

RECIENTES PROGRESOS EN LOS METODOS DE LABORATORIO DE ENFERMEDADES VENEREAS

DR. AD HARRIS

Director del Laboratorio de Investigaciones sobre Enfermedades Venéreas, División de Enfermedades Venéreas, Centro de Enfermedades Transmisibles, Servicio de Salud Pública de Estados Unidos, Chamblee, Georgia

Recientemente se han logrado en Estados Unidos varios progresos en materia de métodos de laboratorio de enfermedades venéreas. Los más importantes son el retorno al empleo de las pruebas treponémicas y de "selección", de la sífilis, y la aplicación de la prueba de anticuerpos fluorescentes. Aunque en años recientes se han investigado y utilizado varias pruebas treponémicas, entre ellas las de inmovilización del *Treponema pallidum* (TPI), adherencia inmune del *Treponema pallidum* (TPIA), aglutinación del *Treponema pallidum* (TPA), fijación del complemento del *Treponema pallidum* (TPCF), anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA) y pruebas que utilizan antígenos de proteína Reiter, sólo las pruebas TPI, FTA y la de Kolmer con antígeno de proteína Reiter tienen buena acogida en la actualidad como pruebas de sífilis en los mayores laboratorios del país. Entre las pruebas selectivas serológicas de sífilis, la prueba rápida de reagina plasmática (RPR), la de reagina sérica sin calentar (USR) y la de plasma-crito (PCT) han encontrado aplicación en otros distintos campos. Las pruebas de anticuerpos fluorescentes se han aplicado también a la identificación del gonococo en las preparaciones microscópicas. Examinaremos brevemente las técnicas de estos diversos procedimientos y nos referiremos a su evaluación y a su empleo actual.

La prueba de inmovilización del *Treponema pallidum* (TPI) consiste en una prueba de fijación del complemento cuyo resultado se lee en función del número de treponemas inmovilizados, en vez de la cantidad de eritrocitos hemolizados. Simplificando mucho, puede decirse que el resultado de la prueba de TPI es positivo o reactivo cuando el suero del paciente inmoviliza a los treponemas en presencia de complemento de cobayo, y no

logra inmovilizarlos en presencia de suero de cobayo del que se ha eliminado la actividad de complemento.

Se demostró por estudios de absorción que el anticuerpo descubierto por la prueba de TPI, era distinto del descubierto mediante la prueba de fijación del complemento y mediante la de floculación, o ambas, que utilizan antígenos no treponémicos. Cualquiera de los dos tipos de anticuerpos, o ambos, pueden estar presentes en el suero del paciente; por lo tanto, el descubrimiento de un tipo de anticuerpo no implica que también esté presente el otro tipo. En sífilis, se demostró que el anticuerpo de TPI alcanza niveles perceptibles mucho más lentamente que los anticuerpos puestos de manifiesto mediante pruebas no treponémicas. Los anticuerpos de TPI descubribles, una vez establecidos, tienden a permanecer durante largos períodos después de tratamiento adecuado y de curación aparente de la sífilis. Este comportamiento del anticuerpo de TPI, es decir, el hecho de que se cree más lentamente durante las primeras fases de la infección, y, en segundo lugar, de que a veces persista durante largos períodos después que otros tipos de pruebas han vuelto a la negatividad una vez curada la sífilis, originan áreas de discrepancia serológica en el sífilítico conocido. Pronto se observó, también, que falsas reacciones positivas transitorias en pruebas no treponémicas de sífilis, producidas por neumonía viral y algunas otras infecciones, podían descubrirse mediante la prueba TPI que, durante estos períodos, fue no reactiva o negativa. Un resultado reactivo o positivo de la prueba TPI se interpreta normalmente en el sentido de que el paciente tiene, o tuvo, sífilis, cuando quedan excluidas las demás treponematoses.

La ejecución de la prueba TPI requiere

ciertas instalaciones y medios adecuados para albergar conejos en número suficiente para la constante y rápida transmisión del *Treponema pallidum*. El *Treponema pallidum* virulento no puede cultivarse en el tubo de ensayo y se propaga solamente por pasajes en testículos de conejo. Este y otros elementos necesarios para la prueba TPI, hacen de ella un procedimiento costoso que sólo puede utilizarse en laboratorios seleccionados. El costo de esta prueba se estima entre \$5,00 y \$20,00. En Estados Unidos, la prueba TPI sólo se hace en un par de laboratorios estatales y universitarios, en un laboratorio comercial y en el Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas del Servicio de Salud Pública de Estados Unidos. Este último ofrece un servicio nacional de pruebas TPI, en condiciones limitadas a través de los Departamentos Estatales y Territoriales de Sanidad. Su elevado costo y poca accesibilidad, salvo con criterios restrictivos, no permiten su empleo como método serológico principal, excepto en los estudios de investigación.

