

CONTRIBUCIONES ORIGINALES

Nuevas técnicas para la detección de anticuerpos séricos contra el antígeno O de *Salmonella typhi*

RAFAEL HERNÁNDEZ-VELARDE*

ONOFRE MUÑOZ*

JOAQUÍN SÁNCHEZ-CASTILLO*

Se describen un sistema de contrainmunolectroforesis (CIE) y un sistema de ensayo enzimático inmuno-específico (ELISA) para la detección de anticuerpos séricos contra el antígeno O de *S. typhi*. Utilizando la CIE, se estableció un título de 1:16 como sugestivo de fiebre tifoidea; cuando se le comparó con la reacción de Widal y la fijación en superficie, se encontró sensibilidad semejante de los tres métodos para discriminar entre los títulos de anticuerpos de la población sana y la de sujetos enfermos. La utilización de ELISA demostró una mayor eficiencia que la CIE para la detección de anticuerpos anti O. La media geométrica del título de anticuerpos fue de 1:5 para la población sana y de 1:50 para los enfermos. Los datos preliminares colocan a la ELISA como una alternativa superior para el diagnóstico serológico de fiebre tifoidea.

ABREVIATURAS:

C.I.E. = Contrainmunolectroforesis

E.L.I.S.A. = Ensayo Enzimático Inmuno-específico

L.P.S. = Lipopolisacárido

r_s = Coeficiente de correlación de Spearman

La fiebre tifoidea continúa siendo un importante problema de salud pública en países donde la enfermedad es endémica.¹ Aunque el diagnóstico definitivo requiere del aislamiento e identificación de *Salmonella typhi* en diferentes materiales biológicos estos procedimientos no proporcionan resultados antes de dos a tres días. La detección y medición de anticuerpos contra antígenos O de *Salmonella typhi* son de gran valor como medio para establecer un

diagnóstico de probabilidad y consecuentemente, la posibilidad de iniciar la terapéutica antimicrobiana antes de la confirmación bacteriológica.

En el momento actual existen varias pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra antígenos O de *Salmonella*.

1) La reacción de Widal,² que ha sido utilizada desde 1896, pero que evidentemente posee varias desventajas, tales como su variabilidad, en relación con la preparación del antígeno, con la técnica de cada laboratorio y con el entrenamiento del personal técnico.³⁻⁶

2) El método de hemaglutinación pasiva,⁷ que aunque de mayor sensibilidad que la reacción de Widal, detecta preferentemente anticuerpos pertenecientes a las inmunoglobulinas M.

3) La prueba de fijación en superficie,^{8,9} que ha sido propuesta como un método más confiable, comparado con la hemaglutinación pasiva y la reac-

* Departamento de Infectología. Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional. Instituto Mexicano del Seguro Social.

ción de Widal; sin embargo, no ha sido aceptada universalmente, por su falta de estandarización, que provoca variabilidad en los resultados obtenidos en diferentes laboratorios.

5) Recientemente, Carlsson y col.¹⁰ han descrito un ensayo-enzimático inmuno-específico (ELISA). Aunque los resultados preliminares han demostrado que la ELISA es específica y de alta sensibilidad, la prueba está a nivel de laboratorio de investigación y los títulos de anticuerpos con significado clínico no han sido establecidos.

Las limitaciones asociadas a las pruebas serológicas habituales han motivado la búsqueda de otros métodos para el diagnóstico de fiebre tifoidea. En la presente comunicación se describe la instrumentación de un sistema de contrainmuno-electroforesis (CIE) y de un sistema ELISA para la detección de anticuerpos contra antígenos O de *S. typhi* en el suero de pacientes con fiebre tifoidea, con el propósito de evaluarlos y seleccionar el más adecuado para su uso en el laboratorio clínico.

