

## **LA INMUNOHISTOQUIMICA EN EL DIAGNOSTICO DEL TREPONEMA PALLIDUM DE LA PIEL**

Autores: Carmen I Pérez<sup>1</sup> Maritza R. Martinez<sup>2</sup>, Belén Z. Iglesias Ramírez<sup>3</sup>

1. Medical doctor, Supervisora de Histología de la Universidad de Miami.  
Medlabeducational&Researchservices.LLC

2. PhD, Supervisora de Histología. MedlabEducational&ResearchServices.LLC

3. Profesor consultante y Titular de Histología, MSC. en Educación Médica.

### **Resumen**

La sífilis es una infección crónica de transmisión sexual que aún es relativamente frecuente, causada por una bacteria (espiroqueta) conocida como Treponema Pallidum (TP) y cuyo diagnóstico se ha basado tradicionalmente en pruebas serológicas.

La Inmunohistoquímica es una importante herramienta en el diagnóstico histopatológico, su utilidad se ha demostrado por diferentes autores en la identificación de microorganismos como el Treponema Pallidum en biopsias de la piel e intestinales.

La pobre sensibilidad y especificidad de la tinción de plata con la técnica de Steiner o Warthin-Starry (WS) y la complejidad de la inmunofluorescencia hacen que, hoy en día la inmunohistoquímica (IHQ) sea la técnica más recomendada entre los histólogos. En este trabajo se utilizan anticuerpos policlonales anti-treponema Biocare para la detección del T. Pallidum en muestras en parafina y la técnica de plata Warthin – Starry (WS) se comparan cualitativamente los resultados, la sensibilidad y especificidad con el método IHQ son mayores, lo que corrobora otros estudios publicados.

## **Introducción.**

La sífilis es una infección crónica de transmisión sexual que se ha incrementado mundialmente en los últimos años. [1]

La sífilis causada por una bacteria (espiroqueta) conocida como *Treponema Pallidum* (TP) y cuyo diagnóstico se ha basado tradicionalmente en pruebas serológicas, sin embargo, estas pueden presentar una menor sensibilidad en pacientes con sífilis primaria, congénita y en la sífilis de pacientes inmunodeprimidos. [1, 2].

Las técnicas histológicas de plata Warthin-Starry (WS) se han utilizado por años en los laboratorios de histopatología, la introdujo en 1920 el patólogo americano Alfred Scot Whartin (1866-1931) y Allen Chronister Starry (1890-1973) esta técnica ha sido utilizada por años en los laboratorios de histopatología, con la aparición de nuevas tecnologías como la Inmunohistoquímica, ocasiono que la sensibilidad y especificidad de la técnica de WS, sea cuestionada dado las exigencias que conlleva la preparación de los reactivos, al punto de ser consideradas engorrosa y consumidora del tiempo del personal técnico [3,4] y con resultados de poca sensibilidad en la detección de las espiroquetas [5,6,7] así como excesiva coloración de fondo la que dificulta la rápida y fácil identificación de los microorganismos.

A partir del reconocimiento de Taylor C.R, en 1974 del valor diagnóstico de la Inmunohistoquímica IHC, esta se convirtió rápidamente en una técnica esencial en la ayuda del diagnóstico de rutina del laboratorio, definiendo nuevos criterios histológicos de diagnóstico en diferentes tejidos y patologías desplazando el uso de coloraciones especiales que venían utilizándose por años en los laboratorios de histopatología.

El estudio histológico del *Treponema Pallidum* se remonta al año 1905 cuando Levaditi, C [8] impregno con plata el bloque completo de tejido para demostrar el *Treponema Pallidum* como el organismo causante de la sífilis.

Posteriormente la técnica se mejoró incluyendo sales de uranio para bloquear la captación de la plata en estructuras no deseadas.

Los métodos de coloración de plata más usados para la visualización de las espiroquetas son Dieterle C [9], Warthin-Starry [10], Steiner G [11].

Posteriores modificaciones de estos métodos se introdujeron por Kerr en 1938 [12], Faulkner & Lillie en 1945 [13], Bridges and Luna en 1957, [14].

En la década de 1980 se introdujeron nuevas modificaciones a las técnicas de plata debido a introducción de la técnica de microonda [16,17,18] en el procesamiento de los tejidos y de las coloraciones.

No obstante, las múltiples modificaciones realizadas con el objetivo de simplificar y mejorar los métodos de coloración de las técnicas de plata, estas aun resultan laboriosas, conllevan un tiempo largo de realización y tiene altas probabilidades a desarrollar artefactos de fondo durante su preparación sino se siguen todas las indicaciones de control de calidad para realizar estas técnicas.

