

**Titulo** Neurosífilis en pacientes con infección por VIH. Evaluación de la respuesta al tratamiento mediante la detección del ADN que codifica la proteína de membrana de 47 kDa del *T pallidum* en LCR por la reacción en cadena de la polimerasa

**Autor** Jose M Bordon Ferreyra

**Centros** Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Xeral de Vigo,  
Universidad de Santiago de Compostela.

Departamento de Medicina Interna  
Hospital de Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona

**Directors de Tesis** Doctor Cesar Martinez Vazquez  
Jefe de Sección de Medicina Interna  
Jefe de la Unidad de Enfermedades Infecciosas  
Hospital Xeral de Vigo  
Profesor asociado de la Facultad de Medicina.  
Universidad de Santiago de Compostela

**Tutor** Doctor Jaume Guardia I Masso  
Jefe del Departamento de Medicina Interna  
Hospital General Universitaria Vall d'Hebron  
Universidad Autónoma de Barcelona

**Directors de Tesis** Doctor Cesar Martinez Vazquez  
Jefe de Sección de Medicina Interna  
Jefe de la Unidad de Enfermedades Infecciosas  
Hospital Xeral de Vigo  
Profesor asociado de la Facultad de Medicina.  
Universidad de Santiago de Compostela

**26 de Febrero de 2000**

## **Dedicacion**

Dedico este trabajo con todo mi amor a mi esposa Elda. Elda es mi gran companera y la fuente de energia durante todos estos anos de mi vida. Tambien dedico este trabajo a mi hijo Jose Maria, mi padre Jose Maria, mi madre Haydee y mi hermano Abel. Todo el tiempo y esfuerzo realizado en este trabajo nunca llegaran a compararse con el amor que recibi de Elda, mi hijo, mis padres y hermano.

## **Agradecimiento**

Mi mas sincero agradecimiento al Doctor Profesor Cesar Martinez Vazquez por su constante apoyo durante mi trabajo de tesis. A Cesar debo gran parte de mi experiencia clinica y cientifica. En Cesar encuentre un Director de Tesis y tambien un gran amigo, a quien admiro por sus dotes como Clinico y Cientifico. Mis logros como medico y cientifico asi como aquellos que en el futuro podrian llevarse a cabo en gran parte reflejaran la formacion adquirida bajo la direccion de Cesar. En pocas palabras, me siento orgulloso de ser un discipulo del Doctor Cesar Martinez Vazquez.

Mi mas sincero agradecimiento al Doctor Profesor Jaume Guardia I Masso por su apoyo como tutor de esta tesis. El Doctor Profesor Jaume Guardia me brindo la oportunidad de llevar a cabo este trabajo. Mi trabajo no hubiese sido posible sin su participacion.

Tambien, mi mas sincero agradecimiento al Doctor Javier de la Fuente, Doctor Bernardo Sopena, Doctor Antonio Ocampo Hermida, Doctora Teresa Rodriguez Sousa, Doctor Maximiliano Alvarez Fernandez, Doctora Teresa del Blanco y Jesus Nunez Torron, Veterinario, por el apoyo recibido en mi trabajo de tesis.

Finalmente, quiero agradecer al Fondo de Investigacion Sanitaria por la ayuda financiera (Beca FIS 941315); a todo el personal medico y no medico del Hospital Xeral de Vigo; al Doctor Julio Cabrera del National Institute of Health, Bethesda, USA y a todos los pacientes que participaron en este trabajo. A todos ellos, mi mas sincero agradecimiento por el apoyo recibido en este trabajo.

## **Colaboradores (Hospital Xeral de Vigo)**

Javier de la Fuente Aguado  
Doctor en Medicina  
Especialista en Medicina Interna  
Adjunto del Servicio de Medicina Interna

Bernardo Sopena  
Doctor en Medicina  
Especialista en Medicina Interna  
Adjunto del Servicio de Medicina

Antonio Ocampo Hermina  
Doctor en Medicina  
Especialista en Medicina Interna  
Adjunto del Servicio de Medicina Interna

Teresa Rodriguez Souza  
Especialista en Analisis Clinico  
Adjunto del Seccion de Microbiologia  
Unidad de Laboratorio e Investigacion

Jesus Nunez Torron  
Veterinario  
Unidad de Enfermedades Infecciosas



<b>1. Introducción</b>	<b>8</b>
1.1. Sífilis, comentario general	8
1.2. Fisiopatogenia de la sífilis	11
1.2.1. Estudio sobre la historia natural de la sífilis	13
1.2.2. <i>T. Pallidum</i> , características moleculares e inmunogénicas	16
Neurosífilis	19
1.2.3. Neurosífilis en pacientes no infectados por VIH	19
1.2.4. 1.2.4.1. Pruebas de laboratorio en el diagnóstico de la neurosífilis	22
1.2.5. Sífilis y neurosífilis en pacientes con infección por VIH	24
1.2.6. Diagnóstico de la neurosífilis en pacientes con infección por VIH	30
1.4. Infección por el VIH-1	31
1.4.1. VIH-1	31
1.4.2. Historia natural e inmunopatogénesis de la infección por el VIH	34
1.4.2.a. Mecanismos patogénicos del VIH-1	37
1.4.2.b. Mecanismos neuropatogénicos del VIH-1	38
1.4.2.c. Complicaciones tardías del SNC por el VIH-1	40
1.4.2.d. Neurosífilis en la era del tratamiento antiretroviral altamente efectivo	42
1.5. Estudios sobre la técnica de la PCR en la detección del ADN de la proteína de membrana de 46 Kda del <i>T. Pallidum</i>	42
1.6. Objetivo del presente estudio	47
<b>2. Material y Métodos</b>	<b>48</b>
2.1. Pacientes	48
2.1.a. Estudio de la prevalencia de la neurosífilis en la población de pacientes con infección por VIH-1	48
2.1.b. La segunda parte del estudio correspondió a la evaluación del tratamiento de la neurosífilis mediante la PCR y el prueba de infectividad en conejos	49
2.2. Técnicas de laboratorio	51
2.2.a. Pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por VIH-1	51
2.2.b. Pruebas serológicas para el diagnóstico de sífilis	51

2.2.c.	Técnica de PCR para la detección del ADN de <i>T. Pallidum</i> en LCR	52
2.2.c.a.	Preparación de las muestras de líquido cefalorraquídeo	52
2.2.c.b.	Amplificación del ADN diana de la proteína de 47 kDa de la membrana del <i>T. Pallidum</i>	52
2.2.c.c.	Análisis de los productos de la amplificación	53
2.2.c.d.	Control de calidad	53
2.2.d.	Prueba de infectividad en conejos	54
2.3.	Análisis estadístico	54
<b>3.</b>	<b>Resultados</b>	<b>55</b>
3.1.	Estudio de la prevalencia	55
3.2.	Evaluación de la eficacia del tratamiento de la sífilis	59
3.2.a.	Evaluación inicial	59
3.2.b.	Detección del ADN de la proteína de membrana de 47 kDa del <i>T. pallidum</i> en LCR mediante PCR	59
3.2.b.a.	Sensibilidad de la PCR	59
3.2.c.	Prueba de infectividad en conejos (PIC)	60
3.2.d.	Seguimiento de los pacientes con infección por VIH y sífilis	61
<b>4.</b>	<b>Discusión</b>	<b>62</b>
4.1.	Estudio de la prevalencia	62
4.2.	Evaluación del tratamiento de la sífilis en pacientes con infección por VIH-1	65
4.2.a.	Evaluación de la PCR en la detección del ADN de la proteína de membrana de 47 kDa del <i>T. Pallidum</i>	67
4.2.b.	Evaluación del PIC	68
<b>5.</b>	<b>Conclusiones</b>	
5.1.	Prevalencia de la Neurosífilis en los pacientes con infección por VIH-1	69
5.2.	Evaluación del tratamiento de la sífilis mediante la PCR y TIC	69

<b>6. Bibliografía</b>	<b>70</b>
<b>7. Actividades y trabajos originados a partir del presente estudio</b>	<b>80</b>
7.1.a. Beca FIS. Expediente: 94/1315	80
7.1.b. Publicaciones (ver anexo I)	80
7.1.c. Presentaciones en Congresos	80
7.1.d. Revisor de otros trabajos originales	80
7.1.e. Citaciones de nuestras publicaciones	80
<b>8. Anexo I</b>	<b>82</b>
8.1. Copia de publicaciones	82

## **Introduccion**

### **1.1 Sifilis, comentario general**

La sifilis es una enfermedad bacteriana con un especial tropismo por el sistema nervioso central (CNS) que desarrolla importantes complicaciones neurologicas (1). Actualmente, la sifilis es una de la enfermedades pandemicas mas antigua con implicaciones en la salud publica afectando a todos a todos los grupos de edades de nuestra poblacion. La sifilis tambien facilita la transmision de otras enfermedades venereas, esta en clara relacion con la promiscuidad sexual y menos frecuentemente debido a contactos con fluidos corporales asi como tambien por infeccion transplacentaria (2,3)

Clinicamente, la sifilis se distingue por causar una afectacion sistematica con un amplio espectro de manifestaciones clinicas que no infrecuentemente se presenta como un cuadro clinico anodino, lo que le otorga ser considerada “la gran enfermedad simuladora” (1,2). Las manifestaciones clinicas de la sifilis abarca un amplio espectro extendiendose desde un estado totalmente asintomatico a cuadros clinicos graves tales como aortitis sifilitica, demencia y paralisis general (1,2). Sin embargo, la sifilis puede, excepcionalmente, evolucionar a una aparente curacion espontanea como fue comprobado en estudios realizados a lo largo de la primera mitad de nuestro siglo sobre la historia natural de la sifilis (1-4)

El origen de la sifilis es un tema de amplio debate. Una de las teorias mas vigente considera que la sifilis fue transportada desde America a Europa por la tripulacion acompanante de Cristobal Colon, dado que lesiones por “trepanomatosis” se encontraron en esqueletos de Indios de tiempos precolombinos (5). La llamada “lepra” en el siglo XV en Europa fue descrita como una enfermedad altamente contagiosa adquirida por contactos sexuales ademas de ser una enfermedad congenital que respondia al tratamiento con mercurio (6). Si bien la sifilis pudo haber sido confundida con la “lepra”, esta teoria es atractiva pero de dificil confirmacion con los datos disponibles. A partir del siglo XV la sifilis fue reiteradamente reconocida en Europa como causa importante y frecuentemente de morbimortalidad en la poblacion (7).

La documentacion cientifica de la sifilis se inicia en mayor medida al principio del siglo XX con el desarrollo de las pruebas diagnosticas y de las nuevas formas de tratamiento. En el ano 1905, Schaudinn y Hoffman describieron el *T pallidum* como el agente causal de la sifilis al examinar una muestra de una lesion de un chancro con una tincion de Giemsa modificada (7,8). Posteriormente, Coles desarrollo una tecnica en 1909 conocida como campo oscuro que permitio por primera vez describir la caracteristica de movilidad del *T pallidum* (8). En 1906, Wasserman, Neisser y Bruck, tras adaptar una prueba de fijacion del complemento, idearon la primera prueba serologica no treponemica para la sifilis. En esta prueba se utilizo como antígeno el extracto de higado de un recién nacido con sifilis congenita para detectar anticuerpos antitreponema (7,8). En 1907 se llevo a cabo por primera vez el prueba de infectividad en conejos tras la inoculacion del *T pallidum* en conejos por inyeccion intratesticular, tecnica considerada de referencia hasta la actualidad (8). Tambien se habia realizado un estudio de inoculacion en humanos no infectados, pero en aquel entonces no se contaba con suficientes conocimientos sobre el *T pallidum*, ni si disponia de las tecnicas de laboratorio que permitiera obtener informacion concreta de la infeccion (8,9). En los anos siguientes se obtuvo la informacion que la cardiolipina al combinarse con lecitina y colesterol forma un antígeno activo que permitia la deteccion serologica de anticuerpos antitreponemicos. Con esta informacion, Kolmer en 1953 introdujo una prueba de reaccion de floculacion mas sensible, llamada Venereal Disease Research Laboratory (VDRL), prueba serologica que detecta la presencia de fosfatidilcolina del *T pallidum* (8). Seguidamente, se introdujeron las pruebas serologicas treponemicas como complementarias a las pruebas no treponemicas, *T pallidum* hemaglutination (TPHA), y *T pallidum* absorption (FTA-abs) (8). Estas pruebas aunque no aportaban una mayor sensibilidad para el diagnostico de la infeccion aguda, contaba con una alta especificidad que permitia contrarrestar los falsos positivos de la prueba no treponemica (2,8). De este modo desde los anos setenta, la confirmacion diagnostica de la sifilis es llevado a cabo por las pruebas serologicas, no treponemicas mas las treponemicas, las cuales cuentan con limitaciones en relacion a la sensibilidad y especificidad (2,8).

El diagnostico de la sifilis presenta limitaciones y en el caso de la neurosifilis las dificultades son aun mayores (1-4, 10,11). En una revision historica sobre la neurosifilis asintomatica realizada por Moore y Hopkins en 1922, describieron por primera vez la pleocitosis como marcador del diagnostico de la neurosifilis, acompanado o no de la presencia de la reaccion de Wasserman (12). Desde los anos cincuenta se reconoce a la VDRL, acompanado de una prueba treponemica serica e independientemente de la presencia de pleocitosis e inmunoglobulinas, como la prueba diagnostica que permite la confirmacion de la neurosifilis (2,3,8,13). Desafortunadamente, resultados falsos positivos de la VDRL en muestras de LCR de pacientes con afectacion meningea por *M tuberculosis*, *N meningitides*, meningitis linfocitica benigna, hemorragia subaracnoidea, malaria cerebral y neoplasias cerebrales fueron comunicados (14,15). En las dos ultimas decadas, reiteradamente se intento detecta una inmunoglobulina especifica contra el *T pallidum* como un marcador diagnostico de la neurosifilis sin resultados superiores que las pruebas estandarizadas previamente descritas (8, 15-17).

