

UNIVERSIDAD DE NAVARRA. FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

## Serología de la sífilis. Hemaglutinación pasiva y hemaglutinación pasiva inversa \*

J. M. Blasco

### RESUMEN

Se estudia en 678 sueros de personas sanas y 16 sueros sífilíticos la efectividad de un plan serológico que utiliza el VDRL como prueba de escrutinio, la fijación de complemento con treponema de Reiter, como prueba confirmatoria y la prueba de anticuerpos fluorescentes, como prueba dilucidatoria. El plan serológico eliminó el 3,6 % de falsos resultados positivos inherentes a la técnica y el 0,1 % de falsos resultados positivos biológicos, y mostró ser eficaz para detectar los casos sífilíticos. También presentó un elevado valor práctico. Sólo fue necesario realizar la fijación de complemento con treponema de Reiter y la prueba de anticuerpos fluorescentes en el 4,2 % y en el 3,8 % de los casos respectivamente.

Se describe una reacción de hemaglutinación pasiva inversa con elevada sensibilidad. Los 16 sueros sífilíticos daban títulos desde 1:320 hasta 1:2.600.000. La reacción mostró ser específica en medir reaginas sífilíticas. Los antígenos treponémicos y cardiolípidicos absorbían de los sueros las reaginas sífilíticas inhibiendo la reacción. No se encontraron reacciones cruzadas con los pacientes afectados de otras enfermedades. Finalmente, se discute si la hemaglutinación pasiva inversa puede ser al mismo tiempo un adecuado sustituto de las pruebas confirmatorias y dilucidatorias.

### INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de la sífilis se efectúa a

\* Este trabajo fue presentado "in extenso" para obtener el grado de doctor de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela. El Tribunal estuvo presidido por el Prof. U. Villanueva, actuando como vocales el Prof. J. M. Montañés, el Prof. B. Regueiro, el Prof. J. Cabezas. Actuó como Ponente el Prof. J. Larralde. La calificación obtenida fue de Sobresaliente *cum laude*.

partir del período primario con la ayuda de las pruebas serológicas. Por esto, las pruebas serológicas de la sífilis tienen tanta importancia en el diagnóstico clínico de la enfermedad. Existen revisiones y clasificaciones de las pruebas existentes 4, 9, 12, 18, 22, 23. Elkerton<sup>5</sup> aconseja llevar a cabo un plan serológico de diagnóstico con una prueba cardiolípídica y dos treponémicas. En España habitualmente

el serodiagnóstico se realiza con pruebas que utilizan antígenos cardiolípidicos.

La idea inicial al comenzar el presente trabajo, fue el estudiar un plan serológico adecuado a las posibilidades y condiciones dentro de nuestro ámbito e intentar alguna prueba que tuviera una alta sensibilidad y careciera de dificultades económicas y técnicas. El primer objeto del trabajo fue realizado con el estudio de 678 sueros mediante pruebas cardiolípidicas y treponémicas, con vistas a comprobar la efectividad de un plan serológico que utilice el VDRL como prueba de escrutinio, la fijación de complemento con treponema de Reiter como prueba confirmatoria y la prueba de anticuerpos fluorescentes como prueba dilucidatoria.

El segundo objetivo de este trabajo fue la búsqueda de una reacción con alta sensibilidad, baja inespecificidad, reducido coste y escasa complejidad técnica, que pudiera ser un sustituto de las pruebas confirmatorias y dilucidatorias al mismo tiempo. Para ello se estudiaron las distintas condiciones técnicas de la hemaglutinación pasiva y de la hemaglutinación pasiva inversa. En esta última, los hematíes tanizados en vez de ser sensibilizados con antígenos sifilíticos (antigenización) lo eran con los anticuerpos (anticorporización), tipo reaginas, existentes en el suero problema. Estábamos interesados en determinar si la falta de sensibilización encontrada en la hemaglutinación pasiva era debida a las especiales características de los antígenos sifilíticos. En cambio, en la "anticorporización" las características de los anticuerpos nos eran conocidas y podíamos estar seguros de su adherencia a los hematíes tanizados.