Material y métodos

Obtención del lipopolisacárido O de *Salmonella typhi*

El lipopolisacárido O para la CIE y ELISA se preparó a partir de una cepa de *S. typhi* Vi degradada según el método de Westphal y Jann¹¹ y que consiste de los siguientes pasos:

a) Inactivación de los antígenos H con una mezcla de fenol-agua a temperatura elevada; b) extracción y purificación de los lipopolisacáridos de la fase acuosa mediante diálisis y precipitaciones repetidas con metanol y c) centrifugación a alta velocidad para eliminar en el sobrenadante ácidos nucleicos y otros compuestos de bajo peso molecular. El precipitado se disuelve en solución salina y se determina la concentración de carbohidratos.¹²

Identificación del antígeno O purificado

La reactividad serológica y la migración en un campo eléctrico del antígeno O purificado se determinaron por inmuno-electroforesis en agarosa al 0.5% en amortiguador de boratos a pH 8. En estas condiciones y empleando antisuero comercial O Bacto *Salmonella* factor 9 de Difco se obtuvo un solo arco de precipitación desplazado hacia el ánodo.

Muestras de suero

Para la detección de anticuerpos anti O se utilizaron muestras de suero obtenidas de pacientes menores de 16 años con diagnóstico bacteriológico de fiebre tifoidea, en su segunda o tercera semana de evolución. Como testigos se emplearon muestras del suero de 390 individuos sanos, 150 menores de 16 años y el resto mayores de esta edad, colectados para

un estudio seroepidemiológico en la ciudad de México. En cada uno de los enfermos se titularon anticuerpos contra el antígeno somático de *S. typhi* mediante la técnica de Widal y la de fijación en superficie. Los sueros de la población sana fueron titulados únicamente mediante CIE o ELISA.

Contrainmuno-electroforesis

Se utilizó agarosa al 0.5% en amortiguador de boratos a pH 8 como medio de soporte, colocando 10 μ l de los sueros problema del lado del ánodo. Después de aplicar una corriente constante de 10 mA durante 60 min. los pozos para el antígeno se llenaron con 10 μ l del lipopolisacárido a una concentración de 0.01 μ g de LPS/ μ l y se continuó la electroforesis por 30 min. adicionales. Las placas fueron lavadas, secadas, teñidas con amido negro 8 y examinadas para buscar bandas de precipitación.

Ensayo enzimático inmuno-específico (ELISA)

Para la medición de anticuerpos anti O mediante la técnica de ELISA, se utilizó el procedimiento general recomendado por la Organización Mundial de la Salud,¹³ empleando conjugado peroxidasa anti IgG.¹⁴

Resultados

Contrainmuno-electroforesis

a) Detección de anticuerpos contra el antígeno O. La técnica utilizada permitió demostrar la presencia de anticuerpos contra el antígeno O de *S. typhi* en el suero de todos los pacientes analizados (fig. 1).

b) Determinación del título de anticuerpos. Se obtuvieron resultados positivos en el suero de los 20 pacientes estudiados; el título menor y mayor obtenidos fueron de 1:8 y de 1:32 respectivamente, con media geométrica de 1:16.

c) Evaluación intraensayo. La reproducibilidad intraensayo se analizó analizando 20 muestras de suero por quintuplicado en un mismo día, y se evaluó como la media del porcentaje de reproducibilidad de cada muestra, así como con el coeficiente de variación.¹⁵ La reproducibilidad promedio intraensayo fue de 88.6 por ciento, con desviación estándar de 17 por ciento y coeficiente de variación de 0.19.

d) Evaluación interensayo. La reproducibilidad interensayo se evaluó estudiando 20 muestras por duplicado en tres días diferentes y se analizó mediante la prueba de análisis de varianza de Friedman.¹⁶ La evaluación demostró que la variación interensayo fue constante, con valor de 0.19 y "P" menor de 0.5.

e) Correlación de la CIE y la reacción de Widal. El grado de correlación entre los resultados obtenidos en la CIE y la reacción de Widal se calculó mediante el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman.¹⁶ No se encontró correlación entre