En relacion al tratamiento, en 1835 se introdujo el yoduro potasico como el primer tratamiento para la sifilis que demostro ser efectivo en algunos casos de sifilis tardia (18). Una repuesta terapeutica discretamente aceptable se observo en 1906 cuando el bacteriologo aleman Paul Erlick introdujo el "Salvarsan (606)", un derivado arsenico, para el tratamiento de la sifilis que requeria un tratamiento de nueve meses (18, 19). Contemporaneo al Salvarsan 606 fue el tratamiento con mercurio, el cual demostro una dudosa eficacia y claramente acompanado de importantes efectos adversos (4, 18), Finalmente, en 1943, Mahoney y colaboradores introdujeron el tratamiento con la penicilina en el tratamiento de la sifilis precoz (20). Asi a partir de la aparicion de la penicilina se logro por primera vez en la historia obtener un control de la sifilis a cifras estadisticas aceptables. En los Estados Unidos de America se redujeron los casos de 72 x 100.000 habitantes de sifilis precoz en 1943 a 4 x 100.000 en 1956 (1,5). Desde entonces no se describio ningun nuevo tratamiento para la sifilis mas eficaz que la penicilina.

Las limitaciones sobre el conocimiento de la patogenia de neurosífilis se incrementaron en los años ochenta con el reconocimiento de la pandemia del VIH. La concomitancia de ambas infecciones y las alteraciones inmunológicas presentes durante la infección por el VIH, parece ser la explicación de los casos descritos de atípica presentación clínica, reacciones serológicas confusas y fracasos al tratamiento estandarizado. Estos aspectos provocaron un creciente interés en la evaluación del diagnóstico y tratamiento de la sífilis en la población con infección por VIH (1,5,10,11).

## 1.2 Fisiopatogenia de la Sífilis

Poco después de penetrar la barrera cutánea o mucosa, el *T pallidum* se disemina a través de los vasos linfáticos y/o sanguíneos a todo el resto del organismo incluyendo el SNC (2,5,11,18). Según estudios experimentales en conejos, un inóculo de 4 microorganismos puede desarrollar la enfermedad (21, 22). Por otro lado, se requiere una concentración de  $10^7$  microorganismos por gramo de tejido para que una lesión se manifieste clínicamente (99,22). En alrededor de un 50% de los pacientes con sífilis temprana no tratada se confirmó alteraciones de las muestras de LCR, reflejando la precoz invasión al SNC (1, 5,10). Además, el *T pallidum* fue aislado de muestras de LCR sin ninguna otra alteración del LCR hasta en un 30% de los pacientes con sífilis temprana (10,11)

En contraste con la significativa invasividad del *T pallidum* a nivel del SNC, las manifestaciones clínicas de la neurosífilis fueron descritas en menos de un tercio de los pacientes no tratados (1,4,5). Esto se debería a que el *T pallidum* persiste a nivel del SNC, generalmente en un estado latente por un tiempo variable que puede ser de varios años (4,11). Desde el punto de vista clínico y serológico, la sífilis se divide en los estadios primario, secundario, latente temprano (menos de un año después de la infección), latente tardío (más de un año) y terciaria (1,3) (figura 1). La división de las diferentes fases de la sífilis es arbitraria y simplista en la descripción del curso de la enfermedad. Esta división cuenta con importantes limitaciones dada la correlación irregular entre los hallazgos clínicos y fisiopatológicos. El período medio de incubación de la sífilis es de 3 semanas,

pudiendo presentar una variabilidad de 3 a 90 días, variabilidad que se relaciona directamente y proporcionalmente al tamaño del inoculo (1,2). La sífilis primaria se caracteriza por la presencia del chancro, el cual puede estar ausente o pasar desapercibido. Este es una lesión cutánea generalmente localizada a nivel genital y es la puerta de entrada del microorganismo. El chancro cura en un tiempo medio de 2 a 8 semanas. El estadio secundario de la sífilis se acompaña de una diseminación del *T pallidum*, como consecuencia de una aparente superación del microorganismo sobre los mecanismos inmunológicos del huésped. Clínicamente, la sífilis secundaria se caracteriza por la aparición de múltiples lesiones a nivel de la piel y las mucosas. En esta fase hay una alta concentración del *T pallidum* en la sangre, piel, mucosas y ganglios linfáticos. Otras evidencias de diseminación del *T pallidum* están presentes en hasta un 35% de los casos durante el estadio secundario de la sífilis (1,27,13). Una importante respuesta inmunocelular sería la responsable de las manifestaciones clínicas tales como lesiones cutáneas, glomerulonefritis, etc (2,24). La inmunidad celular en comparación con la humoral demuestra ser algo más efectiva en controlar la infección por *T pallidum*, aunque esta efectividad no está presente en todos los casos (24).

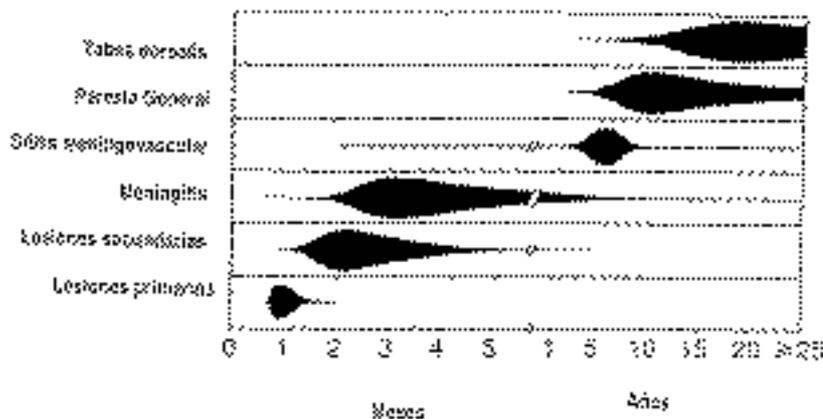


Figura 1. Estadios de la sífilis (Modificado de Hook E and Marra CM) Acquired syphilis in adults. N Engl J Med 1992; 326: 1060-9

Posteriormente, se desarrolla una fase latente asintomática, la cual al parecer es secundaria a la contención del microorganismo por el sistema inmune del huésped. Durante este periodo, el diagnóstico es confirmado exclusivamente por pruebas

serologicas. La recidiva de la sifilis secundaria puede ocurrir hasta en un tiempo maximo de 4 anos. La sifilis latente se divide en latente precoz (posible recidiva) y latente tardia (recidiva muy improbable) (1-3). La recidiva de la sifilis ocurre en un 75% durante el primer ano, probablmente secundaria a una disfuncion del sistema immune similar a la descrita en algunos casos durante el embarazo. La sifilis tardia o terciaria puede o no manifestarse clinicamente (1-3,5). La sifilis terciaria puede presentarse en aproximadamente en un tercio de los casos no tratados, la cual se caracteriza por lesiones del vaso vasorum de la aorta y grandes arterias del SNC asi como la presencia de lesions de tipo granulomatosas denominadas goma que puede afectar a diferentes organos (2,3,5). Resistencia a la reinfeccion aparece a las tres semanas despues de la lesion primaria que se extiende durante el estadio de la sifilis latente (2,3,5,7). Dicha resistencia puede desaparecer si el paciente recibe un tratamiento durante la sifilis temprana que erradica el *T pallidum* y llamativamente, la inmunidad fue descrita como persistente en los casos tratados de sifilis tardia (2,3,5,7). En la sifilis terciaria existe una inmunidad claramente mas eficaz, como refleja la resitencia a la reinfeccion por *T pallidum* asi como tambien por la presencia de la hipersensibilidad celular que conlleva a la formacion de gomias (1-3,24). En conclusion, la informacion disponible indica que la infeccion por el *T pallidum* produce una diseminacion sistematica; la interaccion entre el *T pallidum* y el sistema inmunitario puede resultar en diferentes manifestaciones, ya sea un estado de infeccion latente o diferentes complicaciones organicas acompanadas o no de manifestaciones clinicas.

### **1.2.1. Estudios sobre la historia natural de la sifilis**

**Estudio de Tuskegee.** Este estudio fue llevado a cabo desde 1932 hasta 1962 en un total de 431 pacientes de raza negra con sifilis latente confirmada por serologia. Los resultados de este estudio se resumirian en los siguientes puntos:

- i) La hipertension arterial sistematica en los pacientes de 25 a 50 anos de edad con sifilis fue 17% mas frecuentes que en los pacientes sin sifilis.
- ii) Las complicaciones cardiovasculares fueron mas frecuentes que las complicaciones neurologicas.

- iii) Ambos tipos de complicaciones, cardiovasculares y neurológicas, fueron más frecuentes en pacientes con sífilis comparados con aquellos sin sífilis.
- iv) En estudios necropsícos, la aortitis sífilítica fue descrita en un 25 a 35% de los pacientes con sífilis, en tanto los hallazgos de neurosífilis estuvieron presentes en 4% de los pacientes (5).

**Estudio de Rosahn.** Es un estudio de 382 necropsias llevado a cabo desde 1917 a 1941. La sífilis tardía fue confirmada en un 39 % de los casos y presumiblemente en un 20% de estos fue la causa de muerte. Las complicaciones de la sífilis tardía fueron las siguientes: cardiovasculares 83%, neurológicas 8% y gomas 9%.

**Estudio de Oslo.** El estudio de Oslo sobre la sífilis es un estudio retrospectivo modelo por sus logros metodológicos y epidemiológicos, probablemente no igualado por ningún otro trabajo. Este estudio fue iniciado por el Profesor Boeck el Departamento de Dermatología y Venereología, Hospital Rikshospitalet, Universidad de Oslo. Este estudio se debió a la hipótesis del Profesor Boeck que los efectos nocivos del mercurio eran mayores que las complicaciones de la misma sífilis. El Profesor Boeck evaluó la historia natural de 1978 pacientes con sífilis primaria y secundaria no tratadas desde 1891 hasta 1910. Estos pacientes fueron hospitalizados durante un período medio de 3.6 meses hasta la desaparición de las lesiones sífilíticas. En una segunda fase del estudio en 1927, E. Bruusgaard reevaluó los resultados de la evolución de la sífilis no tratada en un total de 473 (21.7%) de los 1978 pacientes. Finalmente, Gjestland y colaboradores, en 1948 a 1951 replantearon minuciosamente el estudio basado en los datos de 900 a 1100 pacientes no tratados y concluyeron con los siguientes resultados (4)

- i) Un 23.6 de los pacientes con sífilis secundaria no tratada desarrollan una sífilis secundaria recurrente, sin objetivarse que esta recidiva implique una predisposición a las complicaciones tardías de la sífilis.

- ii) La sífilis “benigna” terciaria se presentó en un 15.8% de los pacientes y ocurrió dos veces más frecuentes en hombres que en mujeres. Entre los pacientes que presentaban neurosífilis, esta fue la principal causa de muerte en casi dos tercios de los casos.
- iii) La neurosífilis ocurrió en un 6.5% de los pacientes y ocurrió dos veces más frecuente en hombres que en mujeres. Entre los pacientes que presentaban neurosífilis, esta fue la principal causa de muerte en casi dos tercios de los casos.
- iv) La sífilis cardiovascular ocurrió en un 10.4% de los pacientes, siendo descrita dos veces más frecuentes en hombres que en mujeres. De los pacientes que presentaban aortitis complicada, esta fue la principal causa de muerte en una 75 a 80% de los casos.
- v) Entre otros tipos de complicaciones de la sífilis tardía, se mencionó la presencia del goma sífilítico en hígado de dos pacientes, el cual fue la principal causa de muerte en estos pacientes.
- vi) La sífilis fue la principal causa de muerte en 10.8 % de los pacientes. La sífilis causó el doble de muerte en hombres comparado con las mujeres (15.1 versus 8.3%). La sífilis cardiovascular produjo una mayor mortalidad que la neurosífilis en ambos sexos (4,6 % en hombres versus 3,2% en mujeres). Según el sexo, la sífilis en todas sus formas fue la segunda causa de muerte en hombre y la quinta en mujeres. El exceso de mortalidad entre los pacientes con sífilis comparados con los controles fue 53% para los hombres y 63% para las mujeres. Dado que la población estudiada fue de clase socioeconómica baja, estos índices de mortalidad podrían estar sesgados por otras enfermedades concomitantes

- vii) Los datos provistos no son suficientes para afirmar sobre la cura espontanea de la sifilis. Un 13% de los pacientes desarrollaron una “sifilis benigna terciaria sola”, un 15% de los pacientes presentaban sifilis cardiovascular y/o neurosifilis, de este modo un 28% desarrollaron alguna complicacion tardia y un 72% no desarrollaron ningunas complicaciones tardias. Asi, aproximadamente, un 60 a 70% de los pacientes con sifilis no tratada presentan discreta o ninguna complicacion con relacion a la sifilis.

Una de las limitaciones del estudio de Oslo fue la falta de pruebas serologicas, la cual se debio a la carencia de dichas tecnicas. Los resultados de los estudios de la historia natural de la sifilis sugieren que la neurosifilis se caracterizo por ser fundamentalmente una complicacion tardia. Aunque la neurosifilis no fue la complicacion mas frecuente, esta implicó una significativa morbilidad y mortalidad.

### **1.2.2. *Treponema pallidum*, características moleculares e inmunogenicas.**

El *T pallidum* corresponde al genero de las espiroquetas, conjuntamente con las Borrelias y Leptospiras. El *T pallidum*, es un microorganismo de forma cilindrica de 0.2  $\mu\text{m}$  de longitud y movil (Figura 2). El *T pallidum* no crece en ningun medio de cultivo, por lo que debe ser inoculado en animales de laboratorios para su propagacion. Se reproduce por division binaria con un tiempo de latencia de 4 a 18 horas. Su movilidad se caracteriza por una rotacion alrededor de su eje mayor, la cual es de gran utilidad en el diagnostico cuando es observado en el microscopio de campo oscuro (2,3,5). Su persistencia en medios con elevada viscosidad sugiere que dicha propiedad contribuiria a la evolucion de su compleja estructura (29,30). El *T pallidum*, a lo mismo que otras espiroquetas, presenta una membrana externa que cubre la membrana citoplasmatica y el cilindro protoplasmatico (2,29). La membrana externa es similar a otras bacterias y esta compuesta de lisina, acido diaminopimelico y ornitina (2,29).



Figura 2. Microscopia electronica del *T pallidum*, aproximadamente X 34.000

La particular estructura molecular de las membrana externa del *T pallidum* podria explicar su disminuida virulencia e inmunopatogenicidad, la cual le permitiria evitar la repuesta immune del huesped, asi com su estado de latencia y/o reactivacion a nivel del SNC (23). La ausencia de lipopolisacaridos es una de caracteristicas en la configuracion de la membrana externa del *T pallidum* que lo diferencia de otras bacterias y que explicaria ciertas particularidades en la inmunopatogenicidad (23,28,29). Sobre esto mismo, tambien se demostro una baja proporcion de proteinas en la membrana externa en contraste con la membrana interna en un estudio sobre la valoracion de la ultraestructura e integridad de las proteinas de mebrana del *T pallidum* (3). Asi, la estructura de la membrana externa podria ser la responsable de conceder una propiedad parasitaria y evadir la repuesta immune del huesped.