La prueba de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA) tiene por objeto descubrir anticuerpos treponémicos mediante el empleo de antisueros marcados con fluoresceína. En pocas palabras: la técnica de esta prueba consiste en obtener *Treponema pallidum* como para la prueba TPI, y colocarlo en un portaobjetos para su exposición, en primer lugar, al suero del paciente, y en segundo lugar, a una antiseroglobulina humana marcada con fluoresceína. Si el suero del paciente contiene anticuerpos treponémicos, éstos se adherirán a la superficie de los treponemas y entonces la antiseroglobulina humana se adherirá a la segunda capa en estos puntos. Estas adherencias se pueden ver mediante el examen del portaobjetos en un microscopio de luz ultravioleta. La fluorescencia del treponema indica que el suero del paciente contiene anticuerpos treponémicos. Los estudios de la absorción y las pruebas comparadas indican que el anticuerpo descubierto mediante la prueba FTA es el mismo que el de la prueba TPI.

El equipo y los reactivos para la prueba FTA requieren gastos iniciales por un valor aproximado de \$1.500,00 y una destreza especial en el empleo del microscopio de luz ultravioleta. Por estas razones, sólo unos cuantos laboratorios estatales han utilizado esta prueba. Sin embargo, es probable que este método de laboratorio se utilice cada vez más, puesto que se están perfeccionando técnicas de anticuerpos marcados con fluoresceína para la rápida identificación de microorganismos.

El treponema Reiter es un microorganismo que al principio se creyó que era el propio *Treponema pallidum*. Este treponema, que no es patógeno y se desarrolla bien en un tubo de ensayo, lleva el nombre del médico que lo aisló. Se ha utilizado como antígeno en varias pruebas para la sífilis. Más recientemente, unas publicaciones de la Universidad de Palermo, Italia, dan cuenta de la extracción de una fracción de proteína de este treponema por medio de criolisis y la utilización del antígeno resultante en la prueba Kolmer de fijación del complemento, de sífilis. Este antígeno de extracto de proteína ha sido utilizado en varias pruebas de fijación del complemento, de sífilis, con la denominación genérica de prueba de proteína Reiter de fijación del complemento o RPCF. Concretamente, la prueba Kolmer (normalmente la técnica de un quinto de volumen) que utiliza este antígeno de proteína Reiter, se conoce con el nombre de prueba de proteína Kolmer Reiter o KRP. Las pruebas aportadas por los experimentos indican que el antígeno proteico del treponema Reiter está, probablemente, muy relacionado antigénicamente con una parte del *Treponema pallidum*.

Teniendo en cuenta que el antígeno de proteína Reiter puede prepararse o adquirirse a un costo relativamente bajo, y dado que las técnicas de fijación del complemento se van utilizando en muchos laboratorios, no se necesita ninguna preparación extraordinaria para proceder a la ejecución de una prueba KRP u otra prueba similar. En la actualidad, utilizan esta prueba, con carácter

experimental o de manera habitual, más de 25 de los mayores laboratorios de pruebas de Estados Unidos, inclusive laboratorios de departamentos estatales de sanidad.

En 1956, el Servicio de Salud Pública de Estados Unidos llevó a cabo un estudio encaminado a establecer la especificidad y sensibilidad de los diversos procedimientos de prueba dados a conocer desde el estudio anterior de evaluación, en 1941. Este estudio se denominó Estudio SERA (Serology Evaluation and Research Assembly = Evaluación y compilación de investigaciones sobre serología). El informe final de este estudio no se ha distribuido todavía, pero el año pasado se publicó un informe preliminar. Estos datos representan los resultados obtenidos mediante 38 métodos de prueba (inclusive los ya mencionados aquí) en especímenes de sangre obtenidos de aproximadamente 1.300 donantes en diez categorías clínicas. Las Figs. 1 y 2 muestran algunos de los resultados obtenidos en el mencionado estudio.