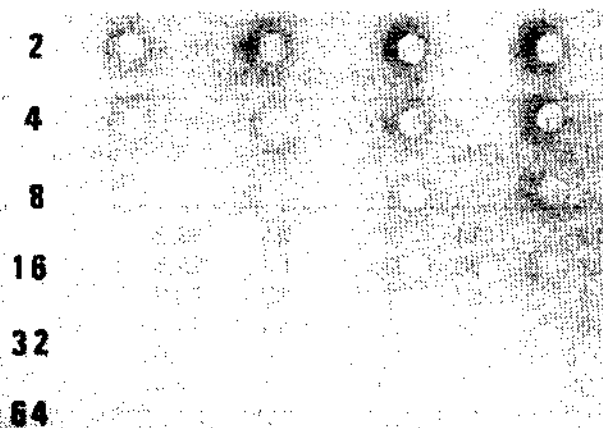


Fig. 1. Contrainmunolectroforesis del suero de cuatro casos de fiebre tifoidea. Las bandas de precipitación son visibles hasta una dilución del suero de 1:32. El cátodo está a la izquierda y el ánodo a la derecha.

las dos pruebas, ya que el coeficiente de correlación fue de 0.21, con "P" mayor de 0.05 (fig. 2). Estos datos están de acuerdo con la variabilidad conocida para la reacción de Widal.

f) Determinación del título de anticuerpos con significado clínico para el diagnóstico de fiebre tifoidea. La determinación de los títulos de anticuerpos en 50 casos de fiebre tifoidea mediante la técnica de CIE y la de Widal (fig. 3), demostró que los títulos van desde 1:8 hasta 1:32 para la primera, en tanto que para la segunda, dichos títulos se extienden desde 1:20 hasta 1:1280. Al comparar los títulos obtenidos con estos mismos sueros mediante fijación en superficie y CIE (fig. 4), se observa que el porcentaje de fijación va desde 40 hasta 100 por ciento.

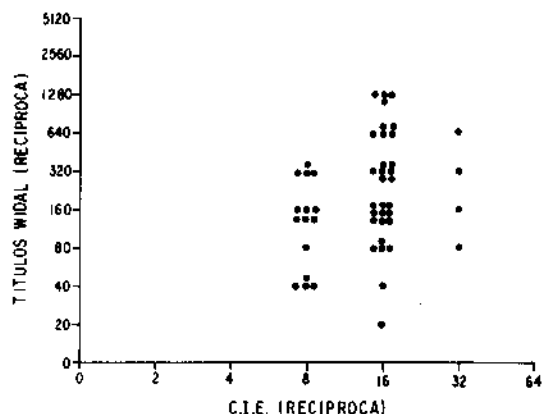


Fig. 3. Diagrama de dispersión mostrando los títulos de anticuerpos en la reacción de Widal y la CIE ($n=50$).

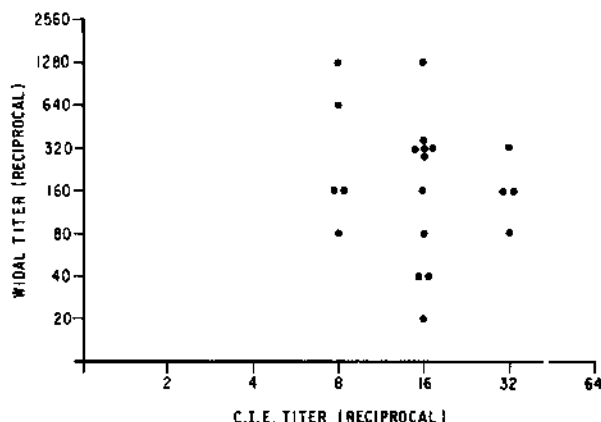


Fig. 2. Diagrama de dispersión mostrando los títulos de anticuerpos en la CIE y la reacción de Widal ($N=20$). Coeficiente de correlación de Spearman, $r_s = 0.21$ ("P" > 0.05).