Una gran proporcion de las proteinas de la membrana externa del *T pallidum* son lipoproteina y muchas de ellas con propiedad antigenicas (23,29,32). La coexistencia de lipido con la proteina de la membrana externa del *T pallidum* parece conferirle una propiedad especial en la inmunopatogenicidad del complejo lipoproteina (32-35,37). Entre ellas la lipoproteina de 47-kDa de la membrana externa fue demostrada ser inmunodominante y especifica del *T pallidum* (36). En 1985, Penn y colaboradores por

medio de la aplicación de Triton X—100 logro aislar y estudiar la lipoproteína de 47 kDa, concluyendo que esta es la principal proteína de la membrana externa del *T pallidum* (934). Cabe agregar que otras subespecies del género treponemas tales como el *T pallidum* subespecie pertenue, *T pallidum* subespecie endemicum y *T carateum* poseen antígenos afines a la lipoproteína de 47 kDa del *T pallidum* subespecie pallidum (936). En 1986, investigadores de la Universidad de Texas Southwestern clonaron en *E coli* el gen de la proteína de 47 kDa, lo cual permitió la determinación de la secuencia de aminoácidos completa de la lipoproteína de 47 kDa por su secuenciación del ADN clonado en *E coli* (36). Esta proteína comprende una secuencia de un codón de 367 aminoácidos correspondiendo a un peso molecular de 40.701. Los datos de la secuencia de los aminoácidos tuvieron un 100% de correlación con el ADN clonado en *E coli*. El contenido de guanina más citosina del gen estructural fue del 53%. Así, la patogenicidad de la lipoproteína de 47 kDa está basada en resultados inmunológicos, fisicoquímicos y genéticos.

Recientemente, se demostró que la lipoproteína de 47 kDa en estado acetilada es capaz de inducir la activación de monocitos en contraste con la lipoproteína no acetilada (32,37). La utilización de la lipoproteína acetilada fue con el fin de anular la antigenicidad del lípido, el cual se logra por la transfección de los monocitos en cultivos celulares por un gen de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (37). Además, la antigenicidad corresponde al extremo N-terminal de la lipoproteína y en forma dosis-dependiente el cual se demostró al incubar con lípidos sintéticos análogos del extremo N-terminal de la lipoproteína de 47-kDa en cultivos celulares de monocitos (32). Dicha activación de los monocitos/macrófagos fue reflejada por la síntesis del factor de necrosis tumoral e interleucinas 1, 6, y 12 (32). Aunque estos datos corresponden a un estudio *in vitro*, dichos resultados permiten explicar la fisiopatología de la neurosífilis.

### 1.3. Neurosífilis

#### 1.3.1. Neurosífilis en pacientes no infectados con infección por VIH

La aparición de la penicilina en la década de los cuarenta, demostrando una eficaz curación de la sífilis temprana, conllevó a un marcado descenso de la neurosífilis (1,11,39) (Figura 3). La gran eficacia de la penicilina condujo a nuevas actitudes como la de obviar el estudio del LCR en pacientes con sífilis temprana. Esta fue una práctica rutinaria en la era pre-penicilina y en cierta forma la neurosífilis pasó a ser considerada como una complicación prácticamente exclusiva de la sífilis terciaria (5, 10,11,39). En pacientes con infección por VIH es indispensable considerar la neurosífilis en cualquiera de los estadios de la sífilis (1,10,11,39).

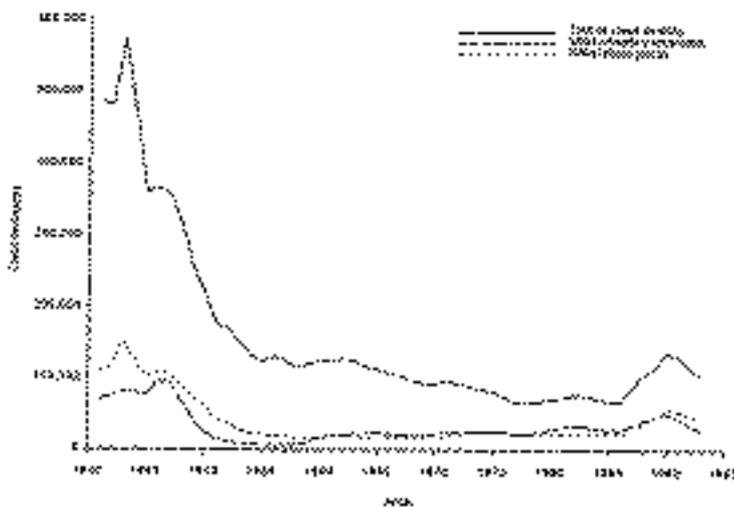


Figura 3. Incidencia de la sífilis temprana en los Estados Unidos de América (Modificado de la Division of STD/HIV Prevention). Sexually Transmitted Diseases Surveillance, 1993. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1994; Sept: 17

Si bien la neurosífilis suele presentarse en forma sintomática, esta puede hacerlo también en forma asintomática (Tabla 1 y 2) (1,2,11,40). Para ambas formas de presentaciones, la confirmación diagnóstica estandarizada de la neurosífilis se lleva a cabo por la presencia del VDRL positiva en muestras de LCR (8,11,13). Previo a la pandemia por el VIH, la incidencia de la neurosífilis asintomática fue descrita entre 8 y 40% en los diferentes estadios (1,2,40). Esta incidencia de la neurosífilis no es fiable dado que los resultados falsos negativos de la VDRL en LCR fueron comunicados hasta en un 77,77%

(3,13,14,41). Diferentes autores comprobaron que hasta un 40% de los casos, el *T pallidum* invade el SNC durante la fase temprana de la sífilis (8, 10,11,40). En 1988, Lukehart y colaboradores evaluaron la invasión del SNC por el *T pallidum* mediante la prueba de infectividad en conejos en una serie de 58 pacientes con sífilis no tratada (11). En este estudio, el *T pallidum* en LCR fue aislado en un 30% de los pacientes con sífilis temprana (primaria y secundaria). En este mismo estudio, Lukehart y colaboradores encontraron que las manifestaciones neurológicas estuvieron presentes en solo 6 pacientes con sífilis secundarias del total de los pacientes con sífilis temprana y latente con neurosífilis confirmadas (11). Este importante porcentaje de paciente con invasión del SNC durante la sífilis temprana contrasta con la baja frecuencia de neurosífilis sintomática (4, 40). Esta discordancia reflejaría que la infección remite probablemente al ser eliminada o controlada por la inmunidad del huésped en un importante porcentaje de pacientes (5,40,41). Así, la neurosífilis se manifiesta clínicamente en un porcentaje de 6.5% a 30% de los pacientes con el *T pallidum* en LCR (8). Desde el punto de vista clínico, la neurosífilis sintomática generalmente se manifiesta como una meningitis durante el estadio temprano de la sífilis (1,2,5,11). (Figura 4). En tanto, durante la fase tardía de la sífilis, la neurosífilis se limitaría a dos principales formas de presentaciones clínicas, las cuales cuenta con correlaciones histológicas (1-3,5,40).

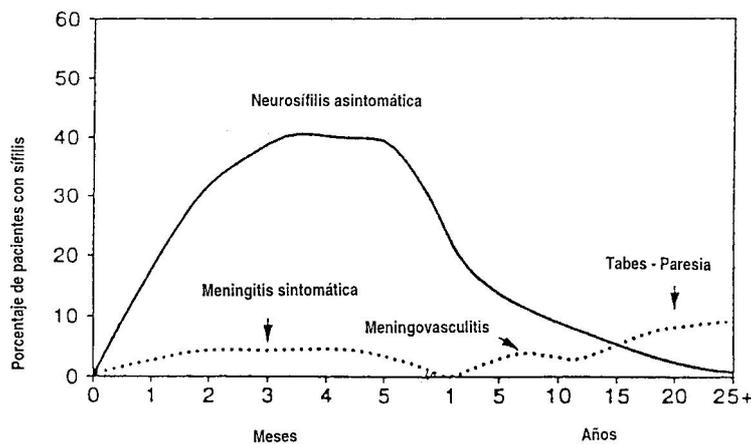


Figura 4. Porcentaje de presentación de la sífilis (modificado de Marra CM. Syphilis and HIV infection). Sem Neurol 1992; 12: 43-50)

1. Forma meningovascular. Se debe a una endarteritis obliterativa que afecta a pequeños ramos de las arterias cerebrales, medulares y meningeas, las cuales causarían un espectro clínico de vaculitis del SNC, episodios de isquemia y/o infarto (Tabla 1).

2. Forma parenquimatosa. Es un estadio concomitante o posterior a la forma meningovascular, la cual se caracteriza por una afectación de las células nerviosas de la corteza cerebral. En la forma parenquimatosa, la neurosífilis tiene dos subtipos mayores de presentaciones como son la parálisis general progresiva y el tabes dorsal que presentan un amplio espectro clínico de manifestaciones neurológicas y psiquiátricas como indicada en la tabla 3. Excepto el tabes dorsal y el reflejo de Argyll Robertson, las restantes manifestaciones clínicas de la neurosífilis tardía son inespecíficas.

Tabla 1. Formas de presentaciones de la neurosífilis en pacientes adultos.

Neurosífilis asintomática: Sífilis temprana  
Sífilis latente

Neurosífilis sintomática: Meningitis aguda  
(Sífilis temprana, secundaria y tardía). Meningovascular  
Parenquimatosa: Cerebral: Focal: Gomas  
Difusa: Parálisis generalizada progresiva  
Medular: Aguda  
Crónica: Tabetica  
Cerebromenígea  
Ocular  
Vestibular coclear

Tabla 2. Estadios de la sífilis en pacientes no tratados (2,4,8,23)

Estadios	Frecuencia	Serología en sangre (%)		Invasión del SNC (%)
		Reaginas	No Reaginas	
Primaria		74-87	70-100	30-40
Secundaria	65-70		70-100	100
*Latente temprana		85-100	88-100	
**Latente tardía			85-100	88-100
Terciaria:		37-94	96	
Cardiovascular	25-35			
Neurosífilis	8-			

15

\* Menos de un año desde la primoinfección. \*\* Mas de un año desde la primoinfección.

Tabla 3. Principales formas de presentacion y manifestaciones clinicas de la neurosifilis

Sifilis temprana: Meningitis aguda: Meningismo, cefalea, fotofobia, etc.

Sifilis no temprana: - Meningitis cronica: Meningismos, cefalea, fotofobia, etc

- Meningovascular: Focalidad motora, convulsions, afasia.

- Parenquimatosa: Paralisis generealizada progresiva: Alteraciones de la personalidad (alteraciones del estado afectivo, sensorio, intelecto, entendimiento

y juicio),

reflejos hiperactivo, alteraciones del lenguaje, alteraciones pupilares

(reflejo

de Argyll Robertson), atrofia optica.

- Tabes dorsal: episodios dolorosos lancinantes, ataxia, alteraciones pupilares (reflejo de Argyll

Robertson), impotencia sexual, alteraciones vesicales, incontinencia anal, neuropatia

periferica, signo de Romberg, alteraciones de los pares craneales).

Por lo anteriormente expuesto, dada la variabilidad de presentaciones clinica de la sifilis y la elevada invasividad a nivel del SNC, en todo paciente sexualmente activo que presentase meningitis asptica, demencia, sordera o uveitis se aconseja un examen del LCR para descartar la neurosifilis. Desafortunadamente, a esta dificultad diagnostica de la neurosifilis tenemos que agregar que hasta un 4% de los pacientes con neurosifilis sintomatica pueden no mostrar ninguna prueba positiva que permita la confirmacion de la enfermedad.

### 1.3.1.1. Pruebas de laboratorio en el diagnostico de la neurosifilis

La presencia de una prueba treponemica serica positiva es un requisito indispensable para el diagnostico de la neurosifilis (1,4,8). Para las formas de presentacion sintomatica y asintomatica, la confirmacion diagnostica de la neurosifilis se lleva a cabo por la presencia de VDRL positivo en muestras de LCR. La VDRL en LCR presenta las siguientes peculiaridades: 1) Baja y variable sensibilidad que oscila desde 30% al 70% (2,8), 2) Aceptable especificidad aunque fueron descriptos resultados falsos positivos de VDRL en muestras de LCR de pacientes con manifestacion meningeal por *M tuberculosis*, *N meningitides*, meningitis linfocitica benigna, hemorragia subaracnoidea, malaria cerebral y neoplasias cerebrales (40); 3) En pacientes con neurosifilis asintomatica la interpretacion de una VDRL en LCR puede ser confuso. Una VDRL positiva en LCR sin otra

anormalidad puede estar presente tanto en casos de neurosífilis activa, parcialmente tratada o en remisión (40).

Con el fin de superar las limitaciones de la VDRL, se idearon los índices de pruebas treponémicas con una mayor sensibilidad, los cuales se fundamentan en la producción de anticuerpos contra el *T pallidum* a nivel del LCR (2,8). Dichas pruebas son:

$$\text{Índice intratecal de IgG para el } T \text{ pallidum} = \frac{\text{Titulo IgG de TPHA en LCR}}{\text{IgG total de TPHA mg} / \text{IgG TPHA serica} / \text{IgG serica total}}$$

$$\text{Índice TPHA} = \frac{\text{Titulo IgG de TPHA en LCR}}{\text{Albumina en LCR mg/dl} \times 10^3 / \text{Albumina serica (mg/dl)}}$$

Un cociente albumina serica / LCR mayor a  $> 144$  indica una lesión a nivel de la barrera hematoencefálica, en tanto, un índice IgG de *T pallidum* intratecal  $> 3,0$  o un índice TPHA  $> 100$  indica una producción activa de anticuerpos locales contra el *T pallidum* (2,8).

Otros hallazgos de interés del LCR en pacientes con neurosífilis son la presencia de aumento de leucocitos y proteínas, disminución de la glucosa y aumento de IgG (1-3). Moore y Hopkins, en un trabajo clásico previo a la era de la penicilina, demostraron la importancia de identificar los casos de neurosífilis asintomáticas con aumento del número de leucocitos y proteínas en LCR como marcadores de riesgos para el desarrollo de neurosífilis (44). Además, la presencia de pleocitosis es considerada como marcador de actividad de la neurosífilis y su descenso a la normalidad como marcador de buena respuesta al tratamiento (13,14). Las pruebas treponémicas mostraron correlación con la presencia de pleocitosis y VDRL en LCR por lo que una prueba treponémica negativa en LCR podría ser usada para excluir el diagnóstico de neurosífilis (13,14). Sin embargo, las pruebas treponémicas son reactivas en un tercio de los casos con normalidad de leucocitos y proteínas en LCR y VDRL no reactiva. Lo que sugiere la baja especificidad de las pruebas treponémicas para el diagnóstico de la neurosífilis asintomática (13,14). Cabe mencionar que en los últimos años se está trabajando sobre nuevas técnicas de biología

molecular a fin de contar con una tecnica mas eficiente en el diagnostico de la neurosifilis, las cuales se analizaran en los siguientes apartados.