A partir del reconocimiento de Taylor C.R, en 1974 el valor diagnóstico de la Inmunohistoquímica IHQ, en diferentes patologías, la importancia de la IHQ se ha ido incrementando en la medida que aparecen nuevos estudios y crean nuevos anticuerpos diagnósticos.

De ahí que la IHQ se convirtió rápidamente en una técnica esencial en la ayuda diagnóstica de rutina de los laboratorios histopatológicos, definiendo nuevos criterios histológicos de diagnóstico en diferentes tejidos y patologías desplazando en parte el uso de coloraciones especiales que venían utilizándose por años en los laboratorios de histopatología, como es el caso de las coloraciones argénticas a diferencia de estas la IHQ se caracteriza por su alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del método técnico lo que garantiza un mejor diagnóstico si el laboratorio sigue los adecuados controles de calidad.

El objetivo de este trabajo es comparar los métodos de coloración argéntica en relación con el método IHQ en el diagnóstico del Treponema Pallidum de la piel.

### **Material y Método.**

Se estudiaron 12 casos de biopsias de la piel de lesiones cutáneas provenientes de bloques controles de sífilis primaria, los que se estudiaron con los métodos de impregnación argéntica Whartin-Wharry, y la técnica de inmunohistoquímica IHQ de anticuerpo policlonal levantado en conejo, anti-treponema de Biocare listo para usar. La coloración se hizo en Leica Bond Max automática, contrastado en rojo. La tinción con sales de plata tiñe de negro o carmelita oscuro las estructuras las cuales se les denominan argirófilos.[20]

Las coloraciones especiales de plata incluyen varios procedimientos de tinción que se basan en principios muy diferentes. Se pueden definir cinco categorías de tinciones de plata mediante los procedimientos fisicoquímicos involucrados. Estos son:

- métodos argentafines
- métodos argirófilos
- tinciones de impregnación
- tinciones de oxidación-reducción de plata
- interacciones metal-metálicas (auto metalografía).

Por ejemplo, las células neuroendocrinas pueden identificarse mediante técnicas de argentafines o argirófilos; mientras que los axones, los ovillos neurofibrilares y las placas seniles se identifican mediante técnicas de impregnación con plata.

Las espiroquetas son visualizadas con coloraciones argirófilos como el WS.

Como ocurre con otros hallazgos de las biopsias de sífilis, la IHQ de TP en las biopsias pone de manifiesto una enorme variación en la densidad de la espiroqueta e incluso en la localización. En ocasiones esta variabilidad es reflejo de su patrón anatomopatológico. En este trabajo dividimos la variación de la densidad IHQ en 4 grupos que van de 0 a 3, con el aumento de 40X identificamos la inmunotinción de los TP en:

[0] no visibles bacterias bajo objetivo 40X

[1] + escaso número de bacterias menos de 10 objetivo 40X

[2] ++ médium No. 20-50 bacterias objetivo 40X

[3] +++ abundante No.50 o más bacterias objetivo 40X

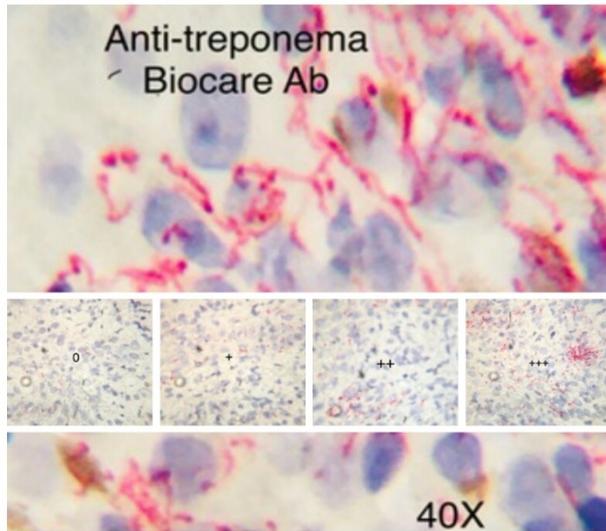


Figura 1. Parámetros utilizados de la Intensidad de reacción en las láminas histológicas estudiadas para la coloración IHQ del Treponema Pallidum en lesiones de la sífilis primaria de la piel.

Las tinciones de plata de impregnación también se pueden utilizar para demostrar bacterias que son difíciles de teñir con otros métodos como la coloración de Gram o de cultivar como es el caso de Treponema Pallidum y otras bacterias.