Los resultados de las tres técnicas se compararon utilizando el coeficiente de concordancia de Kendall (W),¹⁶ y su significación estadística y comparación porcentual con la prueba de χ^2 . El coeficiente de concordancia para las tres pruebas fue de 0.47, con "P" menor de 0.05.

Al analizarse los resultados de la CIE en los 50 enfermos, (cuadro 1), el título de anticuerpos varió de 1:8 a 1:32, mientras que las determinaciones realizadas en los 390 individuos sanos (cuadro 2), mostraron que 12 por ciento de los menores de 16 años y 18 por ciento de los mayores de esta edad mostraban títulos de 1:8, de tal forma que se traslapan con el título mínimo encontrado en los enfermos. Solamente 1.5 por ciento de los individuos sanos

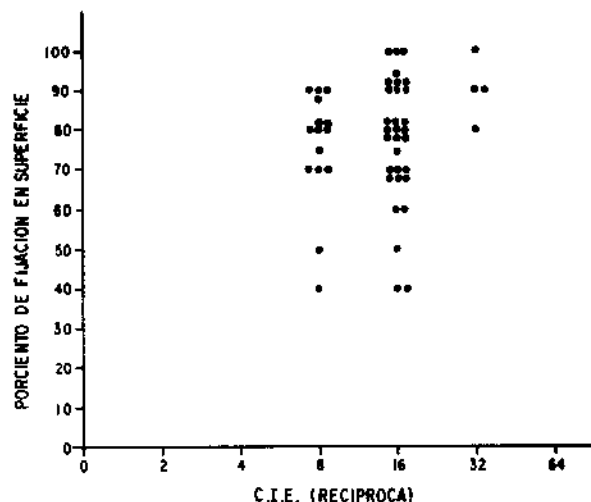


Fig. 4. Diagrama de dispersión mostrando los títulos de anticuerpos en la reacción de fijación en superficie y en la CIE ($n=50$).

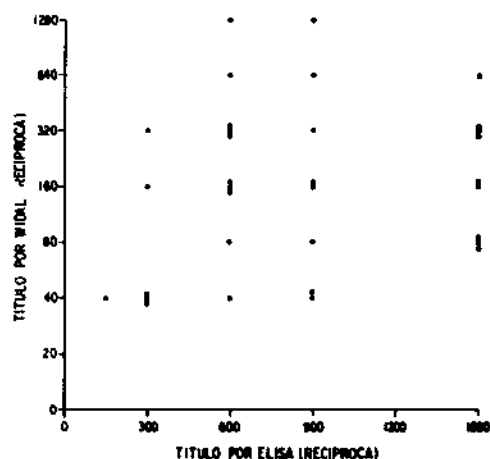


Fig. 5. Diagrama de dispersión de los títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA y la reacción de Widal (N=33). Coeficiente de correlación de Spearman, $r_s = 0.23$ ("p">0.05).

exhibieron anticuerpos a título de 1:16, por lo que pudiera considerarse que si bien títulos de anticuerpos de 1:8 son ya sugestivos de infección reciente o enfermedad, un título de 1:16 tiene menor probabilidad de encontrarse en individuos sanos. Por lo tanto, puede tomarse como el título de anticuerpos diagnóstico de enfermedad con esta técnica.

Ensayo enzimático inmunoespecífico (ELISA)

Los experimentos preliminares con ELISA para la detección de anticuerpos anti O en fiebre tifoidea han permitido obtener los resultados que se describen a continuación.

a) *Determinación del título de anticuerpos.* Se obtuvieron resultados positivos en el suero de 33 pacientes estudiados. El título menor fue de 1:150 y el mayor de 1:1500, con media geométrica de 1:750. Los títulos de anticuerpos encontrados en el suero

Cuadro 1. Títulos de anticuerpos contra el antígeno somático de *S. typhi* por C.I.E. en 50 casos de fiebre tifoidea.