### **1.3.2. Sifilis y neurosifilis en pacientes infectados por VIH**

En la ultima decada se observo un incremento de la incidencia de casos declarados de sifilis en paises occidentals (1,5,10). La presencia de una lesion de continuidad a nivel de mucosas y el contacto sexual son factores altamente asociados con el incremento de la incidencia de la sifilis e infeccion por VIH (1,3,39), aunque muchos pacientes con infeccion por VIH parecen presentar las pruebas serologicas y manifestaciones clinicas de sifilis en una forma similar que los pacientes sin infeccion por VIH (45), excepciones fueron descritas (46,47).

Numerosas publicacones describieron diferentes tipos de hallazgos atipicos de sifilis en pacientes con infeccion por VIH, en cierta forma similares a los descritos en la era prepenicilina (5). Sin embargo, estas alarmantes descripciones de la sifilis en pacientes con infeccion por VIH cuentan con limitaciones, las cuales no fueron validos en otros estudios. Muchos de estos hallazgos fueron basados en casos clinicos aislados y en pequenas series no controladas. Las alteraciones de la inmunidad celular en pacientes con infeccion por VIH podrian haber influenciado las presentaciones clinicas atipicas de la sifilis, principalmente en los casos con grave inmunosupresion. Los hallazgos atipicos de la sifilis de la sifilis en pacientes con infeccion por VIH descritas en la literatura se resumirian en los siguientes puntos.

1.- **Clinica atipica.** En diferentes casos clinicos y pequenas series no comparadas se describieron pacientes con infeccion por VIH que presentaban sifilis con cuadros clinicos floridos por lo que fueron considerados como “sifilis maligna” (45,49-52). Entre las presentaciones clinicas, se mencionaron. I) Osteitis con lesions oseas destructivas (48). ii) Lesiones cutaneas nodulo-ulcerativas (49). iii) Vasculitis necrotizante (50). iv) Lesiones psoriasiformes (50). v) Goma sifilitico en mucosa de paladar en pacientes con sifilis secundaria (50). vi) Lesiones cutaneas liquenificadas (50). vii) Uveitis, etc. En un trabajo retrospectivo, Hutchinson y colaboradores describieron la mayor persistencia de chanco y

sifilis secundaria en pacientes con infeccion por VIH (51). Sin embargo, en un estudio prospectivo llevado a cabo por Gourevich y colaboradores observaron una ausencia de las diferencias de las manifestaciones clinicas de la sifilis entre los pacientes con y sin infeccion por VIH asi como en el curso clinico de la sifilis durante el seguimiento (51).

**2.- Cuadros clinicos de sifilis agresivos con rapida progression.** La consideracion de las características agresiva y rapida progresioin de la sifilis fue descrita en relacion a la severidad de las presentaciones clinicas. Algunos pacientes debutaron con el diagnostico de secundarismo, uveitis y neurosifilis; hallazgos todos estos raramentes descritos anterior a la era sindrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (39, 54). Un caso de sifilis de progression rapida se confirmo al presentar sifilis meningovascular cuatro meses despues de la infeccion primaria (53). La aparicion de casos aislados de presentacion atipica de sifilis y la reciente experiencia de enfermedades oportunistas en pacientes con infeccion por VIH a finales de los anos ochenta condujo al temor que la sifilis podria ser una enfermedad oportunista en los pacientes con infeccion por VIH-1, lo cual nunca fue confirmado.

**3.- Fallo al tratamiento estandarizado.** En una amplia revision de la literatura se menciona los siguientes casos de sifilis con fallo al tratamiento estandarizado. Johns y colaboradores (53) describieron dos pacientes con sifilis temprana que habian sido tratados con penicilina benzatinica y posteriormente desarrollaron neurosifilis. Lukehart y colaboradores (10) describieron la presencia de *T pallidum* en LCR de tres pacientes con sifilis secundaria, quienes habian sidos tratados con penicilina benzatinica, en dos de estos pacientes, la invasion por el *T pallidum* fue confirmada por la prueba de infectividad en conejos. Gregory y colaboradores (50) describieron cinco pacientes con infeccion por VIH con sifilis atipica, dos de estos habian sido tratados previamente. Katz y Berger (54) describieron una serie de doce pacientes con infeccion por VIH con neurosifilis, cuatro de estos habian recibidos tratamiento para sifilis, dos con penicilina benzatinica 7.200.000 unidades. Berger (55) describio tres pacientes con neurosifilis, dos de estos habian recibido tratamiento estandarizado para sifilis temprana 2 y 38 anos previos. De una serie de 46

pacientes hospitalizados por neurosífilis, Katz y colaboradores (56) describieron dos pacientes dos pacientes con SIDA, quienes habían recibido tratamiento para neurosífilis y además otros cuatro pacientes con infección por VIH y dos pacientes con SIDA, quienes habían sido tratados con penicilina benzatínica para sífilis primaria y latente. Gordon y colaboradores (57) describieron una serie de 11 pacientes con neurosífilis sintomática, cinco de quienes habían sido previamente tratados con penicilina benzatínica. Posterior al tratamiento con penicilina G IV, un paciente tuvo una recidiva de neurosífilis meningovascular y en dos pacientes se consideró fallo al tratamiento para la neurosífilis dada la persistencia de los altos títulos de RPR séricos y VDRL en LCR. Finalmente, Malone y colaboradores (58) describieron 10 pacientes con recidiva clínica o serológica para la sífilis de un total de 56 pacientes con seguimiento correspondiente a una serie de 61 pacientes con sífilis tratadas. De estos diez pacientes, altas dosis de penicilina procainica más probenecid fueron dadas en dos pacientes, altas dosis de penicilina G IV en cinco pacientes y penicilina benzatínica en tres casos (58). Recidiva serológica ocurrió en siete pacientes y recidiva clínica en tres pacientes, sífilis secundaria y neuropatía craneal en uno (58). Estas recidivas ocurrieron en un tiempo medio de 14.7 meses (rango 6 – 25) del tratamiento (58). Por todo lo expuesto anteriormente, solamente 23 casos de recidiva clínica de sífilis fueron descritos en pacientes con infección por VIH-1 tratados con penicilina. Cabe agregar que no queda claro si estos pacientes habían tenido infección por VIH cuando habían recibido el primer tratamiento para la sífilis, por ejemplo, un paciente descrito por Katz y colaboradores (56) había sido tratado 10 años antes, otro paciente descrito por Berger (55) fue tratado 38 años antes, otro paciente descrito por Gregory y colaboradores (50) había sido tratado 10 años antes y otro paciente descrito por Johns y colaboradores (53) fueron tratados 5 años previos. Además, es posible que estos pacientes hubieran sido reinfectados durante este prolongado periodo de tiempo. Aparte de la probabilidad de la reinfección, estas supuestas recidivas serológicas posterior al tratamiento podrían ser el resultado de anomalías inmunológicas secundaria a la infección por VIH (59,60).

**4.- Ausencia de seroconversion o seroreversion de las pruebas serologicas para la sífilis.** Gregory y colaboradores (50) describieron un caso de sífilis secundaria con pruebas treponemicas y no treponemicas negativas; sin embargo, una biopsia de la lesion cutanea fue positiva para presencia de *T pallidum* mediante la tecnica de inmunoperoxidasa (50). Otro caso con pruebas sericas no treponemica y treponemica negativas fue descrita en un paciente con sífilis secundaria y Sarcoma de Kaposi, sin embargo la presencia del *T pallidum* confirmo el diagnostico de la sífilis (61). Otro dos casos con serologia negativa, uno de ellos con lesion cutanea sifilitica confirmada por campo oscuro y otra con uveitis fueron descritos (62,63). La presencia de una severa alteracion de la inmunidad secundaria a la infeccion por VIH podria explicar estas anormalidades serologicas.

**5.- Cambios en las pruebas reaginicas.** Los cambios de las pruebas reaginicas sericas en pacientes con infeccion por VIH se podrian resumir en los siguientes puntos.

*a) Altos titulos sericos de las pruebas reaginicas:* En un estudio comparativo llevado a cabo por Gourevitch y colaboradores (45) observaron que los titulos sericos de RPR fueron mayores en pacientes con infeccion por VIH que en los pacientes sin infeccion por VIH y una presentacion clinica similar. Los altos titulos de RPR se observaron principalmente en pacientes con antecedentes de sífilis previa. En general, estos hallazgos serologicos fueron descritos en pacientes con sífilis asintomatica o estadios precoces de la sífilis. Los altos titulos sericos de pruebas reaginicas fueron imputadas a alteraciones de los linfocitos B. No se describio correlacion entre el contaje de linfocitos CD4+ y los titulos de pruebas reaginicas (45). Cabe destacar que muchos de estos trabajos describieron elevados titulos de pruebas reaginicas en pacientes con infeccion por VIH (51).

*b) Lenta seronegativizacion de las pruebas sericas posterior al tratamiento.* Pruebas sericas no treponemicas: Diversos trabajos basados en pequenas series mencionaron una lenta seronegativizacion de las pruebas reaginicas posterior al tratamiento de la sífilis (1,64,72). Sin embargo dos estudios prospectivos, con un seguimiento de 12 meses y 5 anos, describieron seronegativizacion de las pruebas

reagínicas posteriores al tratamiento de la sífilis en una forma similar en pacientes con y sin infección por VIH (45,51). En un trabajo prospectivo reciente de Yinnon y colaboradores sobre la respuesta al tratamiento de la sífilis de pacientes con y sin infección por VIH observaron una diferencia no significativa en el descenso de los títulos de RPR séricos seis meses después del tratamiento (62). Llamativamente, en este trabajo los pacientes con infección por VIH que presentaban RPR con títulos menores que 1:32 mostraron una lenta seronegativización a los 12 meses posterior al tratamiento comparado con los pacientes VIH negativos.

C) *Pruebas séricas treponémicas.* En un estudio llevado a cabo por Hass y colaboradores (65) sobre la negativización de las pruebas séricas en pacientes con infección por VIH y sífilis tratadas, un 7% de los pacientes con infección por VIH asintomáticos y un 38% de los pacientes sintomáticos presentaron seroreversión (65). La seroreversión de las pruebas treponémicas se correlacionaron con el estado sintomático de los pacientes con infección por VIH así como con el bajo conteo de linfocitos CD4+. Estos hallazgos sugieren la limitada sensibilidad de las pruebas treponémicas en el diagnóstico de la sífilis en la población de pacientes con infección por VIH. Finalmente, un estudio prospectivo más reciente no encontró diferencia en la seronegativización de las pruebas treponémicas en pacientes con y sin infección por VIH (45).

D) *Falsos positivos de las pruebas reagínicas séricas (FPPRS).* Desde el punto de vista práctico se definió como verdadero resultado positivo de las pruebas reagínicas a la presencia de títulos mayores de 8 y posible FPPRS cuando el título es menor de 8. Sin embargo esta división se ve contrarrestada por los casos confirmados de FPPRS con títulos extramadamente altos particularmente en sujetos ADVP (adictos por vía parenteral), aunque en general los FPPRS se presentaban a títulos bajos (8). La presencia de FPPRS es considerada aguda o crónica según su persistencia sea menos o más de seis meses. Los FPPRS agudos fueron relacionados a hepatitis viral, mononucleosis infecciosa, neumonía viral, varicela, sarampión, otras infecciones virales, malaria, inmunizaciones, embarazo y error de laboratorio. La forma crónica fue asociada principalmente a enfermedades

colagenovasculares y enfermedades portadores de hipergamaglobulinemia, ambas entidades tienen la particularidad de ser más frecuentes en mujeres que en hombres. FPPRS de forma crónica fueron descritos en ADVP, lepra y neoplasia. A esta gran variedad de causas de FPPRS se agregó la infección por VIH como descrito en otros trabajos (59,60). Entre las probables explicaciones de FPPRS en estas poblaciones se mencionaron la presencia de hipergamaglobulinemia policlonal y la reacción cruzada entre las pruebas reaginicas con otros anticuerpos antifosfolípidos (anticardiolipina).

**6.- Prevalencia de la neurosífilis.** A diferencia del resto de la población, los pacientes con infección por VIH cuentan con una mayor incidencia de sífilis y neurosífilis (67-69). Los estudios sobre la prevalencia de neurosífilis en la población de pacientes con infección por VIH se resumirían en los siguientes puntos:

a). Holtom y colaboradores (68) evaluaron la prevalencia de la neurosífilis en la población con infección por VIH con sífilis latente. En dicho estudio se encontraron un 9.1% de neurosífilis asintomática de los pacientes en quienes se examinó el LCR y una supuesta prevalencia de neurosífilis 1% de toda la población de pacientes con infección por VIH estudiada. Este trabajo contó con importantes limitaciones, dado que el LCR fue evaluado solamente en 33 (10.57%) pacientes de un total de 312 pacientes.

b). Brando y colaboradores (67) describieron un total de 767 pacientes con infección por VIH, 238 de ellos con serología positiva para sífilis. En siete casos se confirmó neurosífilis por VDRL positiva en LCR. Sífilis secundaria fue descrita en un paciente, sífilis latente en cuatro y dos con neurosífilis; uno con neuritis óptica y otro por uveítis. La prevalencia de neurosífilis fue de un 7% de los pacientes coinfectados y de un 1% del total de la población de pacientes con infección por VIH. Sin embargo, solamente en 40 (16.8%) de los 238 pacientes con infección por VIH y sífilis se practicó un estudio del LCR.

c) Esselink y colaboradores (79) evaluaron un total de 663 pacientes con infección por VIH que presentaba alteraciones neurológicas (79). En 352 (52%) pacientes se practicó

un estudio del LCR, el cual no siempre colleva a la confirmacion de la nuerosifilis. De los 258 patients en quienes se examino el LCR para el diagnostico de la neurosifilis, solamente un paciente presento VDRL positivo, concluyendose que la prevalencia de la neurosifilis es de un 0,4%. Este unico caso de neurosifilis era un paciente con antecedente de sifilis no tratada correctamente que desarrollo un infarto cerebral y meningitis. Los autores mencionan la baja prevalencia de neurosifilis en pacientes con infeccion por VIH, sin embargo un sesgo importante de este trabajo fue que la VDRL no se evaluo en todos los LCR.