## MATERIAL Y MÉTODO

### *Sueros.*

El estudio se efectuó con 678 sueros humanos normales, obtenidos de la po-

blación trabajadora sana de Guipúzcoa y 16 sueros controles positivos. Diez de los sueros fueron obtenidos de casos sifilíticos confirmados clínicamente, otros 5 fueron remitidos por el Dr. Krag del Statens Serum Institute de Copenhague y el último fue un suero sifilítico humano, patrón internacional de la O. M. S. Los sueros fueron conservados hasta su uso liofilizados a  $-20^{\circ}$  C con adición de merthiolato a 1/50.000.

### *Antígenos.*

Los antígenos de cardiopilina y de treponema de Reiter para las pruebas serológicas del VDRL, Kline, fijación de complemento y hemaglutinación, fueron obtenidos del Instituto Pasteur de París.

### *Técnicas serológicas.*

La reacción del VDRL se efectuó siguiendo la técnica de Harris<sup>10</sup> y la reacción de Kline de acuerdo con la técnica de Kline y Suessenguth<sup>13</sup>. Las pruebas de fijación de complemento de Wasserman y con treponema de Reiter se efectuaron con la técnica de Kolmer<sup>14</sup>. Para la reacción de hemaglutinación pasiva se efectuó una modificación de la técnica de hemaglutinación pasiva de Lewis<sup>15</sup>. En vez de hematíes humanos grupo O Rh positivos se utilizaron hematíes de oveja. La sensibilización era llevada a cabo a  $37^{\circ}$  C en lugar de a  $4^{\circ}$  C y así mismo, la concentración de ácido tánico fue al 1/30.000 en lugar de a 1/120.000. La hemaglutinación pasiva inversa fue efectuada por la técnica previamente descrita por nosotros<sup>1</sup>.

## RESULTADOS

### *Plan serodiagnóstico en tres etapas.*

El plan serológico propuesto utiliza el VDRL como prueba de escrutinio, la fijación de complemento con treponema de Reiter como prueba confirmatoria y el

FTA como prueba dilucidatoria. Este plan serológico, catalogaba a los 10 sueros controles positivos como sifilíticos al dar el VDRL y la fijación de complemento con treponema de Reiter positivos, sin necesidad de realizar la prueba dilucidatoria de los anticuerpos fluorescentes.

Para ver la eficacia del plan serológico propuesto en relación con los falsos positivos biológicos y técnicos, se realizó sobre los 678 sueros normales las reacciones del VDRL, Kline, fijación de complemento de Wasserman y fijación de complemento con treponema de Reiter. La Tabla I presenta los resultados positivos en estas técnicas y su asociación. Se encontraron 19 sueros (2,8 %) de falsos resultados positivos en las dos reacciones basadas en la floculación. Como puede observarse en dicha tabla, también se apreció un 0,8 % de falsos resultados positivos en las reacciones basadas en la fijación de complemento.

Aplicando el plan serológico de tres etapas solo uno de los sueros hubiera sido catalogado de positivo, al ser el VDRL y la fijación de complemento con treponema de Reiter positivas. Efectuada la reacción de anticuerpos fluorescentes sobre este suero fue también positiva, e igualmente la reacción de Kline. Existía otro suero que el plan serológico con tres etapas consideraba como negativo, pero que era positivo al VDRL, al Kline y a la fijación

de complemento de Wasserman. Al realizar con este suero la prueba de anticuerpos fluorescentes, esta reacción fue negativa. Por lo tanto dicho suero era un falso positivo biológico ligado al antígeno cardiolipídico, ya que las tres pruebas que fueron positivas usaban como antígeno cardiolipina.

Este plan serológico mostró también poseer un elevado valor práctico. Como puede deducirse de la tabla I, el VDRL permitió dar como negativos el 95,7 % de los sueros de individuos sanos. Solo fue necesario recurrir a la fijación de complemento con treponema de Reiter en el 4,2 % de los casos. De haber seguido el plan serológico, hubiera sido necesario realizar la prueba de los anticuerpos fluorescentes en el 3,8 % de los casos. El caso de sífilis incluido en estos sueros hubiera sido catalogado de positivo, por ser VDRL y fijación de complemento con treponema de Reiter positivo. El caso de falso resultado positivo biológico hubiera sido catalogado como negativo por ser la fijación de complemento con treponema de Reiter negativo. La efectividad del plan serológico fue comprobada con la técnica de anticuerpos fluorescentes.

