

MANUAL DE REACCIONES SEROLOGICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA SIFILIS

#130

1955



OFICINA SANITARIA PANAMERICANA
Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud
Washington, D. C.

**MANUAL DE
REACCIONES SEROLOGICAS
PARA EL
DIAGNOSTICO DE LA SIFILIS**

1955

**Publicaciones Científicas
No. 30**

Abril, 1957

**OFICINA SANITARIA PANAMERICANA
Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud
1501 New Hampshire Ave., N.W.
Washington 6, D. C., E.U.A.**

En la preparación de este Manual en inglés se ha contado con la colaboración de los autores de las distintas técnicas de prueba o reacción, y con la de la Sección Serológica del Laboratorio de Investigación de las Enfermedades Venéreas, de Chamblée, Ga., E.U.A., cuyos director y subdirector son el Dr. Sidney Olansky y el Sr. Ad Harris, respectivamente.

Este Manual reemplaza los suplementos Nos. 9, 11 y 22 de la revista *The Journal of Venereal Disease Information*, y la Gráfica—VD 85.

La Oficina Sanitaria Panamericana ha traducido este Manual al español con la autorización del Servicio de Salud Pública del Departamento de Salubridad, Educación y Asistencia, de los Estados Unidos.

Preámbulo

En la Asamblea de Directores de Laboratorio y Serólogos, que se reunió en Hot Springs, Ark., en octubre de 1938, la Comisión sobre la Necesidad de Seguir la Técnica Convencional en la Ejecución de Reacciones Serológicas Seguras para la Sífilis (Committee on the Need of Adherence to Conventional Technique in the Performance of Reliable Serologic Tests for Syphilis) hizo la siguiente recomendación:

“Uno de los factores que más influyen en que no se sigan las técnicas originales es el hecho de que muchos serólogos y técnicos serólogos no están al corriente de los progresos que se realizan. Es de imprescindible necesidad abandonar los métodos anticuados. Ha sido una causa de dificultades la publicación de nuevas y convenientes modificaciones de técnica, por los autores del método respectivo, en libros y revistas que, en su mayoría, no suelen estar al alcance del serólogo. A fin de vencer estos inconvenientes, esta comisión recomienda la publicación, minuciosamente detallada, de los procedimientos técnicos que deben seguirse para realizar cada una de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la sífilis seguras y ya probadas que se emplean ordinariamente en este país. Se recomienda que se encargue de esta publicación el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, en colaboración con los creadores de los métodos, como suplemento de *The Journal of Venereal Disease Information*.”

Esas recomendaciones han quedado cumplidas con la publicación de los manuales de Pruebas Serológicas para la Sífilis, como el Suplemento 9 (1939), el Suplemento 11 (1940) y el Suplemento 22 (1949) de *The Journal of Venereal Disease Information* y la Gráfica-VD-85 (1944). Con el objeto de continuar esos servicios el Laboratorio de Investigaciones sobre Enfermedades Venéreas del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos ha colaborado con los autores de las pruebas en la reunión de datos para este nuevo manual. En vista de que se ha suspendido la publicación de *The Journal of Venereal Disease Information*, este manual debe considerarse como una publicación del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, el que ha autorizado a la Oficina Sanitaria Panamericana para traducirlo y editarlo en castellano, para información de los laboratoristas y serólogos de la América Latina.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

