única sal

vedad estriba en que es posible que muera el animal por una enfermedad intercurrente dada la baja natural de defensa que en ese periodo de la enfermedad tiene el animal.

11° - La supervivencia del treponema pallidum en el medio de Nelson conservado en nevera a menos 20 grados es óptima, si no sobrepasa los treinta días. A partir de esta fecha, el porcentaje de inmovilización inespecífica se va haciendo cada vez mayor, en contra de la opinión sustentada por otros autores.

12° - En lo que se refiere a los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en la lucha emprendida, por la Dirección General de Sanidad contra la lues, podemos afirmar según queda reflejado por los resultados anteriormente expuestos, que el porcentaje de enfermos sífilíticos en nuestra provincia es superior al que se sospecha. En el "screening" practicado para el despistaje de esta infección en grandes masas de población se ha podido comprobar que el tanto por ciento de positividad oscila de 10-12 %. Por ello creemos oportuna y necesaria una lucha contra esta enfermedad concebida en gran escala.

La utilización del Test de Nelson ha venido a resolver el diagnóstico en una serie de casos, que antes o pasaban desapercibidos, o las reacciones serológicas daban resultados negativos, a pesar de estar el enfermo con la lues en actividad. Coincidimos con el resto de los laboratorios practicantes del T.P.I. que ésta reacción es imprescindible en los casos siguientes:

- 1º - Enfermos con serologías discordantes. Algunas de las reacciones reagínicas y desviación de complemento positivas y otras negativas. También en enfermos que dan resultados positivos y negativos en todas las reacciones en poco intervalo de tiempo.
- 2º - Desacuerdos entre la clínica y los resultados del laboratorio.
- 3º - En enfermos sospechosos de heredolues.
- 4º - En enfermos con lues en los periodos secundarios y terciarios, sobre todo utilizando el T.P.I. cuantitativo para seguir la marcha y eficacia de los tratamientos.
- 5º - En enfermos afectos de lues nerviosa y visceral.
- 6º - En aquellas enfermedades que pueden dar resultados positivos inespecíficos en la serología clásica. Por ejemplo: palúdicos, leprosos, enfermedades hepáticas, etc.
- 7º - Para comprobación del suero de los animales de laboratorio, que según hemos dicho anteriormente, tienen las reacciones serológicas positivas, en el caso de usar sus sueros para alguna otra reacción de laboratorio que pudieran enmascarar la presencia de los anticuerpos sífilíticos reales.

En la sífilis primaria es inútil su uso, ya que presenta los mismos errores que las reacciones de Wassermann, V.D.R.L., Meinicke, Kahn, etc. y resulta mucho más costosa. En estos casos utilizamos, mientras nos sea posible la investigación de una gota del exudado del chancro sospechoso, el microscopio montado con condensador de fondo oscuro.

13º - Toda el agua destilada utilizada para la reacción del Test de Nelson y Mayer ha de estarlo por aparatos de cristal neutro, ya que sino puede interferir la reacción.

14º - El producto más inestable de los que componen el medio de Nelson, es el Thioglycollato de sosa, pues se reduce con facilidad en contacto con el aire. Pasa de un polvo color blanco, a amarillento cuando está en malas condiciones. Hemos intentado aprovecharlo sin resultados positivos. En estos casos, hay que desechar el bote original y utilizar uno nuevo y precintado. Nosotros guardamos este reactivo en atmósfera de CO₂ y N₂, en las mismas proporciones que lo usamos para el Treponema, y dejamos el desecador en nevera a + 5 grados.

Sevilla 8. de Novre. de 1958.