#### *Hemaglutinación pasiva.*

En la búsqueda de una reacción que reuniese las características de las pruebas confirmatorias y dilucidatorias, es decir,

Tabla I.—Distribución de la asociación de pruebas serodiagnósticas positivas

ASOCIACION	n.º	%	ASOCIACION	n.º	%	ASOCIACION	n.º	%
V-K	19	2,8	V-K-W	1	0,1	V	7	1,0
V-W	0	0,0	V-K-R	1	0,1	K	1	0,1
V-R	0	0,0	V-W-R	0	0,0	W	8	1,1
K-W	0	0,0	K-W-R	0	0,0	R	9	1,3
K-R	0	0,0	V-K-W-R	0	0,0			
W-R	6	0,8						

V = VDRL

K = Kline

W = Fijación de Complemento de Wasserman

R = Fijación de Complemento con treponema de Reiter

sencillez técnica, bajo coste y alta sensibilidad, se recurrió a la prueba de hemaglutinación pasiva que ha mostrado dichas características en el diagnóstico de otras enfermedades. La aplicación de la técnica de Lewis y Boyden de hemaglutinación pasiva con antígenos treponémicos y cardiolipídicos no dio resultado por hemolisis de los hematíes con los antígenos treponémicos y por reacciones inespecíficas positivas con antígenos cardiolipídicos. No se consiguió la forma de evitar los falsos resultados positivos inespecíficos que la cardiolipina producía en la hemaglutinación. Se encontró una reaccionabilidad entre la cardiolipina y los hematíes de oveja que no pudo ser suprimida por previa absorción del suero con hematíes de oveja. Sin embargo, la hemolisis producida por los antígenos treponémicos pudo ser evitada mediante diálisis de los mismos o por precipitación con acetona a  $-20^{\circ}$  C. Los títulos obtenidos con antígenos treponémicos dializados o precipitados con acetona, tanto con la técnica de Boyden como con la de Lewis, fueron de 1/1 a 1/4. Se variaron las diferentes condiciones de la reacción. Se realizaron reacciones de hemaglutinación con antígenos diluidos desde 1/1 a 1/1.300. Se efectuó la tanización con ácido tánico a diluciones comprendidas entre 1/5.000 y 1/120.000, ensayando con cada una de esas diluciones la gama de concentraciones de antígeno antes citadas. Se observó también el comportamiento de la reacción con diferentes tiempos de tanización y de sensibilización, así como la influencia de diferentes diluyentes en la prueba y las diluciones de los sueros problema. Los mejores resultados se obtuvieron con áci-

do tánico al 1/30.000 y con antígeno diluido a 1/4, siguiendo los tiempos y detalles técnicos expuestos anteriormente. Los títulos más elevados, obtenidos con el suero sifilítico humano patrón internacional de la O.M.S., fueron de 1/40 (Tabla II). La misma técnica de hemaglutinación pasiva empleada con extractos de *Brucellas* y de *Ascaris* dieron con los inmunosueros homólogos títulos elevados de 1/40.980 y 1/524.270, respectivamente (Tabla II). No pudo encontrarse cuáles eran las razones por las que la reacción de hemaglutinación pasiva daba títulos tan bajos en la sífilis, en contraposición con los títulos tan elevados que daba esta misma reacción en otros sistemas antígeno-anticuerpo.

#### *Hemaglutinación pasiva inversa.*

Tratando de utilizar la alta sensibilidad que posee, generalmente, la reacción de hemaglutinación, así como su bajo coste y alta especificidad, se realizó un estudio con la técnica de hemaglutinación pasiva inversa<sup>1</sup> que presenta además la ventaja de poderse realizar simultáneamente con un antígeno treponémico y un antígeno cardiolipídico.

La Tabla III presenta los resultados cuantitativos de las pruebas de Kahn, fijación de complemento de Wasserman y hemaglutinación pasiva inversa, en los 6 sueros sifilíticos control. Todos ellos eran Kline, VDRL y anticuerpos fluorescentes positivos. Como puede observarse en la tabla, la hemaglutinación pasiva inversa fue la técnica más sensible. En los sueros fuertemente reactivos se encontraron títulos superiores a 1/1.000.000. Otros 10 sueros

Tabla II.—Resultados de la hemaglutinación pasiva

ANTIGENO	SUERO	TITULO
Cardiolipina	Sifilítico O.M.S.	Inespecífico
Extracto Tr. Reiter	Sifilítico O.M.S.	1/40
Extracto Brucella	Brucelosis O.M.S.	1/40.980
Extracto Ascaris	Anti-Ascaris	1/524.280