Por todo lo anteriormente expuesto, se podria concluir que hay una mayor prevalencia de neurosifilis en los pacientes con infeccion por VIH, la cual es frecuentemente diagnosticada durante la sifilis temprana y generalmente asintomatica. Las presentaciones con clinicas atipicas de neurosifilis correspondieron a casos aislados.

### **1.3.3. Diagnostico de la neurosifilis en pacientes con infeccion por VIH-1**

Importantes limitaciones fueron descritas en el diagnostico de la neurosifilis previo de la era del VIH. Desafortunadamente, estas dificultades se incrementaron con la aparicion de la pandemia del VIH. Actualmente, se acepta que la presencia del VDRL en LCR como la prueba estandarizada para confirmar la neurosifilis (1,3,8,11). Esta prueba diagnostica cuenta con aceptable especificidad pero con una sensibilidad que va desde 30% al 70% (1,8,10). Otros hallazgos tales como la pleocitosis, produccion local de anticuerpos antitreponema a nivel del SNC y las manifestaciones clinicas son utiles en la evaluacion del diagnostico de neurosifilis (2,8,3,10,11). Sin embargo, las frecuentes afectaciones neurologicas y alteraciones del LCR en pacientes con infeccion por VIH, independientemente del estadio de la infeccion por VIH, dificultan el diagnostico de la neurosifilis (1,5,8,39). Estos datos clinicos y de laboratorio de pacientes con infeccion por VIH dificultan aun mas el diagnostico de la neurosifilis. En resumen, en los pacientes con infeccion por VIH es importante considerar los siguientes hallazgos en el diagnostico de neurosifilis: i) al menos una anormalidad del LCR (aumento de los leucocitos, proteinas e inmunoglobulinas) fue descrito en un 40% a 60,3% de los pacientes con infeccion por VIH

asintomático (95,97). ii) La infección por VIH puede causar manifestaciones neurológicas directa e indirectamente a través de enfermedades oportunistas (11, 95). iii). La prueba diagnóstica estandarizada - VDRL en LCR puede ser negativa (1,4).

En un esfuerzo por obtener una prueba más eficaz para el diagnóstico de la neurosífilis, Tomberlin y colaboradores (70) evaluaron el índice TPHA en muestras de LCR en pacientes con infección por VIH. De un total de 58 pacientes con infección por VIH y sífilis latente sin tratamiento reciente, cinco pacientes (9%) presentaron alteraciones del número de leucocitos, proteínas y/o inmunoglobulinas en LCR sugestivos de neurosífilis. Cinco (12,5%) de estos 40 pacientes presentaban índices del TPHA positivos (> 100) en muestras de LCR, implicando una producción intratecal de anticuerpos en LCR. Sin embargo en dos de los cinco pacientes con VDRL positivos presentaron proteínas, inmunoglobulinas e índices del TPHA en LCR normales. Esta falta de correlación entre la VDRL y el índice del TPHA contrasta con los resultados de estudios en pacientes sin infección por VIH (15), lo cual podría deberse a la diferente población de pacientes así como a la presencia de neurosífilis sintomática. Si bien el índice de TPHA no presenta una significativa correlación con la VDRL similar a la observada en los pacientes sin infección por VIH, en pacientes con infección por VIH con serología positiva para sífilis y alteración de las proteínas y leucocitos en LCR, el índice del TPHA podría ser útil en el diagnóstico presuntivo de la neurosífilis si consideramos la baja sensibilidad de la VDRL.

#### **1.4. Infección por VIH-1**

##### **1.4 .1. VIH-1**

El VIH-1 es un retrovirus ARN de la división subfamiliar llamada Lentivirinae que a diferencia de sus congéneres es un virus específico del ser humano (73, 74). Los lentivirus se caracterizan por producir alteraciones del SNC, presentar un prolongado período de latencia clínica así como un progresivo deterioro de la inmunidad celular (75). Aunque actualmente se desconoce el exacto mecanismo citopático del VIH-1, este afecta a los linfocitos CD4+ con llevando al progresivo estado de inmunodeficiencia celular (73-76).

El VIH-1 es un virus de aproximadamente 100 nm de diametro con una envoltura que es tomada durante el proceso de gemacion de la membrana celular. Las características estructurales del VIH-1 son (figura 2) (73,73). I) Doble cadena ARN; ii) Envoltura lipidica; iii) enzima ADN polimerasa dependiente del ARN – transcriptasa inversa. La conformacion estructural del VIH-1 desde la periferia hacia el centro presenta una bimembrana lipidica desde la cual sobresale unas formaciones esfericas con la envoltura proteica, llamada glicoproteina 120 (gp120) y glicoproteina 41 (gp41). Hacia el interior de la membrana lipidica se encuentra la matriz proteica que conforma la capsida principal en la cual esta presente la proteina 24 (gp24). Finalmente, mas hacia el interior se encuentra el genoma viral y las proteinas necesarias para su integracion y replicacion entre ellas la enzima *transcriptasa inversa* (74-76).

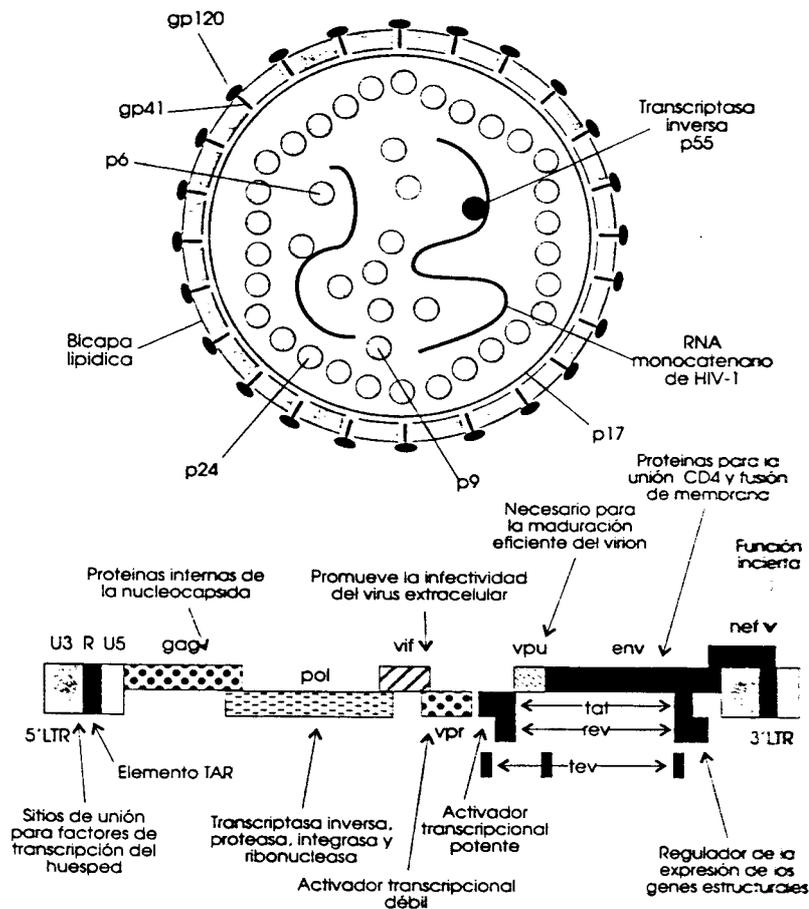


Figura 5. VIH. Configuración molecular del virion y estructura genómica.

Una característica particular de los lentivirus es la complejidad de su genoma. Los genes *gag*, *pol*, y *env*, están presente en todos los retrovirus, los cuales son esenciales para su replicación (73,76). El *gag* codifica un precursor poliproteico que posteriormente es escindido en tres proteínas estructurales; el gen *pol* codifica las enzimas transcriptasa inversa, protease e integrasa. Por último, el gen *env* codifica la proteína que parece tener una actividad supresora en ciertas ocasiones (76,77). El gen *vif* actúa sobre la capacidad de la particular viral para infectar las células dianas pero no afecta la expresión viral o transmisión por contacto de célula a célula (76). El gen *vpu* demostro en pruebas in vitro que aumenta la liberación del virus desde las células así como que desestabiliza el complejo entre el precursor de la envoltura proteica y el receptor de superficie CD4+ (73,76). Por último, el gen *vpr* parece estimular la región del promotor del VIH-1 (73).

A lo mismo que otros retrovirus, el VIH-1 infecta a los linfocitos CD4+ lo que desencadena un deterioro de la inmunidad celular (78). El VIH tiene una alta afinidad por el receptor de membrana CD4+ del linfocito. Una proteína de transmembrana, gp41, facilita la entrada del virus en la célula por fusión con la membrana celular. El VIH-1 puede ser transmitido por contacto de célula a célula así como en estado puramente extracelular no transportado por células. Secundariamente, la línea celular macrófago-monocito conforma otra de las principales células dianas para el VIH-1. En estas células, la penetración se produce por igual vía que la mencionada para los linfocitos CD4+ el cual a su vez puede ser potenciado por un mecanismo de endocitosis mediado por el receptor Fc. La presencia de una menor densidad de receptores celulares CD4+ sería responsable de un efecto citopático más lento del VIH-1 sobre los macrófagos y monocitos que en los linfocitos CD4+. Finalmente, los linfocitos actuarían como un reservorio del VIH-1 y además como un vehículo en la diseminación del VIH-1 a todo el organismo humano. Entre otras hipótesis se menciona que el VIH-1 induce a macrófagos y linfocitos la producción de citoquinas, probablemente desencadenando el establecimiento de anomalías neurológicas así como el proceso neoplásico frecuentemente presente en el SIDA.

#### **1.4.2. Historia natural e inmunopatogénesis de la infección por VIH**

Determinados sujetos tales como homosexuales o bisexuales, adictos a drogas por vía parenteral y pacientes receptores de hemoderivados en general, son grupos de riesgo para la infección por VIH (79). Aunque menos frecuente en nuestro medio, pero más importantes por sus tendencias a pasar desapercibidos, son los sujetos de la población general que no pertenecen a ninguno de los grupos de riesgo anteriormente mencionados, los cuales en diferentes situaciones se exponen a contactos de fluidos corporales principalmente por relaciones heterosexuales (75,78).

La infección por VIH-1 presenta un período de latencia seguido por la aparición de un cuadro clínico conocido como SIDA (79). Este síndrome se caracteriza por una

progresiva inmunodepresión celular que se manifiesta por complicaciones de enfermedades oportunistas principalmente por infecciones y tumores. El periodo de latencia promedio hasta el desarrollo del SIDA es de aproximadamente de 6 a 10 años.

Los linfocitos CD4<sup>+</sup> son las principales células reguladoras de la inmunidad celular, tienen una particularidad de presentar un marcador de membrana llamado CD4<sup>+</sup> al cual se une el VIH-1. Posterior a la unión a este receptor, el VIH-1 invade el linfocito CD4<sup>+</sup> que a través de un efecto citopático desencadena una depleción y deterioro funcional de los linfocitos (76). La progresiva inmunodepresión presente durante la infección por el VIH-1 es dada por una alteración cualitativa y cuantitativa de los linfocitos CD4<sup>+</sup> que se extiende indirectamente a las restantes poblaciones de linfocitos (81). A pesar de los importantes avances de nuestros conocimientos sobre la interacción del VIH-1 y sistema inmunitario, los mecanismos patogénicos del virus y los eventos inmunopatogénicos del huésped que se desarrollan a lo largo de la infección del VIH-1 hasta la confirmación del SIDA son desconocidos.

Una apreciable carga viral, cantidad de partículas virales y células infectadas circulantes, aparecen en el plasma poco después de la infección por el VIH-1. Esta carga viral persiste a lo largo de todo el curso de la infección tanto en las células circulantes como en las células del tejido linfoide. La invasión del VIH-1 en las células CD4<sup>+</sup> es llevado a cabo por la unión de la gp120 de la envoltura proteica del VIH-1 a la molécula CD4<sup>+</sup> de los linfocitos (82). Posteriormente se produce una fusión de la membrana lipídica del VIH-1 a la membrana celular y posterior invasión celular del VIH-1 (73). Después de la invasión celular por el VIH-1, el genoma del VIH-1 es integrado a nivel del ADN de las células CD4<sup>+</sup> permaneciendo en un estado “proviral” (73). La expresión del provirus parece depender de la activación de los linfocitos CD4<sup>+</sup>, con una ulterior replicación. La interacción del VIH-1 y las células CD4<sup>+</sup> es un complejo proceso principalmente debido a múltiples productos de los genes reguladores del VIH-1, los cuales modularían el grado de expresión viral así como la eliminación de las células infectadas. Este es un paso fundamental en el proceso de la lucha entre el VIH-1 y el sistema inmune del huésped con

la consecuente superacion del VIH-1 es debido al efecto citopatico del VIH-1 (73). Finalmente, la historia natural de la infeccion por el VIH-1 se resumiria en tres estadios (figura 6) (79).

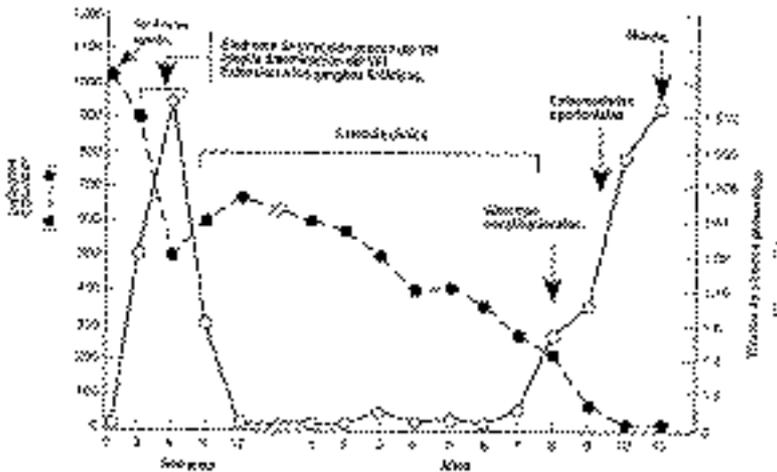


Figura 6. Variación del conteo de linfocitos CD4+ e historia de la infección por VIH (Modificado de Pantaleo y colaboradores). The immunopathogenesis of HIV infection. N Engl J Med 1993; 328:327-35

1.- Infección primaria. Posterior a la infección por el VIH-1 tanto por vía sanguínea como a través de las mucosas, en ambas situaciones, el VIH-1 libre y las células infectadas, son transportados por los vasos sanguíneos o linfáticos hasta los tejidos linfoides. Durante la fase de infección primaria se inicia una activa respuesta inmune al VIH-1 que se continúa con una replicación viral y posterior diseminación perpetuando la infección.