Juan Aranda

BIBLIOGRAFIA

- 1 - AJELLO G. et all.- (1954). Amer J. of Syph. 38, 288.
- 2 - BERMUDO FERNANDEZ, J.- (1956). Acta Clínica T. IX, Fasc. III.
págs. 2.509-2.514.
- 3 - BERMUDO FERNANDEZ, J.- (1956). Laboratorio. Febrero, 101-112.
- 4 - BERMUDO FERNANDEZ, J.- (1956). Hispalia Médica.
- 5 - BOAK R.A. & MILLER J.N.- (1954). Amer J. of Syph. 38. 429.
- 6 - CHAKO C.W., YOGINEARI L. & GOPALAN K.N.- (1956). Washington D.C.
pág. 41.
- 7 - CASTRILLON, F.G.- (1956). V - I - 1 - 17.
- 8 - CIRERA M.P.- (1954). Ann. Biolo. Clinique. Mayo -Junio.
- 9 - DAGUET. G.L.- (1953). Nouvelles américaines concernant le test d'immobilisation des treponemes. Le T.P.I. Test de Nelson-Mayer. Chag
py ed. Paris.
- 10 - DELACRETAZ, J.- (1953). Ann. Derm. Syph (Paris) 80. 501.
- 11 - DELECRETAS, J.- (1956). Dermatológica 112, 377.
- 12 - DEMANCHE, R.- (1952) Précis de technique du sero-diagnostic de la
Syphilis. Doin et Cie. Ed. (Paris).
- 13 - D'Alessandro G., Dardanoni L.- (1952). Riv. Ist. Sieroter. Italiano,
28, 153.
- 14 - D'ALESSANDRO D., DARDANONI L.- (1953). Amer J. of Syph a. Ven. Dis. 37,
137.

- 15 - D'ALESSANDRO G., ODDO F., COMES R., DARDONINI L.- (1949). Riv. Ist. Sierot. Italia. 24.
- 16 - DUREL P., Borel L - J., SAUSSE A. - (1952). Concours Med. (10). 858 - 60.
- 17 - DESBORDS, J. DELAUNAY R.A.- (1950). Presse Medicale 58-(64) no17-28.
- 18 - DAOLAS P., BEAUCHESNE R.- (1949). Bull. de la Soc. Fr. Derm. Janvier.
- 19 - DARDANONI, L.- (1955). Rev. Ist. Sierot. Italiano. Vol. 30,6,414.
- 20 - DARDANONI, L., ZAFFIRO P.- (1953). Minerva Med. Vol. II. 3.
- 21 - DIAGNOSTICO BIOLOGICO.- (1957). Vol. VI. n° 5.343.
- 22 - ESTRADA CAMUÑEZ, J.- (1947). El Laboratorio en las enfermedades venéreas. Salvat ed.
- 23 - FLOCH H., y col. (1953). Memoria del VI Congreso Internacional de Leprología. (Madrid).
- 24 - FRIBOURG-BLANC, A.- (1957). Anna. Dermat. et Syph. 84. 3. 286.
- 25 - FRIBOURG-BLANC, A.- (1957). Anna. Dermat. et Syph. 84. 4. 410.
- 26 - GREIFELT A., GREGORCZYK K., & DEEPPNER R.- (1954). Arch. Derm. Syph (Berlin). 197. 105.
- 27 - GATE J., ROUSSET J., & COUDERT J.- (1953). Congreso Internacional de Leprología. Madrid.
- 28 - GELPERIN A.- (1951). Amer. J. of Syph. 35. 1.
- 29 - JEANSELME, R.- (1931). Traite de la Syphilis. Deoin & Cie. Ed.
- 30 - JAULMES CH. et col.- (1958). Pratique du Laboratoire. Madden Ed. (Paris).
- 31 - KULLB ET HETSCH.- (1918). La Bacteriologie Experimentale. Deoin & Cie. Edit. (Paris).
- 32 - KOLMER & TUFT.- (1946). Inmunología Clínica. Buenos Aires.
- 33 - KRAG, P.- (1957). Statens Seruminstitut Copenhagen. Comunicación Personal.
- 34 - KOLMER, J.A.- (1957). The Labora. Digest. Vol. 20, n° 10.