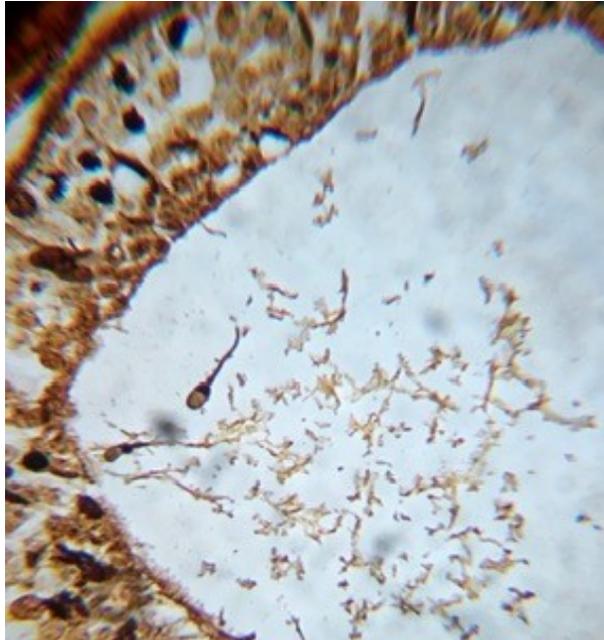


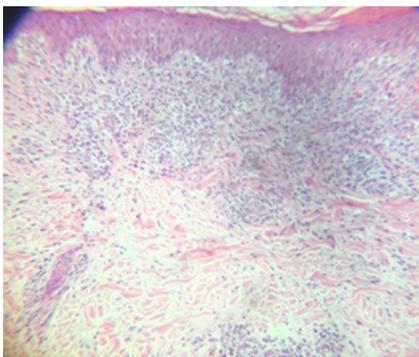
Figura 2. Coloración de plata Warthin-Starry, realizada en el coloreador automático Dako.

Lamina histológico de testículo infestado con Treponema Pallidum utilizada como control a las láminas de sífilis primaria estudiadas.

## Resultados.

Por años el método histológico tradicional que se utilizó para identificar las espiroquetas fueron las coloraciones de plata, a pesar de las dificultades técnica que existen con relación al artefacto de fondo que frecuentemente se observan en las coloraciones de plata, las cuales en ocasiones enmascaran la visualización de los microorganismos estudiados.

Con H&E el chanco primario de la sífilis se evidencia en la forma de una pápula



indurada que tiene diferentes localizaciones como el pene, la vulva, o el cérvix. En estas lesiones el infiltrado es muy polimórfico, incluyendo polimorfos, células plasmáticas, linfocitos, macrófagos. Hay presente pequeños vasos sanguíneos con la pared de los vasos sanguíneos engrosados.

Figura 3. Sífilis primaria, H&E. Se observa infiltrado polimórfico y vasos sanguíneos con la

pared de los vasos engrosados.

Múltiple recomendaciones y modificaciones se han realizado para mejorar la sensibilidad de las coloraciones de tinción de plata, a las dos más comunes técnicas utilizadas la coloración de Steiner

Y el Warthin-Starry. Las recomendaciones más útiles para tener en cuenta para reducir el marcaje de fondo con las técnicas antes mencionadas son:

Comparamos los resultados de las 12 biopsias estudiadas con las técnicas de plata, e Inmunohistoquímica con análisis individual a ciego, de las láminas histológicas e inmunohistoquímica estudiadas por los realizadores de este estudio.

En las coloraciones de plata la sensibilidad fue de un 47%.

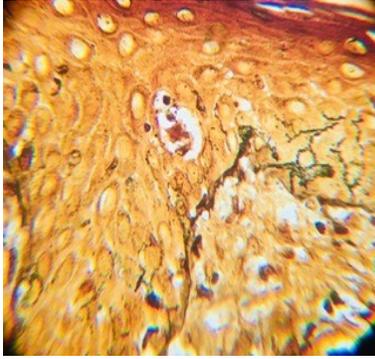


Figura.6 40X Espiroquetas tenidas con Warthin-Starry para la demostración de Espiroquetas, la sensibilidad se expresó en un 47 % en las biopsias estudiadas.

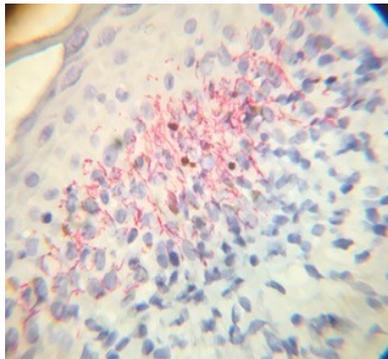


Figura.7 40X Espiroquetas tenidas con la técnica de IHQ para anticuerpos anti-treponema Pallidum.

La especificidad en la histoquímica mejoró notablemente, así como la sobre coloración de fondo la cual se redujo notablemente.