Indice

	<i>Página</i>
INFORMACIONES GENERALES.....	1
EQUIPO GENERAL.....	7
REACCION DE REFERENCIA DE APHA (Asociación Norteamericana de Salud Pública).....	9
La Reacción Serológica.....	11
REACCIONES DE HINTON.....	13
Reacciones de Hinton con suero.....	14
Reacción Cualitativa Estándar de Hinton con suero.....	14
Reacción Rápida de Hinton con suero.....	16
Reacción Cuantitativa Estándar de Hinton con suero.....	17
Reacciones de Davies-Hinton.....	17
Reacción de Microfloculación de Davies-Hinton con suero.....	17
Reacción de Floculación de Davies-Hinton con líquido céfalorraquídeo.....	19
REACCIONES DE KAHN.....	23
Reacciones de Kahn con suero.....	24
Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con suero.....	24
Reacciones Suplementarias de Kahn con suero.....	29
Reacción Suplementaria N° 1.....	29
Reacción Suplementaria N° 2.....	29
Reacción Cuantitativa Estándar de Kahn con suero.....	31
Reacciones de Kahn con Líquido Céfalorraquídeo.....	33
Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con globulina concentrada de líquido céfalorraquídeo.....	34
Reacción Cuantitativa Estándar de Kahn con líquido céfalorraquídeo.....	35
Preparación de Antígeno Estándar de Kahn.....	37
REACCIONES DE KLINE.....	47
Reacciones de Kline con suero.....	48
Reacción Cualitativa Estándar de Kline con suero.....	49
Reacción Cuantitativa Estándar de Kline con suero.....	50
Reacciones de Kline con Líquido Céfalorraquídeo.....	50
Reacción Cualitativa Estándar de Kline con líquido céfalorraquídeo.....	52
Reacción Cuantitativa Estándar de Kline con líquido céfalorraquídeo.....	53
REACCIONES DE KOLMER.....	55
Reacciones Cualitativas de Kolmer con suero y líquido céfalorraquídeo.....	63
Reacciones Cuantitativas de Kolmer con suero y líquido céfalorraquídeo.....	66

REACCIONES DE MAZZINI.....	75
Reacciones de Mazzini con suero.....	76
Reacción Cualitativa de Mazzini con suero.....	77
Reacción Cuantitativa de Mazzini con suero.....	77
Reacciones de Mazzini con Líquido Céfalorraquídeo.....	78
Reacción Cualitativa de Mazzini con líquido céfalorraquídeo.....	78
Reacción Cuantitativa de Mazzini con líquido céfalorraquídeo.....	79
REACCIONES DE REIN-BOSSAK.....	81
Reacción Cualitativa de Rein-Bossak con suero.....	83
Reacción Cuantitativa de Rein-Bossak con suero.....	84
REACCIONES VDRL.....	85
Reacciones de Floculación VDRL en Lámina, con suero.....	85
Reacción Cualitativa VDRL en Lámina, con suero.....	90
Reacciones Cuantitativas VDRJ en Lámina, con suero.....	91
Reacción A Cuantitativa VDRL en Lámina.....	91
Reacción B Cuantitativa VDRL en Lámina.....	93
Reacciones de Floculación VDRL en Tubo, con suero.....	95
Reacción Cualitativa VDRL en Tubo, con suero.....	96
Reacción Cuantitativa VDRL en Tubo, con suero.....	97
Reacciones VDRL con Líquido Céfalorraquídeo.....	97
Reacción Cualitativa VDRL con líquido céfalorraquídeo.....	98
Reacción Cuantitativa VDRL con líquido céfalorraquídeo.....	99
APENDICE.....	101
Recolección y Preservación de Sangre de Carnero.....	101
Preparación de la Hemolisina (glóbulos rojos de carnero).....	104
Preparación y Preservación del Complemento.....	106
Uso del Mertiolato como Bacteriostático.....	107
Determinación Cuantitativa de la Proteína del Líquido Céfalorraquídeo.....	109

Informaciones Generales

Una técnica de análisis está integrada por equipo, reactivos, volúmenes, períodos de tiempo, temperatura y orden de procedimiento. Cada uno de estos factores puede ser de igual importancia y ninguno de ellos se puede descuidar impunemente. Los técnicos que hacen cambios arbitrarios en los métodos recomendados deben asumir toda la responsabilidad por los resultados del análisis.

Aun cuando las reacciones serológicas para investigar sífilis no son completamente específicas, y algunos sueros y líquidos céfalorraquídeos tienen la capacidad de reaccionar positivamente en una reacción y negativamente en otra, el análisis de los resultados serológicos discordantes, ya sea en términos de diagnóstico o de pronóstico, no debe ser hecho por el técnico. Esas decisiones se hallan sólo dentro de la jurisdicción del médico. Sin embargo, es posible obtener resultados válidos de los análisis serológicos cuando (a) se usan reactivos estandarizados y controles adecuados, (b) cuando se siguen estrictamente las recomendaciones técnicas, y (c) cuando se expresan los resultados en la forma especificada para cada procedimiento.

El técnico deberá ensayar siempre cada nuevo lote de reactivo antes de ponerlo en uso, comparándolo con uno conocido que tenga reactividad aceptable. Se recomienda esta conducta prescindiendo del origen del nuevo reactivo. En los párrafos siguientes se pasará revista a otros factores que es necesario tomar en cuenta en el control de las reacciones serológicas.