2.- Viremia inicial y diseminación. Pocas semanas después de la infección primaria hay una carga viral de  $10^5$  a  $10^6$  ARN viral por  $\text{mm}^3$  de plasma (83). Un cuadro similar a la mononucleosis infecciosa que en algunos casos puede pasar desapercibido. Al final de este periodo y poco antes de la seroconversión hay una caída abrupta de la carga viral (82,85). Este descenso de la carga viral parece ser secundaria a una exitosa respuesta inmune del huésped (86). En el caso de los pacientes con infección primaria asintomática, los datos virológicos e inmunológicos son escasos y contradictorios.

3.- Progresion de la infeccion y periodo de latencia clinica. Posterior a la fase de viremia inicial y diseminacion, se presenta una fase asintomatica o una sintomatologia minima que se extiende por un periodo de 7 a 10 anos y termina con la aparicion de un marcada inmunodeficiencia presente en un 80% de los pacientes (progresion tipica de la enfermedad) (84). Finalmente, aproximadamente un 10 – 15% de los pacientes presentan una evolucion rapida de esta fase que puede durar 1 a 2 anos (progresion rapida de la enfermedad) (82,86). Durante este periodo se observa una gran replicacion viral en los ganglios linfaticos. Sin embargo, este periodo se observa una baja carga viral serica y un bajo porcentaje de linfocitos CD4+ perifericos estan infectados (79).

A lo largo del curso de la infeccion por el VIH-1 se observa un cambio del fenotipo del VIH-1 (73). La fase asintomatica de la infeccion por el VIH-1 se caracteriza por presentar el fenotipo “inductor no sincitial” que presenta un crecimiento lento en tanto que durante el periodo sintomatico se presenta el fenotipo “inductor sincitial” con un rapido crecimiento, especialmente tropismo por los macrofagos e incapacidad para infectar a las celulas T “inmortalizada” (86,87).

Los organos susceptibles para la infeccion por el VIH-1 son principalmente los linfocitos CD4+ y tambien las celulas de la serie monocitos y macrofagos. Estudios in vitro comprobaron que los macrofagos presentes en diferentes organos tales como ganglios linfaticos, pulmon y SNC conforman un reservorio para el VIH-1 (88). Esta persistencia del VIH-1 en los macrofagos puede permancer oculta a la repuesta immune del huesped. Sin embargo, los monocitos circulantes parece ser celulas dianas de menor importancia comparadas con los macrofagos y por lo tanto seria un reservorio menor para la infeccion por VIH-1 asi como para la expresion (89,90).

3.- Enfermedad avanzada por el VIH. Posterior al periodo de latencia de la infeccion por VIH-1 se observa un descenso progresivo del contaje de linfocitos CD4+ e incremento de la carga viral del ARN del VIH-1. Los linfocitos CD4+ y la carga viral del ARN del VIH-1 son los marcadores predictivos del nivel de progresion de la infeccion por el VIH-1

parece ser mas fiable que el conteo de los linfocitos CD4+. Niveles plasmaticos del ARN del VIH > 30.000 mm<sup>3</sup>, irrespectivo del conteo de linfocitos CD4+ inferior a 200 mm<sup>3</sup>, hay un gran riesgo de aparicion de sintomas constitucionales y enfermedades oportunistas que puede revertir con el tratamiento antiretroviral. Durante este periodo el descenso de linfocitos CD4+ continua hasta cifras cero o proximas a cero por mm<sup>3</sup>. Durante este ultimo descenso es bien reconocido la aparicion de enfermedades oportunistas por lo que se indica profilaxis especifica (75).

#### **1.4.2.a. Mecanismo patogenicos del VIH-1.**

1. Efecto citopatico directo del VIH-1. Resultados de estudios in-vitro probaron la presencia del efecto citopatico del VIH-1 en cultivos celulares mediado por productos de los genes del VIH-1. El efecto citopatico podria ser llevado a cabo por destruccion celular, formacion del sincitio y destruccion celular, supresion de la funcion immune y modulacion de la interaccion entre el VIH-1 y la celula huesped (79).

- i) Destruccion celular simple: Este efecto citopatico probado in-vitro aun no fue confirmado in vivo. Aunque el preciso mecanismo de destruccion celular se desconoce, la utilizacion del sistema de produccion de proteinas de la celula infectada por el VIH-1 parece ser suficiente causa para tal efecto (79).
- ii) Formacion del sincitio celular y destruccion celular. La formacion del sincitio es debido a la interaccion del VIH-1 con las celulas CD4+ que conlleva a la fusion de las mismas y formacion de celulas gigantes. La formacion de este sincitio tiene la propiedad de eliminar las celulas CD4+ no infectadas (79). Una relacion directa entre la presencia del sincitio y el grado del efecto citopatico del VIH fue demostrada in vitro. Por otro lado, el VIH-1 aislados en fase avanzada de la enfermedad tiene una mayor capacidad de inducir sincitio.
- iii) Efecto citopatico indirecto del VIH-1. Diferentes procesos secundarios a una alteracion del sistema immune conllevan a la liberacion de mediadores por las celulas infectadas que afectarian a las celulas no infectadas. La incubacion de PMBCs con gp120 y anti-gp120 suprime la expresion de la molecula CD4+ y

suprime la repuesta proliferativa de los linfocitos al anti-CD3 contra TCR, hallazgos similares a los encontrados en celulas T de los pacientes con SIDA. La interaccion entre el receptor CD4+ y el complejo gp120 – antigp-120 fue postulado que causa disfuncion de la inmunidad celular en pacientes con infeccion por VIH avanzada (79).

#### **1.4.2.b. Efectos neuropatogenicos del VIH-1**

La afectacion neurologica presente en los pacientes con infeccion por VIH-1 se debe a los efectos directos e indirectos del VIH (93-96). La causa neurologica directa del VIH-1 se debe a la infeccion de las celulas microglias correspondientes a la serie monocito/macrofagos. Actualmente, no hay datos concluyentes de que el VIH-1 infecte a las neuronas (93,94). Sin embargo, los pacientes con infeccion por VIH-1 generalmente presentan una perdida de la sustancia blanca y gris cerebral. Se considera que el VIH-1 actua en forma directa o a traves de la inhibicion de la gp 120 sobre las neuronas asi como tambien por las citoquinas secundaria a la disregulacion inmunologicas (94-96). En LCR de pacientes con infeccion por VIH-1 se comprobo la presencia de altos niveles de TNF e IL6 que podrian afectar al resto del parenquima cerebral (81,94). En pacientes completamente asintomaticos, el VIH-1 fue aislado en muestras cerebrales asi como tambien en muestras del LCR. Sin embargo en estado avanzados de la infeccion por VIH-1 es frecuente la presencia de afectacion del SNC y sistema nervioso periferico (96).

*Afectacion del SNC precoz en la infeccion por VIH-1.* Poco despues de la seroconversion, en el plazo de pocas semanas de duracion, puede presentarse una serie de complicaciones agudas o subagudas, focales o difusas. Entre estas afectaciones del SNC se citan la meningitis, ataxia, mielopatias, en tanto que las complicaciones del SNP pueden ser: craneal, plexopatia braquial o neuropatia. Estas complicaciones del SNC se presentan con estudios normales de tomografia computarizada del cerebro aunque los registros electroencefalograficos pueden mostrar registros con alteraciones focales o lentitud difusa (98).

Durante el periodo asintomático o latente de la infección por VIH las complicaciones más frecuentes son las neuropatías de curso agudo o crónico similar al síndrome de Guillain Barre, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica generalmente acompañado de pleocitosis (96). Un cuadro clínico similar a la esclerosis múltiple fue descrito en este periodo de la infección por VIH-1. Se postula que ambos cuadros clínicos son secundarios a un fenómeno autoinmune desencadenado por la infección por el VIH-1 (96).

*Infección asintomática del SNC por el VIH-1.* La ausencia de manifestaciones neurológicas es la forma de presentación más frecuente. Sin embargo durante este periodo se observan las siguientes anomalías en LCR (97,98). i) Anomalías de los leucocitos, proteínas e inmunoglobulinas. ii) Producción a nivel de inmunoglobulinas anti-HIV-1, iii) Presencia de VIH-1. Estas anomalías del LCR presentes en el LCR de pacientes con VIH-1 deberían ser consideradas en el diagnóstico de otras entidades diferentes al VIH-1 o cuando se evalúa la respuesta al tratamiento de enfermedades que afectan el LCR.

#### **1.4.2.c. Complicaciones tardías del SNC por el VIH-1.**

En estado avanzado de la infección por el VIH-1 son frecuentes las complicaciones neurológicas como las descritas a continuación (95,99).

**Meningitis.** La meningitis es un hallazgo frecuente en pacientes con infección por VIH-1, pudiendo presentarse en forma asintomática, cuadros clínicos leves como cefalea, hidrocefalia y cuadros neurológicos focales como parálisis de pares craneales. Las alteraciones neurológicas en pacientes con infección por VIH-1 y meningitis son descritas en la tabla 4.

Tabla 4. Meningitis en pacientes con infección por VIH-1.

Frecuentes: Meningitis aseptica

Meningitis por *Cryptococcus neoformans*  
Reaccion meníngea asintomática

No frecuente: Tuberculosa  
Sifilítica  
Histoplasmosis  
Coccidiomicosis  
Linfomatosa

Cabe reseñar que la meningitis aseptica probablemente secundaria al propio VIH-1 puede ocurrir durante la seroconversion pero mas frecuentemente en estadios avanzados de la infeccion por VIH-1. El cuadro clinico es similar a otras meningitis aunque durante el periodo tardio de la infeccion por VIH-1, la meningitis se manifiesta principalmente por cefalea y fotofobia en tanto en el periodo temprano se agrega la rigidez de nuca. Paralisis de pares craneales, principalmente los pares V, VII y VIII pueden estar presentes. En el examen del LCR puede presentarse una discreta pleocitosis con leve aumento de las proteinas y normal o leve disminucion de la glucosa. Estos hallazgos clinicos inespecificos y anormalidades del LCR de una meningitis aseptica dificultan el diagnostico en casos de sospecha de meningitis por *C. neoformans*, meningitis sifilítica y tuberculosa.

*Afectacion del SNC por el VIH y Demencia SIDA (91-97).* La afectacion del SNC por el propio VIH se manifiesta por una variedad de sintomas neurologicos y psiquiatricos con relacion a un progresivo deterioro del estado inmunologico. La mejoría de los sintomas neuropsiquiatricos son descritos en pacientes tratados con antiretrovirales. A diferencia de otras complicaciones del SNC, la afectacion del SNC por el VIH y la demencia SIDA no afecta el estado de alerta. La demencia SIDA es una complicacion tardia de la afectacion del SNC por el VIH-1 que ocurren en menos de un 5% de las patients con infeccion por VIH-1. Diferentes autores describieron alteraciones histologicas del SNC hasta en un 90% de los pacientes con infeccion por VIH. Los macrofagos, celulas gigantes y microglías son los principales reservorios del VIH-1 en el SNC. Las principales anormalidades histopatologicas se limitan fundamentalmente al area subcortical del cerebro.

La demencia SIDA se caracteriza por un marcado deterioro de las funciones cognitivas asociadas a anormalidades motoras y de la conducta. Las anormalidades motoras se caracterizan por la presencia de temblor, marcha inestable y perdida del equilibrio. En tanto las conductuales se caracterizan por la presencia de agresividad, apatia y/o regresion a un estado vegetativo. Las anormalidades del LCR se limitan principalmente a un pequeno incremento de las proteinas y celulas linfociticas. El incremento del LCR de  $\alpha_2$ -microglobulina, neopterina, acido quinolonico son de dificil interpretacion mas alla de ser potenciales productos y/o mediadores inflamatorios. En tanto los estudios de las imagenes del SNC muestran una atrofia cerebral. Hallazgos de elevada intensidad en T2 son descritos en estudios de resonancia magnetica computarizada. Asi, el diagnostico de demencia SIDA es realizado ante la presencia de los hallazgos clinicos previamente descritos despues de haberse descartado otras complicaciones del SNC.

Asimismo, los pacientes con infeccion por VIH puede presentar complicaciones del SNC debido a enfermedades oportunistas y no oportunistas. Las complicaciones del SNC secundarias a enfermedades oportunistas son frecuentes en fase avanzada de la infeccion por VIH-1 asociadas a un deterioro del estado inmunologico (Tabla 5). Estas enfermedades oportunistas del SNC por generalmente estan asociadas a algun grado de enfermedad del SNC por el propio VIH-1. Las complicaciones del SNC por enfermedades no oportunistas pueden presentarse en cualquier estadio de la infeccion por VIH (tabla 5).

Tabla 5. Enfermedades oportunistas y no oportunistas del SNC en pacientes con infeccion por VIH-1

- Toxoplasmosis
- Criptococcosis
- Encefalitis herpetica
- Encefalitis por CMV
- Leucoencefalopatia multifocal progresiva
- Tuberculosis
- Neurosifilis
- Linfoma

#### **1.4.2.d. Neurosifilis en la era del tratamiento antiretroviral altamente efectivo (TARVAE)**

Importantes avances en el tratamiento de la infeccion por VIH-1 se han logrado recientemente. La cuantificacion del ARN del VIH-1 en el suero es un marcador del

estadio de la enfermedad así como también en la toma de decisión para el inicio del tratamiento y evaluación de la respuesta al tratamiento (100,101). Con relación al tratamiento, la TARVAE, dado por diferentes combinaciones de nucleosidos análogos, nucleosidos no análogos y inhibidores de la proteasa permitió progresos en el manejo de la infección por VIH (102). Actualmente se desconoce el impacto del TARVAE sobre los diferentes hallazgos clínicos y de laboratorio atípicos en pacientes con sífilis y principalmente de la neurosífilis descritos en la era pre-TARVAE. Interrogantes sobre el impacto del TARVAE sobre hallazgos tales como elevados títulos de las pruebas treponémicas, incidencia de falsos positivos y pleocitosis descritas como secundarias al propio VIH están pendientes de ser valoradas. Desafortunadamente, el TARVAE cuenta con importantes inconvenientes principalmente secundarias al rápido desarrollo de resistencia del VIH-1 al tratamiento antirretroviral, efectos adversos e interacción de las drogas de tratamiento antirretroviral con otros medicamentos no antirretrovirales. Los inhibidores de la proteasa son metabolizados en el sistema de citocromo P450 por lo que presenta frecuentes interacciones con otros medicamentos comúnmente prescritos en los pacientes con infección por VIH (105).

