

# Progresos Alcanzados en la Investigación Venereológica\*

M. BRITAIN MOORE, Jr.

*Se ocupa el autor de las dificultades y de los estudios tendientes a superarlas, inherentes al diagnóstico de las enfermedades venéreas en general, y dedica especial atención a los que atañen a la blenorragia asintomática de la mujer muy difundida en Estados Unidos y muy difícil de controlar, en gran medida porque se carece de una técnica de diagnóstico certera.*

No se conoce la verdadera incidencia de la blenorragia en Estados Unidos, pero es probable que el número de casos anuales oscile entre un millón y medio y dos millones. Entre los adolescentes y adultos jóvenes de este país, la blenorragia es la más común de las enfermedades transmisibles de notificación obligatoria. A pesar del recrudecimiento actual de la sífilis temprana en Estados Unidos, el número de pacientes de blenorragia atendidos en los consultorios de enfermedades venéreas todavía es diez veces mayor por lo menos que el de los casos de todas las demás enfermedades de esa naturaleza. Uno de los problemas más graves en lo que respecta al control de la blenorragia ha sido la falta de un procedimiento de diagnóstico sensible para identificar los casos femeninos asintomáticos. El estudio del tratamiento de la mujer se ha visto obstruido también por la imposibilidad de confirmar bacteriológicamente la curación después del tratamiento, ya que, en muchos casos, el cultivo del agente da resultado negativo, no obstante estar aún la paciente en condiciones de in-

fectar a su pareja sexual. Con objeto de remediar esta falta de conocimiento relativo al diagnóstico de la paciente asintomática, se han llevado a cabo numerosos trabajos encaminados a mejorar los métodos de diagnóstico de estos casos en el laboratorio.

Las técnicas de anticuerpo fluorescente (FA), descritas por Deacon y sus colaboradores, en 1960, han sido aplicadas ampliamente en estudios clínicos hechos en colaboración con otros laboratorios en todo el país. El diagnóstico de la paciente asintomática puede mejorarse hasta un 100 % en comparación con los métodos en uso en la mayor parte de los consultorios de enfermedades venéreas de las grandes ciudades. Deacon y colaboradores demostraron la existencia de un antígeno gonocócico específico, de tipo K, y prepararon un conjugado de isotiocianato de fluoresceína con fracciones de globulina de suero gonocócico inmune de antígeno K para poner de manifiesto la presencia de gonococos por medio de la microscopía ultravioleta. Por este método pueden verse con facilidad los gonococos en

Jefe de la Sección de Investigaciones Operacionales de la División de Enfermedades Venéreas, Centro de Enfermedades Transmisibles, Servicio de Salud Pública, Secretaría de Salud, Educación y Bienestar, Estados Unidos.

\* Trabajo presentado en la XXII Reunión Anual de la Asociación Fronteriza Mexicana-Estadounidense de Salubridad, celebrada en Monterrey, Nuevo León, México, del 2 al 5 de marzo de 1964.

el curso de pocos minutos en frotis de exudados de la uretra masculina, y de la uretra, del cuello uterino y de la vagina de la mujer.

En la mujer, cuando los frotis directos inmediatos son negativos, los frotis directos preparados con medios enriquecidos simples, después de 16 a 20 horas de incubación, permiten descubrir la infección con tanta o aún mayor exactitud que la que se obtiene por métodos de cultivo minuciosos, que requieren varios días y hasta semanas. Muchos laboratorios de diagnóstico clínico cuentan hoy con el equipo necesario para aplicar los medios de diagnóstico FA-GC. Mas, si bien representa un notable adelanto, la nueva técnica está lejos de poseer el 100 % de sensibilidad para identificar los casos asintomáticos femeninos.

La investigación sobre el diagnóstico de la blenorragia que se está llevando a cabo en el Laboratorio de Investigación de las Enfermedades Venéreas tiene por objeto, a) mejorar la técnica FA mediante coloración de contraste, b) evaluar un medio selectivo para cultivar *Neisseria gonorrhoeae*, c) hacer ensayos para obtener un medio que permita conservar el microorganismo para su transporte, y d) lograr adelantos nuevos en materia de serodiagnóstico.