Equipo

La temperatura de los baños de María se debe comprobar cada vez que estos se usan. De igual modo, la temperatura del refrigerador debe comprobarse diariamente por medio de un termómetro colocado en la parte ocupada por las gradillas. Además, se tomará la temperatura al abrir el refrigerador por primera vez en la mañana, si se acostumbra mantener en él las reacciones de fijación del complemento (fijación de 16 a 18 hrs.).

La velocidad de los aparatos de agitación y rotación debe ser revisada por el técnico cada vez que se utilicen, y no se permitirá una variación notable en las velocidades prescritas.

Las centrifugas deben estar equipadas con tacómetros a fin de poder vigilar y controlar la velocidad. El interior de las centrifugas se limpiará de vez en cuando para evitar que caigan partículas de polvo en las muestras.

Las pipetas automáticas se comprobarán diariamente en relación con el volumen correcto de rendimiento. Si fuera necesario hacer algún nuevo ajuste, se debe recoger y medir en un cilindro graduado y certificado un volumen de 25 ó 50 entregas de la pipeta.

Cristalería

En los laboratorios serológicos sólo se debe usar cristalería químicamente limpia. Los tubos y pipetas, de los cuales no se han eliminado completamente las soluciones de proteína, adquieren una película de color pardo. Esta película generalmente se puede hacer desaparecer por inmersión en una solución de bicromato con ácido sulfúrico.

Cuando se usan para el lavado soluciones alcalinas o ácidas, se debe enjuagar perfectamente a fin de quitar todo vestigio de las soluciones limpiadoras. Diariamente se investigará la reacción en muestras de la cristalería con papel o soluciones indicadoras, a fin de impedir que se use en el laboratorio cristalería químicamente contaminada.

Los tubos, las láminas o las pipetas que se hayan despórtillado o rayado en forma tal que dificulten la lectura de los resultados deberán ser desechadas y reemplazadas.

Reactivos

Antígenos

1. Todas las reacciones serológicas para la investigación de la sífilis descritas en este manual, con excepción de las reacciones de Kahn, emplean antígenos de cardioplipina-lecitina. La cardioplipina y la lecitina purificada a que nos referimos en este texto son productos que se han aislado y purificado por métodos ya publicados (1) y que satisfacen los estándares de valoración química y serológica establecidos por la Organización Mundial de la Salud.¹ En la mayoría de los casos se ha visto que resulta más práctico y económico comprar antígenos de cardioplipina que producirlos partiendo de sus varios componentes y hacer después la obligada comprobación serológica.

2. Los antígenos deben producir reacciones cualitativas y cuantitativas con suero y líquido céfalo-raquídeo que resulten comparables con las que se obtienen con un antígeno estándar. Antes de poner en uso ordinario cada nuevo lote de antígeno, deberá probarse en comparación con uno conocido que tenga reactividad aceptable. Es necesario realizar esta prueba en paralelo durante más de un día, y las diferencias en reactividad entre los dos antígenos que se analizan no deben ser mayores que las obtenidas con emulsiones duplicadas de antígenos estándar.

Productos Químicos

Los productos químicos, como cloruro de sodio, colesterol, etc., deben ser púrsimos y satisfacer las especificaciones de la técnica del procedimiento. Pueden producirse reacciones falsas cuando se emplean productos químicos de calidad inferior.

¹ Farmacopea Internacional.

Agua Destilada

El agua destilada de mala calidad puede ser debida a que no se limpia, con la frecuencia necesaria, el destilador o el recipiente en que se conserva. La clase de agua corriente y el número de horas por día que trabaja el destilador determinarán la frecuencia de la limpieza. Las determinaciones periódicas de pH y conductividad sirven de fieles indicadores de la pureza del agua destilada. Cuando se va a almacenar, el agua destilada debe colocarse en recipientes de vidrio duro, herméticamente cerrados, para evitar los cambios debidos al paso de iones del vidrio y la absorción de gases presentes en el laboratorio. Es preferible usar agua recientemente destilada.