En la Fig. 1 se clasifican las pruebas de acuerdo con su especificidad y su sensibilidad. Las pruebas TPI se representan por una estrella negra; las demás pruebas de *Treponema pallidum*, por un círculo negro; las pruebas no treponémicas, por un triángulo negro, y las que utilizan antígenos de extracto de treponema Reiter, por un cuadrado negro. Las pruebas que figuran en esta gráfica mostraron una especificidad de 80 a 99 %, y una sensibilidad de 62 a 94 %.

Si alguna de estas pruebas hubiera llegado a una sensibilidad y especificidad de 100 %, se colocaría en la esquina superior izquierda. No habiendo alcanzado este nivel ninguna de las experiencias obtenidas, se encerraron en un cuadrado las pruebas comprendidas en los niveles preferidos de reactividad de una sensibilidad de 75 a 84 % y de una especificidad de 95 a 99 %. Se observará en esta gráfica que las pruebas colocadas en la extrema derecha, que indican elevada sensibilidad, pero baja especificidad, comprenden las pruebas TPCF y TPA y una prueba de treponema Reiter en la que no se utilizó el antígeno de proteína Reiter antes mencionado.

La Fig. 2 es una ampliación del cuadrado presentado en la Fig. 1. En esta área de reactividad preferida figuran dos pruebas TPI, cinco de las pruebas de fijación del complemento que utilizaron antígeno de proteína Reiter, la prueba de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA) y la prueba de reagina sérica no calentada (USR), a la que nos referiremos más adelante. Las pruebas en portaobjetos y tubo, del Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas (VDRL) y otros métodos que utilizan antígeno de cardiolipina, también se hallan comprendidos en esta área.

Tres de las pruebas denominadas de "selección" son la prueba rápida de reagina plasmática o RPR, la prueba de reagina sérica sin calentar o USR, y la prueba de plasmacrito o PCT. Todas ellas constituyen modificaciones más sensibles de las pruebas del Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas. En las tres pruebas se utilizan el antígeno y solución salina empleados en las pruebas del mencionado laboratorio con el fin de preparar una emulsión de antígeno como la que se emplea en la prueba en portaobjetos del mismo laboratorio de investigaciones. Esta emulsión de antígeno se centrifuga y las partículas de antígeno sedimentadas se vuelven a suspender en una solución de cloruro de colina. Esta es la suspensión básica de antígeno empleada en estos tres procedimientos de selección.

La prueba rápida de reagina plasmática o RPR se ejecuta de la manera siguiente: se recoge sangre en tubos que contienen uno de los diversos coagulantes, se colocan tres gotas de plasma sobrenadante en una cavidad de un portaobjetos de vidrio, se agrega una gota de suspensión de antígeno, se hace girar el portaobjetos y luego se lee y registra el grado de aglutinación de las partículas de antígeno en términos de reactividad. En esta prueba, para verter el plasma y la suspensión de antígeno, se utilizan pipetas que no sirven más que para una vez. La eliminación del tiempo para la coagulación de la sangre, del tiempo para calentar el suero y la rapidez que permite el empleo de dichas pipetas para

EVALUACION Y COMPILACION DE INVESTIGACIONES SOBRE SEROLOGIA
(Serology Evaluation and Research Assembly) (SERA)