### **1.5. Estudios de la PCR en la detección del ADN del *T pallidum***

La primera aplicación de la PCR para la detección del ADN del *T pallidum* fue realizada en 1989 por Hay y colaboradores (106). En dicho estudio se evaluó la detección del gen *TmpA* que codifica una proteína de superficie de la membrana de 45 kDa, y el gen 4D que codifica la proteína de superficie de 19kDa. Se utilizó un primer PTJT/2 de una secuencia de 599 bases para el gen *TmpA*, y los primers PHD1/2 de 428 pb y PHD3/4 de 364 pb para el gen 4D. Una sonda de 2.3 kbp que incluía la región ampliada del *TmpA* fue preparada a partir del plásmido PMJB10. Como control positivo se utilizó *T pallidum*, cepas Nichols extraídas de testículos de conejos. Estas muestras de controles fueron diluidas en LCR libre de *T pallidum* hasta una concentración de  $1.3 \times 10^3$  por ml. La identificación del ADN amplificado se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y Southern blot. La PCR fue lo suficientemente sensible para detectar el ADN de 65 organismos obtenidos en tres diluciones sucesivas desde la

solucion original. Una reaccion cruzada entre ADN del *T pallidum* y el ADN del *T pertenue* fue descrita. De las 30 muestras de LCR provenientes de pacientes con bajo riesgo para infeccion por VIH y sin determinacion serologicas para sifilis, una muestra fue positiva a ambos primers. En tanto, de las 19 muestras de LCR de patients con sifilis latente o tardia, 10 fueron positivas a lo mismo que 7 de 28 muestras de pacientes con infeccion por VIH. El resultado positivo obtenido de las muestras de controles sanos correspondio al LCR de un neonato con hallazgos sugestivos de sifilis congenital aunque esto no fue confirmado.

Tabla 6. Resultados de la PCR en muestras del LCR realizados por Hay y colaboradores (106)

<u>Pacientes</u>	<u>(n)</u>	<u>Positivos</u>
Controles negativos	30	1
Sifilis latente o tardia	19	10 (53%)
Pacientes con infeccion por VIH	28	7 (25%)

Desafortunadamente, este trabajo conto con los siguiente sesgos: I) No se comento si los patients con infeccion por VIH tenian algun antecedentes de sifilis asi com el grado de inmunosupresion. ii) Se desconoce en que condiciones se almacenaron las muestras de LCR y cuantas veces fueron descongeladas. iii) Los resultados de PCR no fueron corroborados por el prueba de infectividad en conejos.

En 1991, Burstein y colaboradores evaluaron mediante la tecnica de PCR la amplificacion del segmento del gen de 658-pb que codifica la proteina de 47-kDa de la membrana del *T pallidum* (figura 7) (107). Ademas de las tecnicas ordinarias para la sifilis, se utilizo el prueba de infectividad en conejos. Las muestras biologicas evaluadas fueron de liquido amniotico de pacientes con sifilis no tratadas y sujetos sanos; suero y LCR de sujetos adultos sanos y pacientes con sifilis no tratadas. En el caso de las muestras de testiculos de conejos, la PCR se realizo en muestras parafinadas. La hibridacion de los productos de la PCR fue llevada a cabo con una sonda de ADN. La sonda de ADN consistio en un fragmento interno de 496 pb (713 – 1028 pb) provenientes del plasmido Tpp47 (115). En la hibridacion de los productos amplificados se utilizaron las tecnicas de

Dot blot y Southern blot. Esta tecnica de PCR fue lo suficientemente sensible para detectar el ADN de 10 microorganismos. No se obtuvo resultados falsos positivos. Las muestras sericas, liquidos amnioticos y de LCR de pacientes con sifilis no tratadas fueron positivas para la tecnica de PCR. Un resultado positivo de PCR fue objetivado en el suero y LCR de un paciente con sifilis latente precoz sin otra anormalidad del LCR y otra muestra del LCR de un paciente con meningitis sifilitica. Sin embargo, resultados fueron negativos descritos en dos muestras de LCR de dos pacientes con paralisis generalizadas. Este estudio conto con un mejoramiento de la tecnica de PCR dado que las sondas de ADN fueron mas extensa permitiendo disminuir los falsos positivos asi como una mayor radiotitulacion. Un hallazgo de interes fue la inhibicion de la PCR observada en muestras de tejido testicular de conejos y leucocitos humanos. La inhibicion de la PCR estuvo tambien presente en algunas muestras con *T pallidum*, sin embargo los resultados del PCR fueron postivos posterior a la extraccion dle ADN; procedimiento mas sensible y fiable para la preparacion de las muestras. Los primers y sus correspondientes localizaciones se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Secuencia de los primers

Primers	Secuencia de codificacion	Localizacion (nt)
47-1	GACAATGCTCACTGAGGATAGT +	648-669
47-2	ACGCACAGAACCGAATTCCTTG -	1284 - 1305
47-3	TTGTGGTAGACACGGTGGGTAC +	713 - 734
47-4	TGATCGCTGACAAGCTTAGGCT -	1187 - 1208

Secuencia de ADN tomada de Burstein y colaboradores (107)

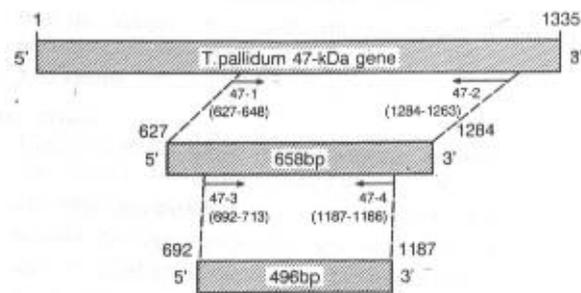


Figura 7. Primers y sonda para la detección del *T pallidum* mediante el gen de la proteína de membrana de 47kDa (Gen Bank accession number 88769 and M27493)

Grimprel y colaboradores de la Universidad SouthWestern Texas en 1991 evaluaron el aislamiento de la porcion del ADN de 658 pb que codifica la proteína

inmunogena de 47-kDa del *T pallidum* de muestras de liquido amniotico, suero fetal y neonatal y LCR en el diagnostico de la sifilis congenital (108). A fin de superar los inhibidores para la deteccion por PCR, cuatro metodos diferentes para el procesamiento de las muestras fueron evaluados: i) Calentamiento hasta ebullicion. ii) Separacion por centrifugado lento. iii) Lisis alcalina. iv) Separacion por centrifugacion estandarizada. Los metodos de centrifugacion lenta y lisis alcalina dieron un mayor rendimiento en los resultados de la PCR cuando fueron comparados con el prueba de infectividad en conejos. La lisis alcalina mostro mejores resultados en muestras con pequenos volumenes. La PCR mostro un 100% de especificidad y una sensibilidad de un 78%; sin embargo, la sensibilidad fue de un 100% en muestras de liquido amniotico, pero menos sensible en muestras sericas y de LCR. Esta menor sensibilidad en muestras sericas y de LCR se considerada ser secundaria una menor concentracion de los treponemas.

Otros estudios que evaluaron la deteccion del ADN de *T pallidum* en muestras de LCR de pacientes con neurosifilis no tratadas y tratadas fue comunicados por Noordhoek y colaboradores (109). En este trabajo se evaluo la deteccion del gen de la proteina de membrana de 39-kDa bmp del *T pallidum*. La tecnica de PCR conto con una alta sensibilidad capaz de detectar el ADN de un simple treponema. Desafortunadamente, las muestras fueron congeladas y descongeladas repetidas veces. El LCR de un total de 29 pacientes con neurosifilis asintomatica y sintomatica fueron evaluadas a diferentes tiempos. En los pacientes no tratados, el ADN del *T pallidum* fue detectado en 5 de 7 con neurosifilis sintomatica aguda, en 2 de 6 con neurosifilis asintomatica y en ninguna de loas neurosifilis asintomaticas cronicas. El ADN del *T pallidum* tambien fue detectado en LCR de pacientes tratados con penicilina G intravenosa, en algunos casos hasta 3 anos despues del tratamiento.

Sanchez y colaboradores evaluaron la PCR en la deteccion del ADN del *T pallidum* para el diagnostico de la sifilis congenitca y neurosifilis congenita en una serie de 19 neonatos de madres con sifilis precoz no tratadas (110). La tecnica de PCR fue comparada con el prueba de infectividad en conejos e inmunoblot para IgM anti-*T pallidum*. El

procedimiento para la técnica de PCR fue similar al realizado por Grimpel y colaboradores (108). Los resultados para la PCR en muestras sericas fueron positivas en 6 de 7 pacientes con manifestaciones clínicas de sífilis congénitas. De 6 pacientes sintomáticos con resultados positivos para el prueba de infectividad en conejos, 5 tuvieron resultados positivos para la PCR. Al contrario de los 12 pacientes asintomáticos, uno fue positivo para el prueba de infectividad en conejos pero ninguno para la PCR.

Finalmente, Gordon y colaboradores (57) evaluaron la respuesta al tratamiento con penicilina G sodica IV en pacientes con infección por VIH y neurosífilis sintomática mediante el prueba de infectividad en conejos y PCR en muestras de LCR. De los 11 pacientes con neurosífilis sintomática, 5 habían sido tratados para sífilis precoz con penicilina G benzatinica. Todos los pacientes fueron tratados con altas dosis de penicilina G sodica IV durante 10 días. El examen de LCR fue realizado entre los 6 y 24 meses después del tratamiento. En cuatro de los siete pacientes evaluados a las 24 semanas posteriores al tratamiento, los títulos sericos de RPR disminuyeron al menos dos veces y los títulos de VDRL in LCR o negativización fueron observados en cuatro pacientes. Dos pacientes no mostraron ningún cambios de los título sericos de RPR o VDRL en LCR. Previo al tratamiento, la PCR resulto positiva en 3 de 10 pacientes y en ninguno de los 10 pacientes posterior al tratamiento. Un paciente presento una meningitis sífilítica recidivante seis meses posterior al tratamiento; sin embargo, la PCR resulto ser negativa.

Como conclusión, estos trabajos examinaron la utilidad de la PCR en el diagnóstico de la neurosífilis y también la eficacia del tratamiento de la neurosífilis. Según datos disponibles se impone la técnica utilizada por el grupo de investigadores de la Universidad de Texas Southwestern que evaluaron el gen 658-pb para la proteína de 47-kDa de la membrana del *T pallidum*, complementada con la hibridación ADN –ADN. En los casos de los pacientes con infección por VIH, la descripción del conteo de linfocitos CD4+ fue incompleta. En muchos de estos trabajos no se describió el conteo de los linfocitos CD4+ al momento del diagnóstico de la sífilis, neurosífilis y posterior al tratamiento, lo que dificulta correlacionar los resultados de la PCR con el grado de inmunosupresión. Los

resultados de la PCR en el diagnóstico de neurosífilis en pacientes adultos son discordantes con el prueba de infectividad en conejos y pruebas diagnósticas convencionales. Estos resultados reflejarían las limitaciones en el conocimiento de la fisiopatología de la neurosífilis así como de los factores desconocidos presentes en las muestras biológicas que inhibirían a la PCR.

### **1.6. Objetivo del estudio.**

Numerosos trabajos describieron un incremento de la prevalencia de la sífilis en la última década. La reaparición de la sífilis fue además descrita asociada a presentaciones atípicas en pacientes con infección por VIH así como de importantes controversias en el diagnóstico serológico y respuesta al tratamiento estandarizado. Esta información deriva de casos clínicos y pequeñas series de pacientes con infección por VIH-1 en quienes se encontraron importantes limitaciones en la interpretación de la serología de la sífilis tanto en suero como en el LCR. Las limitaciones serológicas en el diagnóstico de la sífilis conocida desde la era pre-SIDA se exacerbaron en los pacientes infectados por el VIH debido a las significativas anomalías inmunológicas. Dichas limitaciones serológicas afectan no solamente el diagnóstico sino también la evaluación del tratamiento. Asimismo, se describieron casos con recaídas de sífilis y neurosífilis después de recibir el tratamiento estandarizado en esta población de pacientes. Nuestro trabajo se centró en el estudio de la neurosífilis en los pacientes con infección por VIH-1. De este modo se evaluó la neurosífilis en pacientes con infección por VIH-1 bajo los siguientes puntos: i) Prevalencia de la neurosífilis. ii) Evaluación de la eficacia del tratamiento estandarizado de la sífilis en pacientes con infección por VIH. iii) Evaluación de la eficacia del tratamiento estandarizado de la sífilis en pacientes con infección por VIH mediante la detección del ADN del *T pallidum* mediante la PCR y el prueba de infectividad en conejos en LCR posterior al tratamiento.

## **2. Material y métodos**

### **2.1. Pacientes**

Los pacientes del presente estudio provinieron del Hospital Xeral de Vigo.

Las principales características de nuestro estudio de neurosífilis en pacientes con infección por VIH-1 constan de dos partes como descritas a continuación.

### **2.1.a. Estudio de la prevalencia de la neurosífilis en la población de pacientes con infección por VIH-1**

- i) La población de estudio fueron todos los pacientes con infección por VIH-1 de nuestro centro seguidos a partir de Enero de 1991 hasta el 30 de Junio de 1994.
- ii) En todos los pacientes se contaba con una evaluación completa para enfermedades de transmisión sexual lo cual también incluyó serología para la sífilis. En todos los pacientes se interrogó específicamente en relación a sus antecedentes de enfermedades venéreas, fecha de iniciación de la infección, tratamiento antimicrobial y complicaciones. En todos los pacientes se remarco la fecha del diagnóstico de la sífilis en relación a la fecha del diagnóstico de la infección por VIH.
- iii) En los pacientes con serología positiva para sífilis se les informaron de los resultados y bajo su consentimiento fueron incluidos en el presente estudio. Los pacientes recibieron información completa sobre las probables complicaciones de la sífilis en su condición de portadores de la infección del VIH-1. Los pacientes fueron también informados de las principales pruebas a realizar en nuestro estudio incluyendo punción lumbar. La evaluación del LCR incluyó el conteo de los leucocitos, proteínas y glucosa, VDRL, tinción de Gram, cultivo bacteriológico de rutina, antígeno criptocócico, cultivo Saboureaud, ADA, frotis para bacilo de Koch y cultivo Lowenstein.
- iv) Se creó una ficha personal de cada paciente para el registro de datos demográfico (edad, sexo, profesión, etc); hábito sexual, grupo de riesgo para la infección por VIH-1; fecha del diagnóstico de la infección por VIH-1; historia clínica en relación a enfermedades venéreas y oportunistas; tratamiento antiretroviral; conteo de los linfocitos CD4+ y estadio de la infección por VIH según la clasificación del CDC de 1992 (111).