Soluciones Salinas

El cloruro de sodio para uso en las soluciones salinas se debe desecar en un horno de aire caliente durante 30 minutos a 160°-180°C., a fin de eliminar toda la humedad absorbida. Se evitará una temperatura más alta porque podría causar la descomposición de la sal. El cloruro de sodio puede entonces pesarse y almacenarse en tubos de ensayo, taponados con corcho, para evitar el tener que pesarlo diariamente. Las sales se disuelven en agua destilada y la solución se agitará cuidadosamente para asegurar una mezcla perfecta. Si se almacena, la solución se debe colocar en recipientes de vidrio duro herméticamente cerrados para evitar la contaminación.

Temperatura

La temperatura a la cual se ejecutan afecta en grado diverso el resultado de las reacciones serológicas para la sífilis. Algunas reacciones deben ser hechas al baño de María o en refrigerador, a las temperaturas prescritas. Para uniformidad de los resultados se recomienda realizar otras reacciones a la temperatura ambiente, entre 23° y 29°C. (73° a 85°F.).

Informe de los Resultados de las Reacciones Serológicas

El National Serology Advisory Council, en su informe de 1953 al Cirujano General del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, recomendaba el uso de una nueva terminología para informar los resultados de las reacciones serológicas de sífilis. El nuevo sistema daría uniformidad a la expresión de los resultados y evitaría las implicaciones diagnósticas. De acuerdo con esas recomendaciones, los términos *Reactivo*, *Débilmente Reactivo* y *No Reactivo* substituyen a los términos *Positivo*, *Débilmente Positivo* o *Dudoso* y *Negativo*, al informar el resultado de las reacciones.

Se recomienda, al informar el resultado de las reacciones cuantitativas (2), que el título se exprese en términos de la mayor dilución en la cual la muestra que se analiza produce un resultado Reactivo (positivo) y que el término *dils*, que es una contracción de la palabra "diluciones", se use para

identificar este punto final de la dilución reactiva. Por este medio las reacciones de intensidad idéntica recibirían el mismo informe en términos de *dils*, aun cuando se empleen distintos métodos de análisis.

Control de la Realización de la Prueba

Algunos de los factores que influyen en la realización de la prueba ya han sido descritos. Además, se recomiendan firmemente las comprobaciones inter e intralaboratorio.

Estas incluyen el uso diario de sueros controles de reactividad conocida, lecturas periódicas de comprobación para mantener uniformes los niveles de lectura entre el personal del laboratorio, y comparación de los resultados obtenidos en los sueros de control con aquellos de un laboratorio de referencia.

Se deben incluir controles en cada serie de sueros en estudio. En las reacciones de floculación en lámina, cada preparación de emulsión de antígeno deberá ser examinada primero con esos sueros de control. En otros casos esos sueros se incluirán en la serie de reacciones. Los resultados obtenidos con los controles deben reproducir una pauta establecida de reactividad. En el caso de que esos resultados no sean aceptables, los nuevos análisis se harán solamente cuando se haya establecido de nuevo la reactividad óptima.

El uso diario de controles de suero en todas las reacciones serológicas de sífilis es una práctica del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Venéreas que ha resultado valiosa para descubrir variaciones en los niveles de reactividad que de otro modo podrían haber pasado desapercibidas. El Dr. W. A. Hinton no recomienda, sin embargo, su uso en la reacción de Hinton (3).

Se pueden preparar sueros controles con diversos grados de reactividad de la manera siguiente:

1. a. Se escogen los sueros Reactivos (no Débilmente Reactivos) entre la serie de análisis diarios, colocándolos en recipientes adecuados para conservarlos por congelación.
b. Se obtienen los sueros No Reactivos de la misma manera.
2. Los sueros mezclados se almacenan en un aparato congelador o en el departamento de congelación de un refrigerador.
3. Cuando se vayan a preparar los sueros de control, se descongelarán las mezclas a la temperatura ambiente o en baño de María a 37°C.
4. A continuación se procederá a filtrar las mezclas de suero por un filtro Seitz para eliminar las partículas.
5. El suero de cada mezcla será medido y se agregará 1 mg. de polvo de mertiolato² por cada mililitro de suero.

² Ely Lilly and Co., Indianapolis, Ind.

6. Se prepararán diluciones preliminares de suero Reactivo en suero No Reactivo. Pueden usarse diluciones seriadas de 1 a 2, o se puede escoger un procedimiento semejante al descrito en el cuadro 1.