FIG. 1

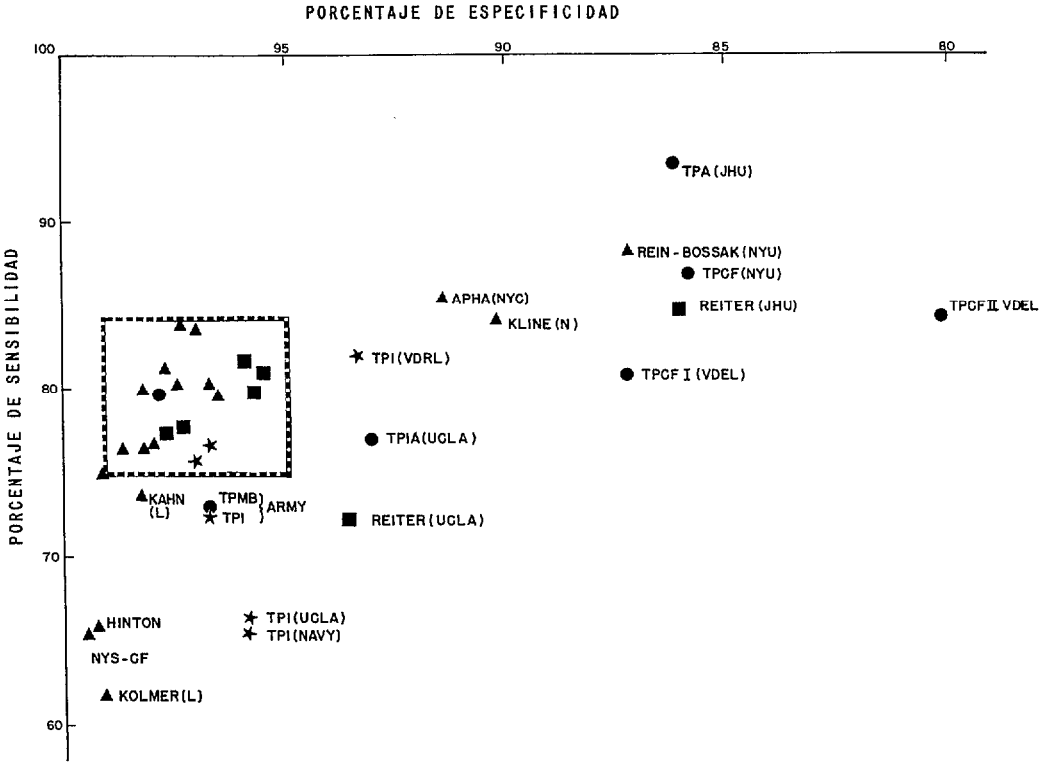
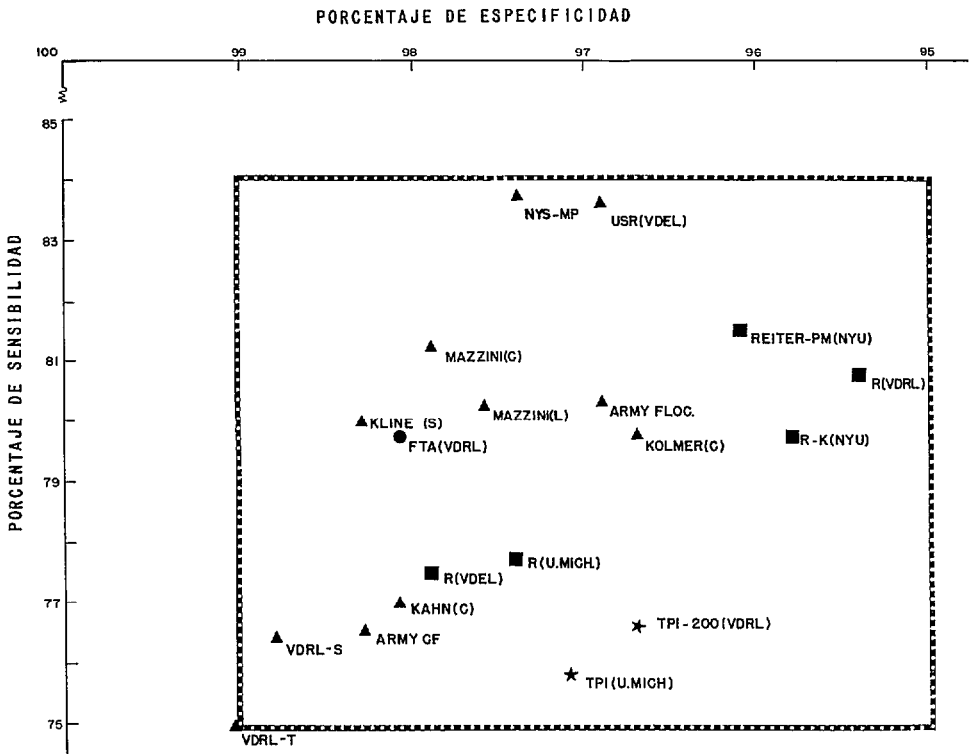