Las espiroquetas de la dermis se visualizaron en todos los casos positivos, siendo más escasos en la epidermis.

### **Conclusiones:**

Las técnicas de coloración de plata requieren para su ejecución reactivos puros y cristalería químicamente limpia (ácido nítrico) para evitar contaminación con material sucio, o impuro. El agua destilada debe usarse para la preparación de las soluciones y últimos enjuagues de la cristalería.

Las temperaturas de las soluciones deben ser bien controladas, temperaturas excesivamente altas del nitrato de plata o la solución reductora es causa común de coloración de fondo.

En nuestra experiencia los métodos de coloración argentafines WS y la IHQ son ambos métodos efectivos en detectar las espiroquetas, aunque es destacar que el método IHQ, aunque puede resultar más caro, es un método, más sensible y específico que las técnicas de plata en la detección del mismo microorganismo en las lesiones de sífilis primaria de la piel, por lo que nuestros resultados colaboran la de otros investigadores.

## Referencias.

1. Report on global sexually transmitted infection surveillance, 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Rosai J. Gross Techniques in surgical pathology. In: Rosai J, editor. Rosai and Ackerman's surgical pathology. 9th ed. Vol. 1. Mosby: St. Louis, Missouri; 2004. pp. 25–91.
3. Perna Monroy C, Cuevas Santos J. "Inmunohistoquímica de Treponema Pallidum en biopsias con diagnóstico de sífilis". ISBN:978-84-692-76778. X Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Ponencia no.2037 2009.
4. Buffet M, Grange PA, Gerhardt P y col. Diagnosis of treponema pallidum in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry. J Invest Dermatol 2007;127: 2345-50.
5. Hoang MP, High WA, Molberg KH. Secondary syphilis: a histologic and immunohistochemical evaluation. J. Cutan Pathol;31 595-9. 2004
6. Martín-Ezquerro G, Fernández-Casado, A, Barco D, *et al.* Treponema pallidum distribution patterns in mucocutaneous lesions of primary and secondary syphilis: an immunohistochemical and ultrastructural study. Human Pathol, 40, pp. 624-630. 2009.
7. Winson G, 'Silver impregnation Techniques to identify Spirochetes and other Bacteria'. The journal of Histotechnology / vol19, No.3 pp 203-8/ September 1996
8. Levaditi C. 'Sur la coloration du Spirochaete pallida Schaudinn dans les coupes. Comptes rendus des seances de la Societe' de biologie et de ses affiliates '59, (2): 326, 1905
9. Dieterle RR, 'Method for demonstration of spirochaete pallida in single microscopic sections. Arch Neurol Psychiat 18: pp 73-80 1927
10. Luna, L.G. HT(ASCP), editor. 1968, Manual of Histologic Staining Methods of the AFIP. 3rd edition, The Blakiston Division, McGraw Hill, New York.
11. Steiner G, Steiner G, New simple silver stain for demonstration of bacteria, spirochetes, and fungi in sections from paraffin embedded tissue blocks. J. Lab Clin. Med 29: 868-871.1944

12. Kerr DA: Improved Warthin-Starry method of staining spirochetes in tissue sections. *Amer. J. Clin Pathol* 8.:63-67 1938
13. Kierman J.A, Silver Staining for Spirochetes in Tissues: Rationale, Difficulties, and Troubleshooting. *Laboratorymedicine* No 9 vol 33 pp 705-708, 2002
14. Faulkner RR, Lillie RD: A buffer modification of the Warthin-Starry silver method for spirochetes in single paraffin sections. *Stain Technol* 20(3):81- 82, 1945
15. Bridges CH, Luna L: Kerr's improved Warthin-Starry technic: Study of the permissible variations AF IP, Washington DC. 6(4):357-367, 1957
16. Vail KF: The Warthin-Starry impregnation technique with the microwave oven. *Histo-Logic* 17:235-236, 1987
17. Churukian CJ: A Warthin-Starry method for spirochetes and bacteria using a microwave oven. *J LaboratorymedicinesHistotechnol* 13:149- 151, 1988
18. Steiner G: Modified silver stain of microorganisms in tissues. *Am J Clin Pathol* 20: 489-490, 1950
19. Churukian CJ, Garvey W: Microwave Steiner method for spirochetes and bacteria. *J Histotechnol* 13:45-47, 1990
20. Martinez M, et al *Histología*, First Edition 1987, Reprinted 1990 SNLC:RA01.039008. Editorial Pueblo y Educacion.
21. Ruiz Sory J. et al Letters to Editor Cross Reactivity of anti-Treponema Immunohistochemistry with no Treponema Spirochetes: A simple call for action. *Arch Pathol Lab Med* vol 140, October 2016