- v) En todos los pacientes se llevo a cabo el tratamiento de la sifilis segun su estadio de la enfermedad:
- Sifilis temprana y latente: 2.400.000 unidades de penicilina benzatinica IM cada semana por un total de tres semanas o penicilina procainica 2.400.000 unidades por dia mas probenecid, ambos por un total de diez dias.
  - Neurosifilis 24.000.000 unidades de penicilina G sodica IV por dia por un total de 14 dias.

Posterior al tratamiento, todos los pacientes recibieron una valoracion clinica y serologica de la sifilis cada tres meses durante un ano y luego cada seis meses.

**2.1.b. La segunda parte del estudio correspondio a la evaluacion del tratameinto de la neurosifilis mediante la PCR y el prueba de infectividad en conejos**

De nuestra cohorte de pacientes con infeccion por VIH-1 y sifilis, se incluyeron a los pacientes con sifilis diagnosticadas simultaneamente o posterior al diagnostico de la infeccion por VIH.

- viii) Esta cohorte de pacientes fue seguida desde el 1 de Enero de 1992 al 31 de Diciembre de 1995. En forma prospectiva, una evaluacion clinica y serologica para la sifilis fue realizado cada tres meses por un ano y luego cada seis meses.
- ix) En todos los pacientes se realizo una evaluacion clinica y de laboratorio de la infeccion por VIH, la cual incluyo el conteaje de linfocitos CD4+, tratamiento antiretrovirico, evaluacion para enfermedades oportunistas y estadio de la infeccion por VIH segun la clasificacion del CDC de 1992 (111).
- x) En todos los pacientes se realizo una puncion lumbar. La evaluacion del LCR incluyo el conteaje de los leucocitos (valor normal  $< 5 \text{ mm}^3$ , proteinas (valor normal  $< 40 \text{ mg/dl}$ ) y glucosa (valor normal  $< 50\%$  del valor de la glucemia simultanea), VDRL, tincion de Gram, cultivo bacteriologico de rutina, antígeno

criptococico, cultivo Saboureaud, ADA, frotis para bacilo de Koch y cultivo Lowenstein. Además, se incluyó la determinación del ADN del *T pallidum* y prueba de infectividad en conejos como pruebas de referencia para el diagnóstico de la neurosífilis.

Tabla 8. Evaluación realizada en los pacientes al inicio del estudio y durante el seguimiento

Evaluación inicial			Segunda evaluación		
Sangre	LCR	Examen clínico	Sangre	LCR	Examen clínico
RPR	VDRL	=Infección por VIH	RPR	VDRL	=Infección por VIH
TPHA	TPHA	Estadio de la sífilis	TPHA	TPHA	Estadio de la sífilis
Linfocitos CD4+	Leucocitos		Linfocitos CD4+	Leucocitos	
				=TIC	
				PCR	

= Clasificación de la infección por VIH según del CDC (111)

= Prueba de infectividad en conejos

- xi) La técnica de PCR fue realizada en la Unidad de Investigación del Hospital Xeral de Vigo como descrita en el apartado 2.2.c.
- xii) La prueba de infectividad en conejos se realizó con la asistencia de un veterinario. Dicha técnica se llevó a cabo siguiendo el protocolo estandarizado como descrito en el apartado 2.2.d.

## 2.1. Técnica de laboratorio

### 2.2.a Pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por VIH-1

La infección por VIH-1 fue confirmada por las técnicas estandarizadas: ELISA y Western Blot.

### 2.2.b. Pruebas serológicas para el diagnóstico de la sífilis (117)

Prueba Rapid Plasma Reaction (RPR). Para el screening para la sífilis se utilizó la técnica serológica RPR slide-prueba del laboratorio BioMeriux, Francia. Esta técnica detecta reagin sífilítica en suero o plasma por una reacción de aglutinación en presencia de un

antígeno no treponémico de tipo VDRL modificado. El antígeno contiene micropartículas de carbono que coagulan cuando la reacción es positiva facilitando la observación macroscópica. El reactivo está compuesto por antígeno VDRL al que se añade EDTA, cloruro de colina, mertiolato sódico y micropartículas de carbono. Posteriormente se realiza las diluciones seriadas cuantitativas (8).

*VRDL*. La técnica se utilizó como técnica estandarizada para el diagnóstico de la neurosífilis en muestras de LCR. La técnica VDRL se fundamenta por la presencia del antígeno cardiolipina que asociado con latex desencadena una reacción de microaglutinación rápida en muestras de suero o plasma de pacientes con sífilis. Posteriormente, se realiza una lectura seriada de los títulos (8,13).

*TPHA*. Es prueba MHA-TP se utilizó para la confirmación serológica de sífilis. El fundamento de MHA-TP se basa en la determinación del anticuerpo del *T pallidum* en muestras de suero. Esta técnica es altamente específica para la confirmación serológica de la sífilis. Esta prueba consiste en la aglutinación de eritrocitos de carneros sensibilizados con anticuerpos control contra *T pallidum*. Antes de realizar la prueba, las muestras de suero se mezclan con un diluyente para remover los reactantes inespecíficos. El suero con anticuerpos específico reacciona con los eritrocitos de carnero sensibilizados, los cuales están cubiertos con antígenos de *T pallidum* formando un ruedo homogéneo de células aglutinadas (8,13).

### **2.2.c. Técnica de PCR para la detección del ADN del *T pallidum* en LCR**

#### **2.2.c.a. Preparación de las muestras del LCR**

Material y reactivos:

- Ultracentrifuga
- Pipetas serológicas de 10 a 25 ml
- Jeringas de 1 ml
- Agua estéril
- Chelex-100 (Bio-Rad)
- TE buffer estéril: 10 mM Tris (pH 7,4), 1 mM EDTA
- 10 x PCR buffer: 100 mM Tris (pH 8,3), 500 mM KCL, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml de gelatina
- 1,25 mM deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (Pharmacia en agua)
- Primers 47-1 y 47-2 (0.5 µg/µl en agua)

- Mezcla maestra para la PCR: 20 mM de Tris-HCL (pH 8,4); 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.5 µg de primers 47-1; 0.5 µg de primers 47-2; 100 µM de dNTP y 2.5 U de Taq polimerasa. El volumen de la mezcla maestra fue de 50 µl para cada reaccion.
- Buffer de electroforesis: TBE conteniendo Bromuro de Etidio al 0.012%
- Buffer de carga de electroforesis. Ficoll 15%
- Solucion de desnaturalizacion: NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M
- Solucion de neutralizacion: Tris HCL 1 M, (pH 8,0), NaCl 1,5 M
- Nitrocelulosa
- Solucion de hibridacion: NaCl 1 M, SDS 1%, Dextran sulfato 10%, ADN de esperma de salmon 100 µg/ml

#### Extraccion del ADN bacteriano a partir de muestras de LCR

El procesamiento inicial de las muestras es a fin de extraer el ADN bacteriano para su manipulacion. La tecnica de extraccion del ADN es relativamente sencilla, y tan solo es necesario evitar toda destruccion enzimatica o mecanica de los mismos. En nuestro estudio, la extraccion del ADN se realizo como descrito a continuacion.

##### i) Metodo de ebullicion o "Boiling method"

- Agregar alícuotas de muestras de LCR en el tubo de la centrifuga hasta completar un total de 50 µl
- Agregar 150 µl de 5% Chelex-100 a la muestra
- Ebullicir las muestras durante 10 minutos, posteriormente reposar las muestras en hielo durante 5 minutos seguido por una centrifugacion de un minuto
- Agregar 50 µl de esta muestra a 50 µl de la mezcla maestra de la PCR.

##### i) Centrifugacion o "Spin method"

- Centrifugar las muestras a 20.000 x g a una temperatura de 4C durante una hora
- Remover el sobrenadante y dejar un remanente de aproximadamente de 50 µl
- Agregar 150 µl de 5% de Chelex-100 al remanente del tubo de centrifuga
- Ebullicir las muestras durante 10 minutos y colocarlas directamente en hielo durante 5 minutos y posterior centrifugacion por 1 minuto
- Agregar 50 µl del sobrenadante a 50 µl de la mezcla de PCR

#### 2.2.c.b. Amplificacion del ADN diana de la proteina de 47 kDa de la membrana del *T pallidum*

- Agregar 80 µl del aceite mineral a cada tubo conteniendo las mezclas de PCR
- Colocar en hielo cada tubo con las mezclas en hielo
- Ejecutar la tecnica de PCR, desnaturalizacion, hibridacion y sintesis como descrita a continuacion

Tabla 9. Ciclos de la PCR en muestras de LCR

Fases	Duracion	Temperatura
Desnaturalizacion	1,15 minutos	94 C
Hibridacion	1.15 minutos	58 C
Sintesis	1 minuto	72 C

- Posterior a un total de 40 ciclos, incubar los productos de PCR por 10 minutos a 72C. Finalmente, se almacenan los productos de PCR a - 4C.

### **2.2.c.c. Analisis de los productos de amplificacion del ADN**

i) Electroforesis en gel de agarosa: Con el objetivo de identificar los productos de PCR se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1.4.%; buffer TBE conteniendo bromuro de etidio 0.5 µl/ml. Simultaneamente, se realiza la electroforesis de los controles de los productos. En el mismo se siembran las muestras de diferentes pesos moleculares previamente estandarizadas. Esto permite determinar los productos de PCR, especificamente la identificacion del fragmento del ADN de 658 pb. Posterior a la electroforesis, los geles son fotografiados bajo luz ultravioleta.

ii) Dot Blot. Posterior a la electroforesis, una decima parte de los productos de la PCR son desnaturalizados por ebullicion, colocados en un filtro de nylon y fijados al mismo medicante irradiacion ultravioleta. El filtro se hibrida con la sonda de ADN. La hibridacion es llevado a cabo con una sonda de ADN interna de 496-bp usando los “primers” 47-3 y 47-4 marcada con digoxigenina (DIG)-11-dUTP (DIG DNA labeling kit, Boering Mannheim , GmgH). La hibridacion de fragmento diana se identifica por la prueba de enzima de immunoensayo con susbtrato de luminiscencia CSPD (DIG luminescent detection kit; Boehringer Mannheim , GmbH). Finalmente, se lavan los filtros a la temperatura optima y se exponen a una pelicula de rayos X.

### **2.2.c.d. Control de calidad**

i) “Boiling only”

Control negativo: 50 µl de LCR normal

Control positivo: 50 µl de LCR normal con  $10^3$  *T pallidum*

ii) Spin method

Control negativo: 200 µl de LCR normal

Control positivo: 200 µl de LCR normal con  $10^3$  *T pallidum*

iii) Control de reactivos para la PCR

Control negativo: 50 µl de agua esteril sin ADN). Con el objetivo de comprobar amplificacion inespecifica de germenenes contaminantes

Control positivo I: 2 ng de plasmido en 50 µl de agua) El pPH 47.2 que contiene el gen clonado que codifica la proteina de 4-kDa de la membrana del *T pallidum*

Control positivo II: *T pallidum* liofilizado, cepa Nichols, BioMerieux . Con el fin de confirmar que el correcto tratamiento de la muestra y amplificacion de los productos.

### **2.2.d. Prueba de infectividad en conejos**

El prueba de infectividad en conejos (TIC) es la prueba de referencia en la evaluacion de las pruebas diagnosticas de la sifilis y neurosifilis con una sensibilidad del 100% para una inoculacion igual o superior a 23 treponemas. Esta tecnica se basa en la inoculacion de las muestras en estudio, suero o LCR, en los testiculos de conejos seguidos realizamos el TIC modificado por Turner y colaboradores (23) como descritos por otros autores (10, 70). Nuestro trabajo fue llevado a cabo en nuestro animalario con la participacion de un Veterinario miembro del grupo de investigacion. Para esta prueba se conto con conejos “New Zealand” con serologia RPR y TPHA negativas. Un total de 2 ml de LCR de cada paciente en estudio fue inoculado en cada testiculo de conejo. Posterior a

la inoculación, cada conejo permaneció en una jaula individual a una temperatura ambiental de 20 – 25 C y fueron alimentados con comida sin antibióticos. A continuación, se realizó una evaluación del estado general y testículos en forma diaria durante la primera semana después de la inoculación, y posteriormente en forma semanal. Los testículos se evaluaron si presentaban aumento del tamaño y/o enrojecimiento que sugiriera orquitis. Una biopsia de los testículos y serología, RPR y TPHA en muestra de sangre, fue realizada en cada conejo después de tres meses de seguimiento. Las muestras de testículos fueron homogenizadas y examinadas por inmunofluorescencia directa con anticuerpo con anticuerpo conjugados con *T pallidum* (Biogenesis Ltd). El resultado de TIC fue considerada negativo en caso de resultado de prueba de inmunofluorescencia negativo y viceversa.

### **2.2.c. Analisis estadístico**

El análisis estadístico fue realizado para el estudio de la prevalencia de la neurosífilis en pacientes con infección por VIH. En este estudio, se consideró tres diferentes grupos. Grupo 1: Pacientes en quienes la sífilis fue diagnosticada antes del diagnóstico de infección por VIH. Grupo 2: Pacientes en quienes la sífilis e infección por VIH fueron diagnosticadas simultáneamente. Grupo 3: Pacientes en quienes la sífilis fue confirmada después del diagnóstico de la infección por VIH. Los pacientes del grupo 1, 2 y 3 con pleocitosis y VDRL negativo en LCR fueron duplicados para formar un nuevo grupo y compararlos con aquellos con pleocitosis y VDRL positivo. Las siguientes variables fueron valoradas: conteo de linfocitos CD4+, RPR, TPHA, leucocitos en LCR y VDRL en LCR. El análisis estadístico se realizó con SPSS/PC V3 (SPSS Inc., USA) y con Kwikstat V3, 3 (TexasSoft, USA). El método de Kruskal-Wallis fue usado para la comparación de los grupos. Valores significativos fueron obtenidos con SPSS/PC y el método de Kruskal-Wallis.  $P < 0.05$  fue consideración significativo.