El medio de cultivo obtenido recientemente por Thayer y Martin tiene propiedades selectivas que permiten el cultivo de los gonococos y meningococos, a la vez que inhiben por completo el desarrollo de especies de *Neisseria* saprofitas no patógenas y de *Mina polymorpha var. oxidans*. Además, se evita casi totalmente la excesiva proliferación del gonococo debido a la flora bacteriana que se encuentra en especímenes tomados del cuello uterino, de la vagina y aun del recto. Las propiedades selectivas del medio se deben a dos antibióticos: la ristoceína y la polimixina B. Actualmente se está tratando de emplear el medio con un procedimiento retardado de FA y también como medio de conservar el microorganismo para su transporte.

En el campo del serodiagnóstico hay

mucho que decir en pro de la obtención de un procedimiento serológico que permita identificar a la paciente asintomática y al varón homosexual asintomático que padezca de proctitis blenorragica, en especial, si el grado de reactividad o título pudiera asociarse con la actividad de la enfermedad y con la necesidad de tratamiento. Nuestro laboratorio está ensayando actualmente una reacción de precipitina, y los primeros resultados obtenidos por este procedimiento son muy prometedores. Nuestra reciente labor relativa al serodiagnóstico de la blenorragia ha permitido una reevaluación de los antiguos procedimientos de fijación del complemento en el caso de la blenorragia. La sensibilidad y la especificidad del muy generalizado procedimiento de fijación del complemento han demostrado ser mucho menos que satisfactorias. Como resultado de esta investigación, ya no se ofrece a los laboratorios de los departamentos estatales de sanidad la prueba de sangre para descubrir la blenorragia como servicio del Laboratorio de Investigaciones sobre Enfermedades Venéreas. No se ofrecerá un servicio de este tipo mientras no se descubra y perfeccione, bien por nosotros o por otros investigadores, una prueba más sensible y específica que permita al clínico obtener información de valor.

Incluso si mañana mismo se erradicase la sífilis, y se contase con una prueba serológica segura para identificar los casos asintomáticos que necesitasen tratamiento, y fuese posible aplicar en la localidad medidas rápidas de control epidemiológico, planes aceptados de tratamiento antibiótico y pruebas selectivas de sangre, todavía sería dudoso que la morbilidad blenorragica descendiese en grado sensible en estos momentos. Una razón clara de ello se presentó en un reciente estudio clínico llevado a cabo en colaboración con otros laboratorios; se trataba de evaluar diez planes de tratamiento antibiótico de pacientes de blenorragia. Entre ellos había planes de tratamiento máximo recomendados en casos de

blenorragia sin complicaciones en la mujer. Entre más de 150 pacientes en cada plan, mantenidas bajo observación por dos semanas, los fracasos variaron entre el 20 y el 45%. Es preciso admitir que las dos semanas de observación en la mujer tal vez no basten para corroborar la curación, puesto que es bien sabido que el período menstrual, la intensa excitación sexual y otros factores pueden contribuir a que la mujer vuelva a ser, al menos de un modo intermitente, fuente de infección. Así, pues, aun pudiendo someter a tratamiento a todos los contactos de uretritis masculina dentro de un plazo de 48 a 72 horas, como lo enseñan las medidas rápidas de control epidemiológico, no se controlaría la enfermedad porque no habríamos eliminado un reservorio de infección: la paciente asintomática.

Para conocer más a fondo este terreno, se ha emprendido un estudio basado en el tratamiento de una población femenina cerrada, donde el contacto heterosexual—y, por consiguiente, la reinfección blenorragica—es imposible. Componían esta población unas 650 hospitalizadas, examinadas una o más veces para cerciorarse de si había entre ellas casos de blenorragia. Se están evaluando dos planes de tratamiento de las pacientes que eran blenorragicas y sus resultados se han comparado con los de un grupo a cuyos miembros se administró placebo. Después del tratamiento, todas las pacientes son examinadas regularmente por un período mínimo de tres meses, para cerciorarse de si ha habido recaídas. Se espera obtener de este estudio, en un plazo de cuatro a cinco meses, resultados de provecho para el tratamiento de casos ocurridos en condiciones normales. Se confía en especial poder facilitar un tratamiento que pueda completarse en una sola sesión clínica.