FIG. 2



ABREVIATURA	PRUEBA	LABORATORIO
★ TPI (ARMY)	Inmovilización del <i>Treponema pallidum</i>	Instituto Militar de Investigación "Walter Reed"
● TPMB (ARMY)	Azul de metileno del <i>T. pallidum</i>	Instituto Militar de Investigación "Walter Reed"
★ TPI (NAVY)	Inmovilización del <i>T. pallidum</i>	Escuela Naval de Medicina Centro Nacional Médico-Naval
● TPCF (NYU)	Fijación del complemento del <i>T. pallidum</i>	Escuela de Postgraduados de Medicina, Universidad de N. Y.
● TPA (JHU)	Aglutinación del <i>T. pallidum</i>	Universidad Johns Hopkins
★ TPI (UCLA)	Inmovilización del <i>T. pallidum</i>	Centro Médico de la Universidad de California
● TPIA (UCLA)	Adherencia inmune del <i>T. pallidum</i>	Centro Médico de la Universidad de California
★ TPI (MICH)	Inmovilización del <i>T. pallidum</i>	Universidad de Michigan
● TPCF I (VDEL)	Fijación del complemento del <i>T. pallidum</i> —I	Laboratorio Experimental de Enfermedades Venéreas
● TPCF II (VDEL)	Fijación del complemento del <i>T. pallidum</i> —II	Laboratorio Experimental de Enfermedades Venéreas
★ TPI (VDRL)	Inmovilización del <i>T. pallidum</i>	Laboratorio de Investigación de Enfermedades Venéreas
★ TPI (VDRL)-200	Inmovilización del <i>T. pallidum</i> con 200 unidades de complemento	Laboratorio de Investigación de Enfermedades Venéreas
● FTA (VDRL)	Anticuerpos treponémicos fluorescentes	Laboratorio de Investigación de Enfermedades Venéreas

PRUEBAS TREPONEMICAS REITER

■ REITER-PM (NYU)	Fijación del complemento con proteína Reiter, técnica de TPCF de Portnoy y Magnuson	Escuela de Postgraduados de Medicina de N. Y.
■ R-K (NYU)	Fijación del complemento con proteína Reiter (técnica de fijación del complemento de Kent)	Escuela de Postgraduados de Medicina de N. Y.
■ REITER (JHU)	Fijación del complemento con extracto Reiter	Universidad Johns Hopkins
■ REITER (UCLA)	Fijación del complemento con proteína Reiter	Escuela de Medicina, Universidad de California
■ R (U. MICH)	Fijación del complemento con proteína Reiter	Universidad de Michigan
■ R (VDEL)	Fijación del complemento con proteína Reiter	Laboratorio Experimental de Enfermedades Venéreas
■ R (VDRL)	Prueba de proteína Kolmer Reiter	Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas

PRUEBAS NO TREPONEMICAS

▲ ARMY FLOC	Floculación en lámina con cardioplipina	Instituto Militar de Investigación "Walter Reed"
▲ ARMY CF	Fijación del complemento con cardioplipina	Instituto Militar de Investigación "Walter Reed"
▲ REIN-BOSSAK (NYU)	Rein-Bossak	Escuela de Postgraduados de Medicina de N. Y.
▲ HINTON	Cualitativa estándar de Hinton	Laboratorio Wasserman, Dep. de Salud Pública, Massachusetts
▲ KAHN (C)	Kahn con cardioplipina	Universidad de Michigan
▲ KAHN (L)	Estándar de Kahn con antígeno lípido	Universidad de Michigan
▲ KLINE (N)	Prueba de Kline con cardioplipina y antígeno de lecitina natural	Hospital Mount Sinai, Cleveland
▲ KLINE (S)	Prueba de Kline con cardioplipina óptima, y con antígeno de lecitina sintética	Hospital Mount Sinai, Cleveland
▲ KOLMER (C)	Kolmer simplificada, con antígeno de cardioplipina-lecitina	Universidad Temple
▲ KOLMER (L)	Kolmer simplificada, con antígeno lípido de Kolmer perfeccionado	Universidad Temple
▲ MAZZINI (C)	Mazzini, con cardioplipina	Centro Médico, Universidad de Indiana
▲ MAZZINI (L)	Mazzini, con antígeno lípido	Centro Médico, Universidad de Indiana
▲ APHA (NYC)	Microfloculación	Departamento de Salud Pública, N. Y.
▲ NYS-CF	Fijación del complemento empleada por el Departamento de Salud Pública del Estado de Nueva York	Departamento de Salud Pública, Estado de N. Y.
▲ NYS-MP	Microscópica en lámina, selección por precipitación	Departamento de Salud Pública, Estado de N. Y.
▲ USR (VDEL)	Reagina de suero sin calentar	Laboratorio Experimental de Enfermedades Venéreas
▲ VDRL (T)	VDRL en tubo	Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas
▲ VDRL (S)	VDRL en lámina	Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas

el plasma y la suspensión de antígeno, hacen que esta prueba sea rápida. Se ha informado de que, por este procedimiento, se han sometido a prueba 100 especímenes en menos de 20 minutos. El empleo de artículos que sólo se usan una vez, permite adaptar más fácilmente esta prueba a las condiciones de campo. Actualmente, esta prueba se utiliza en todos los laboratorios de los puestos de inmigración de la frontera mexicana para examinar a los trabajadores agrícolas que entran en el país procedentes de México. En un estudio serológico comparado realizado con especímenes obtenidos de inmigrantes examinados en El Centro, California, se observó que la prueba RPR era más reactiva que la prueba en portaobjetos VDRL, si bien en la zona de reactividad representada por otras pruebas serológicas.

La prueba de reagina sérica sin calentar difiere de la prueba RPR en que, en vez de plasma, se mezcla una determinada cantidad de suero no calentado con una cantidad medida de la misma suspensión de antígeno. El portaobjetos de vidrio, la rotación y la lectura de estas dos pruebas son los mismos. Como se recordará, la pruebaUSR, aunque es más reactiva que la prueba en portaobjetos del laboratorio de investigaciones antes citado, como lo fue la prueba RPR, mostró especificidad y sensibilidad aceptables en el Estudio SERA.

La prueba de plasmacrito o PCT utiliza el plasma sobrenadante de un tubo de plasmacrito heparinizado después de completarse la determinación del volumen de células sanguíneas. La cantidad de plasma en una longitud medida de hematocrito se coloca en un portaobjetos de vidrio, se añade una cantidad medida de la suspensión de antígeno con

cloruro de colina y luego se hace girar el portaobjetos y se lee el resultado casi como en la prueba RPR. Esta prueba puede utilizarse en hospitales que hacen determinaciones de hematocrito de volúmenes de células sanguíneas sin obtener muestras de sangre adicionales.

Estas tres pruebas de "selección" son más reactivas que la prueba en portaobjetos VDRL, de la que se derivaron. Las cifras actualmente disponibles no revelan el grado de la especificidad que se sacrifica para obtener este nivel más elevado de sensibilidad en diferentes grupos de donantes. No obstante, si los resultados de una prueba de "selección" se utilizan sólo como indicador para otras pruebas por procedimientos más específicos, cualquier pérdida de especificidad puede no reflejarse en el aumento de reacciones biológicas positivas falsas.

El Dr. Deacon, del Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas, informó recientemente sobre el empleo de anti-sueros marcados con fluoresceína para la identificación positiva del gonococo en las preparaciones microscópicas. La eficacia de este método ha quedado demostrada mediante el examen de frotis de uretritis del hombre y, al presente, se está estudiando en el caso de la mujer. Este procedimiento evitará la pérdida de tiempo de las técnicas de cultivos, y, probablemente permitirá descubrir microorganismos menos abundantes.

En resumen, puede afirmarse que las pruebas de "selección" serológica y las pruebas treponémicas seleccionadas de sífilis, junto con los procedimientos de anticuerpos fluorescentes, encuentran una aplicación práctica útil como medios de laboratorio para la identificación de infecciones venéreas.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Serology Evaluation and Research Assembly 1956-1957. U. S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Bureau of State Services—Communicable Disease Center. (Public Health Service Publication No. 650). Los pedidos pueden hacerse a: Superintendent of Documents, Government Printing Office, Washington 25, D. C.
- (2) Serologic Tests for Syphilis. 1959 Manual. U. S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Bureau of State Services—Communicable Disease Center. (Public Health Service Publication No. 411, revised.) Los pedidos pueden hacerse a: Superintendent of Documents, Government Printing Office, Washington 25, D. C.

ADDENDUM

Desde la fecha de presentación de este escrito se completó un estudio de los procedimientos de detección rápida de *Neisseria gonorrhoeae* en la mujer por anticuerpos fluorescentes. Está en proceso de publicación un trabajo por el Dr. W. E. Deacon *et al* donde se detallan con todo pormenor

los resultados de dicho estudio. Una comparación del método convencional del cultivo de la *N. gonorrhoeae* con el sistema de detección directa y diferida por el anticuerpo fluorescente, pone de manifiesto la superioridad de esta segunda técnica.