Tabla III.—Sensibilidad de la hemaglutinación pasiva inversa en los sueros sifilíticos control, comparadas con las pruebas cuantitativas de Kahn y fijación de complemento de Wasserman

SUERO SIFILITICO CONTROL	RECIPROCO DEL TITULO		
	Kahn	Wasserman	HAPI *
101	7	8	655.360
102	8	8	655.360
107	9	11	1.310.720
111	8	12	2.621.440
113	3	4	81.920
Patrón Internacional O.M.S.	5	12	2.621.440

\* HAPI = Hemaglutinación pasiva inversa.

humanos positivos al plan serológico en tres etapas, expuesto anteriormente, dieron títulos de 1/320 a 1/82.000. El título de 1/80 fue tomado como límite de positividad.

La reacción mostró ser específica para medir las reaginas sifilíticas. Un volumen de cardioliipina y 4 volúmenes de antígeno treponémico añadidos a 100 volúmenes de suero control positivo, era suficiente para la absorción de las reaginas e inhibir la reacción de hemaglutinación pasiva inversa. No se encontró reacción cruzada con los sueros controles positivos de brucelosis, ascariidiasis y salmonelosis. Los resultados con otros 20 sueros de pacientes con otras enfermedades fueron también negativos.

La hemaglutinación pasiva inversa puede realizarse al mismo tiempo con antígenos cardioliipídicos y treponémicos utilizando el mismo lote de hematíes sensibilizados con el suero problema (Tabla IV). Con los antígenos treponémicos la reacción era efectiva aunque se obtenían títulos más bajos que cuando la prueba se efectuaba con cardioliipina.

## DISCUSIÓN

Podemos clasificar las abundantes reacciones serológicas existentes hoy día desde el punto de vista práctico de laboratorio en tres grupos:

- Reacciones sencillas de ejecución y de bajo coste que comprende las reacciones de floculación con antígenos de cardioliipina. Las reacciones de este grupo son altamente sensibles pero también altamente inespecíficas.
- Reacciones técnicamente más complejas y de coste moderado. Se incluyen en este grupo las que usan antígenos o fracciones antigénicas de treponemas. Tienen el inconveniente de que su sensibilidad no es elevada, aunque poseen una baja inespecificidad.
- Reacciones altamente sensibles y específicas, pero el elevado coste de las mismas, la complejidad de técnicas y material necesario para ellas, las hacen privativas de centros especializados. De las pruebas existentes hoy día, en este grupo, incluimos la prueba de

Tabla IV.—Título de Hemaglutinación pasiva inversa con antígeno y cardioliipídico

ANTIGENOS	SUEROS SIFILITICOS CONTROL POSITIVOS		
	N.º 1	N.º 2	Patrón O.M.S.
Treponémico	$2 \times 10^{-3}$	$32 \times 10^{-3}$	$32 \times 10^{-3}$
Cardioliipídico	$81 \times 10^{-3}$	$1.300 \times 10^{-3}$	$2.600 \times 10^{-3}$

Nelson y la de anticuerpos fluorescentes.

La complejidad técnica, material y económica de las pruebas del tercer grupo ha motivado el que estas reacciones queden relegadas para casos especiales. Incluso en la práctica, como la diferencia técnica y económica entre las pruebas del primero y segundo grupo también es cuantiosa, es aconsejable efectuar el serodiagnóstico mediante un plan en varias etapas<sup>5</sup>. El plan de diagnóstico serológico en tres etapas, que en este trabajo se propone, es viable en nuestro medio. Consiste en la utilización del VDRL como *prueba de escrutinio*. Los sueros positivos al VDRL son sometidos a la *prueba confirmatoria* de la fijación de complemento con treponema de Reiter. Si se confirma la positividad, el suero se cataloga como positivo. Si la fijación de complemento con el treponema de Reiter es negativa se realiza la prueba de fijación de anticuerpos fluorescentes como *prueba dilucidatoria*.

Este plan serológico mostró ser efectivo, en el presente trabajo, pues eliminó el 2,8 % de los falsos resultados positivos inherentes a las reacciones basadas en la floculación, el 0,8 % de falsos resultados positivos inherentes a las reacciones basadas en las pruebas de fijación de complemento y el 0,1 % de falsos resultados positivos biológicos ligados al antígeno cardiolipídico. El problema de los falsos positivos biológicos ha sido también revisado ampliamente<sup>2, 7, 11, 16, 17, 21</sup>. Nosotros sólo encontramos 0,1 % debidos a que la casuística era de individuos sanos. El porcentaje real es mayor cuando la casuística incluye individuos con infecciones agudas donde los falsos positivos biológicos son bastante elevados, alcanzando en el paludismo la cifra del 100 %<sup>17</sup>.