En años recientes ha disminuido la sensibilidad *in vitro* de *Neisseria gonorrhoeae* a la penicilina. Todavía es clínicamente posible alcanzar niveles suficientes de penicilina en la sangre para la terapia en gran escala, pero

nadie sabe por cuánto tiempo más será esto posible. Según estudios de observación hechos en nuestro laboratorio durante los últimos ocho años, el gonococo menos susceptible aislado en Estados Unidos requiere una concentración inhibitoria mínima *in vitro* de 1,2 unidades de penicilina por milímetro. Los datos obtenidos nos inclinan a creer que la resistencia de este microorganismo a la penicilina se debe en parte al empleo de la penicilina benzatina.

Respecto al diagnóstico de la sífilis, se ha hallado y evaluado en este laboratorio una nueva prueba de anticuerpo fluorescente del treponema (FTA), llamada la técnica de absorción-FTA. Acaba de iniciarse su evaluación en varios laboratorios estatales y universitarios. En 1957, Deacon y colaboradores describieron por primera vez la prueba de anticuerpo fluorescente del treponema empleando una dilución a 1:5 de suero de prueba en solución salina. Esta prueba figura en el Estudio de Sueros de 1956-1957, y dio muestras de poseer un alto grado de sensibilidad y especificidad. En 1958 se pudo disponer del isotiocianato de fluoresceína para la preparación del conjugado que se usa en esta prueba, y esto aumentó extraordinariamente la sensibilidad de aquella. Junto con este aumento de sensibilidad, se pudo ver que una cuarta parte de la población en general acusa reacciones no específicas de título hasta de 1:100. Para restablecer la especificidad de la prueba FTA empleando el nuevo conjugado, fue necesario antes de proceder a la prueba hacer una dilución de suero a 1:200. Esta modificación de la FTA, llamada FTA-200, ha sido objeto de minuciosa evaluación, y es específica en alto grado, si bien acusa graves deficiencias por lo que a sensibilidad atañe.

Más tarde, el Dr. Deacon pudo demostrar que las reacciones no específicas a la dilución del suero a 1:5 se debían, en realidad, a anticuerpos treponematosos no relacionados con el virulento *Treponema pallidum*. Estudios por él dirigidos hicieron ver que el *Treponema microdentium*, el *T. zuelzeri*—

treponema éste que prolifera libremente en el lodo—, el treponema de Reiter, las espiroquetas saprofiticas *Borrelia*, y el *T. pallidum* virulento tienen antígenos comunes. Al absorber sueros que produzcan reacciones no específicas, ya sea con treponemas de Reiter de cuerpo completo o con una fracción proteínica del microorganismo de Reiter que contenga el antígeno común, podría suprimirse esta reactividad no específica. En la actual técnica de absorción-FTA se emplea una fracción proteínica del treponema de Reiter obtenida por desintegración sónica de este microorganismo. En el procedimiento de esta prueba, el suero se diluye al 1:5 con sonicato de Reiter claro, y luego se somete a prueba lo mismo que en el procedimiento original FTA. Como antígeno se emplea en esta prueba una cepa liofilizada virulenta de Nichols, del *T. pallidum*. En una lámina de vidrio se deja secar al aire una suspensión de este microorganismo y luego se fija en acetona. A esto se añade el suero desconocido diluido al 1:5 con sonicato de Reiter. Después de 30 minutos de incubación a 37°C., se lava la lámina y se añade de nuevo globulina antihumana marcada con isotiocianato de fluoresceína y se deja nuevamente en incubación por 30 minutos a 37°C. Si el suero desconocido contuviera anticuerpos del agente causante de la sífilis, de la frambesia o pinta, tales anticuerpos se fijan por sí mismos a los *Treponema pallida* en la lámina de vidrio. La adición subsiguiente de la globulina antihumana marcada con fluoresceína, da por resultado una coloración fluorescente de los microorganismos con anticuerpo ligado. Mediante este nuevo procedimiento de prueba se incrementa la sensibilidad del diagnóstico serológico de la sífilis con respecto a cualquiera de las pruebas basadas en antígeno treponematoso o no treponematoso que ahora se recomiendan. Su especificidad es comparable a la de la prueba de inmovilización del *Treponema pallidum* (TPI).