Título C.I.E.	No.	%
Neg	—	—
1:2	—	—
1:4	—	—
1:8	15	30
1:16	31	62
1:32	4	8
Total	50	100

Cuadro 2. Títulos de anticuerpos contra el antígeno somático de *S. typhi* por C.I.E. en 390 individuos sanos.

Título C.I.E.	<16 años		>16 años		Porcentaje del total (n=390)
	No.	%	No.	%	
Neg.	34	22.7	44	18.3	20
1:2	39	26.0	55	22.9	24.1
1:4	57	38.0	92	38.3	38.2
1:8	18	12.0	44	18.3	15.8
1:16	2	1.3	4	1.6	1.5
1:32	0	0	1	0.4	0.25

de los individuos sanos fueron de 1:25 a 1:300, con media geométrica de 1:75.

b) *Evaluación inter e intraensayo.* Aunque por ahora la reproducibilidad del sistema sólo se ha evaluado analizando las muestras por duplicado, los resultados preliminares indican una buena reproducibilidad del mismo.

c) *Correlación de ELISA y la reacción de Widal.* El análisis de los valores de titulación obtenidos en los sueros de los enfermos mediante ELISA y la reacción de Widal demostró falta de correlación entre las dos pruebas, obteniéndose un coeficiente de correlación de Spearman (r_s), de 0.23, con "P" mayor de 0.05¹⁶ (cuadro 4).

d) *Determinación del título de anticuerpos con significado clínico para el diagnóstico de fiebre tifoidea.* El título de anticuerpos por ELISA en los 33 enfermos mostró variación entre 1:150 y 1:500, (cuadro 3), en tanto que las determinaciones realizadas en 15 individuos sanos (cuadro 4) mostraron títulos entre 1:25 y 1:300.

Discusión

Aunque los métodos serológicos han sido de valiosa ayuda para el diagnóstico clínico, conviene recordar que por sí solos no constituyen evidencia suficiente para establecer si un paciente sufre una infección determinada. La detección de anticuerpos

Cuadro 3. Títulos de anticuerpos contra el antígeno somático de *S. typhi* por ELISA en 33 casos de fiebre tifoidea.

Título ELISA	No.	%
1:150	1	3
1:300	5	15.15
1:600	10	30.3
1:900	8	24.24
1:1500	9	27.27

Cuadro 4. Títulos de anticuerpos contra el antígeno somático de *S. typhi* por ELISA en 15 individuos sanos

Título ELISA	No. casos	Porcentaje del total (n=15)
1:25	3	20
1:50	5	33
1:100	3	20
1:150	2	13
1:300	2	13

séricos sólo indica que el sujeto ha sido estimulado para producirlos debido a infecciones pasadas o presentes, vacunación o reinfecciones subclínicas y estas situaciones pueden provocar elevación de anticuerpos semejante a la observada en el curso de la enfermedad. La interpretación serológica en la fiebre tifoidea se ha visto complicada por varios factores, tales como: a) variabilidad individual en la magnitud de la respuesta inmune; b) identidad inmunológica del antígeno somático de *S. typhi* con otras salmonellas, especialmente del grupo D; c) existencia de anticuerpos en poblaciones donde la enfermedad es endémica; d) elevación de anticuerpos después de la vacunación, en ocasiones hasta niveles semejantes a los observados durante la enfermedad y e) los problemas relacionados a las técnicas serológicas mismas.

La técnica de CIE aplicada a la identificación de anticuerpos contra el antígeno somático de *S. typhi*, estandarizada con base en el contenido de carbohidratos, mostró una buena reproducibilidad en las pruebas intra e interensayo. Sin embargo, no tuvo la suficiente sensibilidad para discriminar entre 15 por ciento de la población sana y los sujetos enfermos. Los títulos mínimos de anticuerpos sugestivos de fiebre tifoidea en las pruebas de Widal y de fijación en superficie han sido determinados previamente y corresponden a 1:160 y 60 por ciento respectivamente. Considerando 1:16 como el título diagnóstico mediante CIE, la comparación de las tres pruebas mostró su semejanza en cuanto a la capacidad para detectar anticuerpos anti O, si bien la fijación en superficie tuvo mayor sensibilidad.