En el plan serológico, se utiliza como prueba del tercer grupo los anticuerpos fluorescentes por su mayor economía y por la ventaja de no necesitar del mantenimiento de la cepa viva de treponema.

Esta prueba tiene una especificidad y sensibilidad similar a la de Nelson<sup>3, 18, 20, 22</sup>. Incluso Vignali<sup>23</sup> observa que se positiviza en la sífilis primaria antes que la prueba de Nelson.

Todos los sueros sifilíticos controles positivos y un suero sifilítico existente entre los 678 sueros considerados como de individuos sanos, fueron considerados como positivos utilizando el plan serodiagnóstico propuesto.

Este plan serológico mostró también una efectividad práctica. Solamente con la realización del VDRL se consigue dar como negativos el 95,7 % de los sueros de individuos sanos. En nuestra casuística, sólo fue necesario recurrir a la fijación de complemento con treponema de Reiter en el 4,2 % de los casos y a los anticuerpos fluorescentes en el 3,8 %.

En las otras dos etapas del presente trabajo, se intentó buscar una reacción que presentara la alta sensibilidad característica del tercer grupo de reacciones serológicas de la clasificación expuesta anteriormente, junto con las ventajas técnicas y económicas de las reacciones del segundo grupo. Para ello se eligió la reacción de hemaglutinación pasiva que posee una alta sensibilidad y baja inespecificidad para medir anticuerpos. Esta técnica es asequible técnica y económicamente a cualquier tipo de laboratorio.

La hemaglutinación pasiva no pudo realizarse con antígenos cardiolipídicos por producirse una reaccionabilidad de origen desconocido entre la cardiolipina y los hematíes de oveja que daba falsos resultados positivos en los controles. Era de esperar que la cardiolipina no pudiera utilizarse en la hemaglutinación pasiva por no ser de naturaleza protéica. Sin embargo, tampoco se obtuvieron resultados con hemaglutinación directa utilizando hematíes sin tanizar. Con antígenos treponémicos se consiguió llevar a cabo la reacción de hemaglutinación pasiva pero los

títulos que se obtuvieron fueron bajos comparados con los que se obtienen con otros sistemas antígeno-anticuerpo. Análogos resultados obtienen otros autores<sup>6, 8, 19</sup> utilizando la hemaglutinación directa y pasiva. Esto podría ser debido a que la absorción sobre los hematíes de los antígenos del treponema, sobre los cuales reacciona la reagina, fuera deficitaria. Esto explicaría la necesidad de tener que utilizar fuertes concentraciones de antígeno (al 1/4) para obtener resultados apreciables. La hemaglutinación pasiva, al no poseer una sensibilidad alta, no reúne las condiciones precisas para sustituir a ninguna de las pruebas del segundo grupo de la clasificación anteriormente citada.

La última etapa del trabajo fue la puesta en marcha de la reacción de hemaglutinación pasiva inversa. Vistos los malos resultados conseguidos para la absorción de los antígenos sífilíticos, se acudió a una prueba que fijara las reaginas sífilíticas, de conocida naturaleza protéica, sobre los hematíes tanizados. La hemaglutinación pasiva inversa mostró ser específica en detectar reaginas sífilíticas tanto con antígenos treponémicos como cardiolípidicos. Esta especificidad se pudo comprobar por los resultados obtenidos cuando los sue-

ros de los pacientes sífilíticos eran absorbidos con antígenos treponémicos y cardiolípidicos. Además, esta reacción tiene la ventaja de poderse utilizar con ambos antígenos, utilizando el mismo lote de hematíes sensibilizados con el suero problema. La mayor ventaja de la hemaglutinación pasiva inversa sobre el resto de las reacciones es la gran sensibilidad que presenta. Los sueros fuertemente reactivos dieron títulos superiores al 1/1.000.000 con antígenos cardiolípidicos y superiores al 1/10.000 con antígenos treponémicos. Esta diferencia en los títulos puede ser atribuida al mayor grado de pureza y concentración del antígeno cardiolípidico.