Desde la publicación en 1957 del informe

sobre la prueba con anticuerpo fluorescente del treponema (FTA), muchos investigadores han considerado que para establecer un procedimiento FA que permita identificar el *Treponema pallidum* había simplemente que modificar un poco el principio básico de la prueba FTA. Uno de estos investigadores, Edwards, del Hospital Naval de Estados Unidos, en Great Lakes, Illinois, publicó en 1962 dicho procedimiento para la identificación de treponemas en lesiones de sífilis primaria. Edwards llegó a la conclusión de que en la técnica indirecta FA empleada, los resultados eran comparables a los obtenidos por los métodos de tipo corriente de fondo oscuro, y sugirió también que, como rasgo adicional, las láminas de vidrio podían enviarse por correo a laboratorios distantes para su examen, lo que permitiría hacer el diagnóstico de casos de una región alejada de los servicios de laboratorio. No nos ha sido posible confirmar de manera satisfactoria las conclusiones de Edwards por diversas razones, algunas de ellas relativas a la especificidad, y otras relativas a la imposibilidad de tefir los microorganismos recién obtenidos directamente de materia de la lesión por los métodos de anticuerpo fluorescente. En fecha más reciente hemos venido trabajando en un método FA directo en contraste con el indirecto de Edwards. En este procedimiento, el suero sífilítico de alto título es absorbido con sonicato de Reiter para eliminar cualquier anticuerpo contra el antígeno común al *T. pallidum* virulento y a varias espiroquetas saprofiticas. Se descubrió que las pruebas realizadas en condiciones de laboratorio dan resultados muy diferentes de los que se obtienen en las demás condiciones. Primero, se procuró demostrar la presencia del *Treponema pallidum* a partir de impresiones testiculares de conejo, y luego, de frotis de lesiones humanas en ambos casos la coloración del *T. pallidum* fue muy tenue o nula. En cambio, los *Treponema pallida* extraídos de testículos de conejo y liofilizados adquirieron una coloración brillante con idénticos reactivos. A

partir de estas observaciones se aventuró la hipótesis de que esta peculiar coloración podría deberse a la destrucción por la liofilización de una substancia semicapsular que inhibía la coloración de preparaciones frescas. Después de una larga serie de experimentos tendientes a esclarecer este asunto, se descubrió por fin que se aplicaba una fina cubierta de antisuero marcado con fluoresceína a preparaciones frescas de frotis y se dejaba secar rápidamente, en 30 ó 40 segundos se obtenía una coloración satisfactoria. Por este motivo estamos hoy en condiciones de proponer una nueva técnica FA en campo oscuro para su evaluación.

La técnica FA en campo oscuro es, en detalle, como sigue:

1) El material objeto de examen se recoge en láminas de vidrio limpias con el mismo cuidado y las mismas precauciones que se toman en el procedimiento de campo obscuro corriente, pero luego se deja secar al aire sin cubreobjetos.

2) Después de seco, el frotis se fija inmediatamente en acetona durante 10 minutos. Luego se envía a un laboratorio central del modo más conveniente, o se examina *in situ* en la forma siguiente:

3) Antes de colorar, se corta un círculo de 6 mm. de diámetro en el frotis con un lápiz con punta de diamante, a fin de definir el área que haya de colorarse.

4) Esta área se cubre con la película de antisuero marcado con fluoresceína contenida en un aro de 2 mm. de alambre de calibre 28 y se deja secar sobre el frotis por unos 30 segundos a 37°C.

5) Luego se enjuaga la lámina bajo una corriente de agua destilada durante 5 segundos y por fin se monta y examina como en el caso de prueba FTA.