La aplicación de ELISA para la detección de anticuerpos contra el antígeno O de *S. typhi* ha demostrado ser una prueba sensible, reproducible, fácil de realizar y con una mayor diferencia entre el título de anticuerpos obtenidos en los enfermos y en la población sana. Existe un porcentaje de la población sana cuyos títulos máximos se superponen con los

títulos mínimos obtenidos en los enfermos. Esto, sin embargo, es un problema inherente a las pruebas serológicas, ya que depende de la capacidad individual para la producción de anticuerpos. Hasta ahora no se han encontrado títulos de anticuerpos mayores de 1:300 en la población sana ni menores de 1:600 en sujetos enfermos. Los resultados obtenidos con ELISA son muy alentadores y permiten postular que esta técnica representa una alternativa superior a las pruebas empleadas hasta ahora para el diagnóstico serológico de fiebre tifoidea.

REFERENCIAS

- Gutiérrez, C.; Coll, R.; Cerda, M. S. y Muñoz, O.: *Seroepidemiología de la fiebre tifoidea en la República Mexicana*. GAC. MÉD. MÉX. 111: 97, 1976.
- Widal, F.: *Serodiagnostic de la fièvre typhoïde*. Bull. Soc. Med. Hosp. (Paris) 13: 561, 1896.
- Reynolds, D. W.; Carpenter, R. y Simón, W. II.: *Diagnostic specificity of Widal's test reaction for typhoid fever*. JAMA 214: 2192, 1970.
- Levine, M. M.; Grados, O.; Gilman, R. H.; Woodward, W. E.; Solís-Plaza, R. y Waldman, W.: *Diagnostic value of the Widal test in areas endemic for typhoid fever*. Amer. Soc. Trop. Med. Hyg. 27: 795, 1978.
- Anónimo: *Typhoid and its serology*. Brit. Med. J. 1: 389, 1978.
- DeVillier, A. B.; Deuprice, R. H.; Dickinson, C. y Bacler, M. F.: *Comparative study of typhoid O antigens*. Amer. J. Clin. Pathol. 44: 410, 1965.
- Neter, E.: *Bacterial hemagglutination and hemolysis*. Bacteriol. Rev. 20: 166, 1956.
- Muñoz, O.; Alvarez, M. T.; Ruiz-Gómez, J. y Gutiérrez, C.: *Estudio comparativo de las reacciones de aglutinación y de fijación en superficie en el diagnóstico de la fiebre tifoidea*. GAC. MÉD. MÉX. 109: 253, 1975.
- Ruiz-Castañeda, M.: *Surface fixation. A new method of detecting certain immunological reactions*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73: 46, 1950.
- Carlsson, H. E.; Lindberg, A. A.; Hammarstrom, S. y Ljunggren, A.: *Quantitation of Salmonella O-antibodies in human sera by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Int. Arch. Allergy Appl. Immun. 48: 485, 1975.
- Westphal, O. y Jann, K.: *Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure*. En: *Methods in carbohydrate chemistry*. Whisler, R. L. (Ed.). Nueva York, Academic Press Inc. 1965, vol. 5, p. 83.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. H.; Rebers, P. A. y Smith, P.: *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Anal. Chem. 28: 350, 1956.
- Voller, A.: *The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)*. Bull. WHO. 54: 129, 1976.
- Avrameas, S.: *Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde*. Immunochemistry 6: 43, 1969.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J.: *Non-parametric methods in lieu of two way ANOVA*. En: *Biometry*. San Francisco, W. H. Freeman Co. 1969, p. 397.
- Siegel, S.: *Estadística no paramétrica*. 2a. ed. México, Ed. Trillas. 1972, p. 233.