La elevada sensibilidad de la hemaglutinación pasiva inversa junto con el bajo coste y la escasez de medios requeridos para su realización, hacen posible que sea un adecuado sustituto de las reacciones del segundo y tercer grupo de la clasificación práctica de laboratorio anteriormente expuesta. De esta forma, el plan serodiagnóstico de la sífilis podría ser reducido a dos etapas: una prueba de escrutinio con VDRL y una prueba dilucidatoria con la hemaglutinación pasiva inversa, utilizando antígeno treponémico.

#### SUMMARY

### **Syphilis serology. Passive hemagglutination and passive inverse hemagglutination**

The efficiency of a serological plan was studied in 678 healthy serums and 16 syphilitic serums; using VDRL as a scrutiny test, complement fixation with Reiter's treponema as a confirmatory test and fluorescent antibodies as a definite test. This serological test series eliminated 3.6 % of the false positive results and was efficient in detecting the syphilitic cases proving to be of great practical value. It was necessary to carry out the complement fixation with Reiter's treponema and fluorescent antibodies in only 4.2 % and 3.8 % respectively. An inverse passive hemagglutination with high

sensitivity is described. The 16 syphilitic serums gave with this test, titers varying from 1:320 to 1:2.600.000 proving that the reaction was specific in measuring the syphilitic reagins. The treponemal and cardiolipin antigens adsorbed the syphilitic reagins from the serums inhibiting the reaction.

No cross reaction was found with serums from patients with other diseases. There is a discussion as to the possibility that the inverse passive hemagglutination could be an adequate substitute for the confirmatory and definite tests.

## BIBLIOGRAFÍA

1. BLASCO ZUÁSTI, J. M. y A. CHORDI. *J. Lab. Clin. Med.*, en prensa.
2. CARPENTER, CH. M., R. A. BOAK, R. A. LECLAIR y J. NICKERSON. *Am. J. Clin. Pathol.*, 43: 146; 1965.
3. DELACRÉTAZ, J. y E. FRENK. *Soc. Suis. Ven. Dermatol.*, 122: 206; 1961.
4. DICKMAN, A. *Publ. Hlth. Reports*, 76: 9; 1961.
5. ELKERTON, L. E. *Can. Med. Ass. J.*, 86: 459; 1962.
6. ESCOBAR, J. J. *Laboratorio*, 17: 115; 1954.
7. FIURAMA, N. J. *New England J. Med.*, 268: 402; 1963.
8. GALLEGO, J. *Rev. San. Hig. Publ.*, 31: 1; 1957.
9. GILLESPIE, E. J. y B. C. BROWA. *Med. Clin. North Am.*, 48: 731; 1964.
10. HARRIS, A., A. A. ROSENBERG y E. R. DEL VECHIO. *J. Ven. Dis. Infor.*, 29: 72; 1948.
11. JULIAN, A., J. PORTNOY y H. N. BOSSAH. *Brit. J. Ven. Dis.*, 39: 30; 1963.
12. KENT, J. F., S. V. COVERT, H. W. REILLY, W. H. KINCH y W. B. LAWSON. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 109: 584; 1962.
13. KLINE, B. S. y H. SUESSENGUTH. *Am. J. Clin. Pathol.*, 30: 473; 1958.
14. KOLMER, J. A. y E. R. LYNCH. *J. Ven. Dis. Inform.*, 29: 166; 1948.
15. LEWIS, W. P. y J. S. KESSEL. *Arch. Ophthalmol.*, 66: 471; 1961.
16. MC. GEHEE, A. J. *A. M. A.*, 182: 513; 1962.
17. MOORE, J. E. y CH. MOHR. *J. A. M. A.*, 150: 467; 1952.
18. NIEL, G. y A. FRIBOURH-BLANC. *Bull. Org. Mond. Santé.*, 29: 429; 1963.
19. REY, L. *Laboratorio*, 30: 201; 1960.
20. ROOFS YOBS, A., L. BROWN y E. F. HUNTER. *Am. Med. Ass.*, 77: 220; 1964.
21. STOKES, J. H., G. W. JAMES. *Am. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 33: 114; 1949.
22. TUCKER, C. B., G. M. CAMERON, R. L. BUCHANAN, A. DILLON y J. H. GRAYSON. *Publ. Hlth. Serv.*, 77: 1089; 1962.
23. VIGNALLI, C. *Gior. Ital. Dermat.*, Fasc. I; 1962.