A continuación de hallan los resultados obtenidos con la nueva técnica FA en campo oscuro en los estudios preliminares hechos en este laboratorio: 1) Los treponemas obtenidos de lesiones de sífilis primaria y que se suponía fueran de *Treponema pallidum* dieron una coloración brillante y bien de-

finida. Esto ocurrió tanto en el caso de los frotis obtenidos localmente y examinados de inmediato como en los recogidos en un lugar distante y enviados por correo aéreo al Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas y examinados varios días después. 2) Las espiroquetas obtenidas de lesiones no sifílicas y que, por consiguiente, no se supone que sean de *Treponema pallidum*, no se colorean y, por esta razón, son diferenciadas fácilmente. Esto permite, no sólo distinguir sin dificultad entre los microorganismos de *Borrelia* que se encuentran en las lesiones anogenitales, sino diferenciar inmediatamente el *Treponema pallidum* del *Treponema microdentium* de las lesiones orales. Este es un aspecto de gran importancia práctica, porque el *Treponema microdentium* sólo puede ser distinguido de *Treponema pallidum* por unos cuantos técnicos muy especializados y ello en el terreno morfológico únicamente.

En conclusión, el nuevo procedimiento AF en campo oscuro parece ofrecer respuesta a varios problemas que se presentan en relación con los métodos corrientes en campo obscuro. El hecho de poder coleccionar especímenes en un sitio distante donde no hay la competencia necesaria en trabajos de campo obscuro y enviarlos a un laboratorio central para su identificación específica, es sólo uno de los muchos beneficios que pueden derivarse de la prueba. Nuestros planes prevén una minuciosa evaluación del nuevo procedimiento FA de campo obscuro, en colaboración con varios otros laboratorios. Se espera poder dar cuenta en breve de los hallazgos favorables de esta evaluación.

## Resumen

A pesar del tratamiento eficaz administrado en los últimos veinticinco años, la blenorragia no ha sido sometida a control y en la actualidad representa, dentro de las enfermedades infecciosas de notificación obligatoria, la dolencia más común en los grupos de población que comprenden a los adoles-

centes y adultos jóvenes de los Estados Unidos de América.

Se describen los actuales estudios inmunofluorescentes y serológicos encaminados al mejoramiento del diagnóstico y la determinación de los resultados del tratamiento en el vector femenino asintomático. Estos estudios son de carácter urgente, en vista de la resistencia que empieza a ofrecer la *Neisseria gonorrhoeae* a la penicilina.

En materia de investigación de la sífilis, se describe una prueba serológica mejorada: la del método de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS). Esta prueba ofrece mayor sensibilidad que cual-

quier prueba serológica recomendada para la sífilis, a la vez que conserva una especificidad comparable a la de la prueba de inmovilización del *Treponema pallidum* (TPI).

Con respecto a las zonas en que no existe personal competente en la técnica del campo oscuro, convendría contar con la posibilidad de envío postal de material extraído de lesiones a un laboratorio central, para la identificación específica del *Treponema pallidum*. Se describe el uso de una técnica de anticuerpos fluorescentes nueva y específica para "mandar por correo" exámenes en campo oscuro.

---

### Progress in Venereology Research (Summary)

Despite effective treatment for the past twenty five years, gonorrhea has not been controlled and today represents the most common reportable infectious disease in the teen age and young adult population groups in the U.S.A.

Present immunofluorescent and serologic studies directed toward improving diagnosis and determining results of therapy in the asymptomatic female carrier are described. These studies are of urgent nature with the emerging resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to penicillin.

In the area of syphilis research an improved

serologic test, the fluorescent treponemal antibody absorption technique (FTA-ABS), is described. This test offers greater sensitivity than any recommended serologic test for syphilis while maintaining specificity comparable to the treponema pallidum immobilization (TPI) test.

For areas where darkfield competence is not available, it would be helpful to be able to mail lesion material to a central laboratory for specific identification of *Treponema pallidum*. Use of a new and specific fluorescent antibody technique for "mail-in" darkfield examinations is described.