- 35 - LAZARO J., BERNUDO J.- (1956). Laboratorie X - 301.
- 36 - LAMBRICA G., ROBER L.- (1957). L'Igiene Moderna V - I - 5 - 6.
- 38 - LUNDBECK, H.- (1952). Act. Soc. Médic. Upsaliensis. T. VI.
- 39 - LLINAS, J.- (1953). Laboratorie XV. 88. 313.
- 40 - MILGROM F., BEKIERKUNST A.- (1950). Revue D'Immunologie T. XIV. n° 3.
- 41 - MULZER P., HAHN G.F.- (1930). Arch. Hyg. T. 103 - 95.
- 42 - MAGNUSON H.J., THOMPSON F.A.- (1949). J. Vener. Dis. Inform. 30-309.
- 43 - MATILLA V., LASTRA J.- (1956). Técnica Bact. y Parasitológica. Harben Ed. Madrid.
- 44 - MORALES J., CONEJO J., BERNUDO J.- (1957). Rev. San. e Hig. P. Enero-Febrero.
- 45 - NELSON R.A. jr.- (1952). Hautarzt 3. 436.
- 46 - NELSON R.A. jr.- (1948). Amer J. Hyg. 48. 120.
- 47 - NELSON R.A. jr.- (1949). & Mayer, M.M. J. Exp. Med. 89, 369.
- 48 - NELSON R.A. & Diesendruck J.A., (1951) J. Immunol. 66. 667.
- 49 - NELSON R.A., jr.- (1952). Presse Medicale 60. 1719.
- 50 - NICHOLS, H.J. & HOUGH W.H.- (1913). J. Amer. Med. Ass. 60. 108.
- 51 - NIELSEN, H.A. & REIN A.- (1956) Bull. Wld. Hlth. Org. 14, 263, 288.
- 52 - NIELSEN, H.A.- (1957). Act. Pat. et Microb. Scandinav. Vol. XI. 119 - 135.
- 53 - NIELSEN H.A.- (1955). Statens Seruminstitu Copenhagen. Comisión Personal.
- 54 - NIELSEN H.A.- (1953). Nature (London) 171. 1030.
- 55 - NEURATH H., VOLKIN E., CRAIG H.W. ERICKSON J.O.- (1947). Am. J. of Syph. Gon. and Ven. Dis. 31. 436.
- 56 - PISU I., MAFROMATTEO L., (1955). Rev. Ist. Sieroter. Italiano Vol. 30, n° 2.

- 57 - PANCOTTO STORE - (1954). Minerva Med. I - 32 - 1103.
- 58 - PERREA M. (1955). L'Igiene Moderna. Enero - Febrero.
- 59 - RANQUE J., MOIGNOUX J.B. & DEPIEDS R. - (1952). C.R. Soc. Biol.
146 - 1.224.
- 60 - RANQUE J., GALLAIS P., DEPIEDS R., et col. (1953). Le T.P.I. Test
de Nelson & Mayer, Masson Ed. (Paris).
- 61 - REIN CH. R., KOSTANT G.H., KALOGS L.C. (1955) The Labor. Digest.
Vol. 19 -5 .
- 62 - RUTH F. (1950). The Canadian J. of M. Techn. Vol 12 - n° 4.
- 63 - Saurino V.R. - (1953). Amer J. Syph 37, 112.
- 64 - SAUSSE A., (1951). Ann. de Biol. Clin. 9 (10) 490.
- 65 - Sausse A., BOREL L.J., (1953). Le T.P.I. test de Nelson & Mayer
Masson Ed. (Paris). Pág. 66.
- 66 - Topley & Wilson. (1953). Bacteriologia e Inmunidad. Salvat Edit.
- 67 - TURNER T.B., & HOLLANDER D.H. (1954). Amer J. Syph 38. 371.
- 68 - TURNER T.B., (1939). J. Exp. Med. 69. 867.
- 69 - THIVOLET J., & ROLLAND M. (1953). Ann. Biol. Cl. 11, 332.
- 70 - VILANOVA X., (1954). Actas Derm. Sif. T.X., I 3-24.
- 71 - VILANOVA X., DULANTO T. de., CATASUS J.M. (1954). Bull. Soc. Fr.
Der. Syph. 61.499.
- 72 - WORLD HEALTH ORGANIZATION (1957). Seventh Collection of reports
From participating laboratories. Krag P.
- 73 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Serie de rapports techniques (1948 y 1950).
- 74 - WORLD HEALTH ORGANIZATION (1956), 15. 863. 1096.
- 75 - WEBER M.M. (1953). Symposium on Recent avances etc. Washington.
-