7. Se practicarán con esas diluciones de suero todas las reacciones regularmente usadas en el laboratorio y se anotarán los resultados.

Cuadro 1. Resultados obtenidos con diluciones de suero preparadas para el uso como controles diarios

Diluciones	Suero Reactivo	Suero No Reactivo	Reacción de Kahn	Reacción en lámina VDRL	Reacción de Kline	Reacción de Mazzini	Reacción de Hinton	Reacción de Kolmer
	(ml.)	(ml.)						
1	1,0	1,0	R4+	R	R4+	R	R	R4+
2	0,8	1,2	R4+	R	R4+	R	R	R4+
3	0,7	1,3	R4+	R	R4+	R	R	R4+
4	0,6	1,4	R3+	R	R4+	R	R	R4+
5	0,5	1,5	R2+	R	R3+	R	R	R4+
6	0,4	1,6	DR1+	R	R2+	R	R	R3+
7	0,3	1,7	DR±	DR	DR1+	R	R	R2+
8	0,2	1,8	NR	DR	DR1+	DR	DR	DR±
9	0,1	1,9	NR	NR	NR	NR	NR	NR
10	0,0	2,0	NR	NR	NR	NR	NR	NR

R = Reactivo. DR = Débilmente Reactivo. NR = No Reactivo

Basándose en los resultados indicados en el cuadro 1, se puede escoger una escala de diluciones adecuadas para las reacciones de Kahn, VDRL en lámina, y Kolmer, de la manera siguiente:

- Control 1—Dilución 2
- Control 2—Dilución 5
- Control 3—Dilución 7
- Control 4—Mezcla No Reactiva

o, si las reacciones que se van a hacer incluyen reacciones VDRL en lámina, de Mazzini y de Hinton, se puede escoger un juego de diluciones de la manera siguiente:

- Control 1—Dilución 2
- Control 2—Dilución 6
- Control 3—Dilución 8
- Control 4—Mezcla No Reactiva

8. Escójase, para suero control, una dilución que sea Reactiva ó 4+ en todos los análisis, y una o más diluciones que muestren reactividad intermedia. Si se emplean varios tipos de reacciones, es posible que se necesiten dos o más diluciones para obtener lecturas exactas en todas ellas.

9. Calcúlese la cantidad de cada dilución de suero que hay que preparar, lo que quedará determinado por la cantidad necesaria para los análisis de cada día, el período de tiempo en el que se van a usar los controles y la clase de almacenaje disponible.

Los sueros de control, debidamente taponados, se pueden conservar por aproximadamente 60 días en un aparato de congelación, 30 días en el departamento de congelación de un refrigerador y de 7 a 10 días en estado líquido en un refrigerador.

10. Prepárense los volúmenes calculados de cada dilución de suero y mézclense perfectamente.

11. Ensáyese de nuevo cada mezcla de suero con todas las reacciones en que se va a usar como control.

12. Mídanse cantidades alícuotas de cada dilución, suficientes para una jornada de trabajo, en tubos debidamente rotulados y firmemente cerrados con corchos cubiertos de parafina. Distribúyanse en orden y sométanse a refrigeración. Después de 24 horas revísense de nuevo los corchos y séllese con sellos plásticos o cinta adhesiva para mayor protección contra la evaporación.

13. Para uso diario, sáquese una muestra de sueros controles del almacenaje, descongélese a la temperatura ambiente, mézclese perfectamente, sométase a centrifugación, decántese el suero y caliéntese durante 30 minutos a 56°C.

14. Los nuevos lotes de sueros controles deben analizarse en comparación con el que está en uso corriente y establecer su pauta de reactividad antes de ponerlos en uso ordinario.

Referencias Bibliográficas

- (1) PANGBORN, M. C.; MALTANER, F.; TOMKINS, V. N.; BEECHER, T.; THOMPSON, W. R.; FLYNN, M. R.: *Cardiolipin Antigens*. Organización Mundial de la Salud: Series de monografías No. 6, 1951.
- (2) HARRIS, A.: *Quantitative serologic tests for syphilis. I. Standard method of reporting*. *J. Ven. Dis. Inform.*, 28: 249-252, noviembre 1947.
- (3) HINTON, W. A.: *Comunicación personal*.

Equipo General

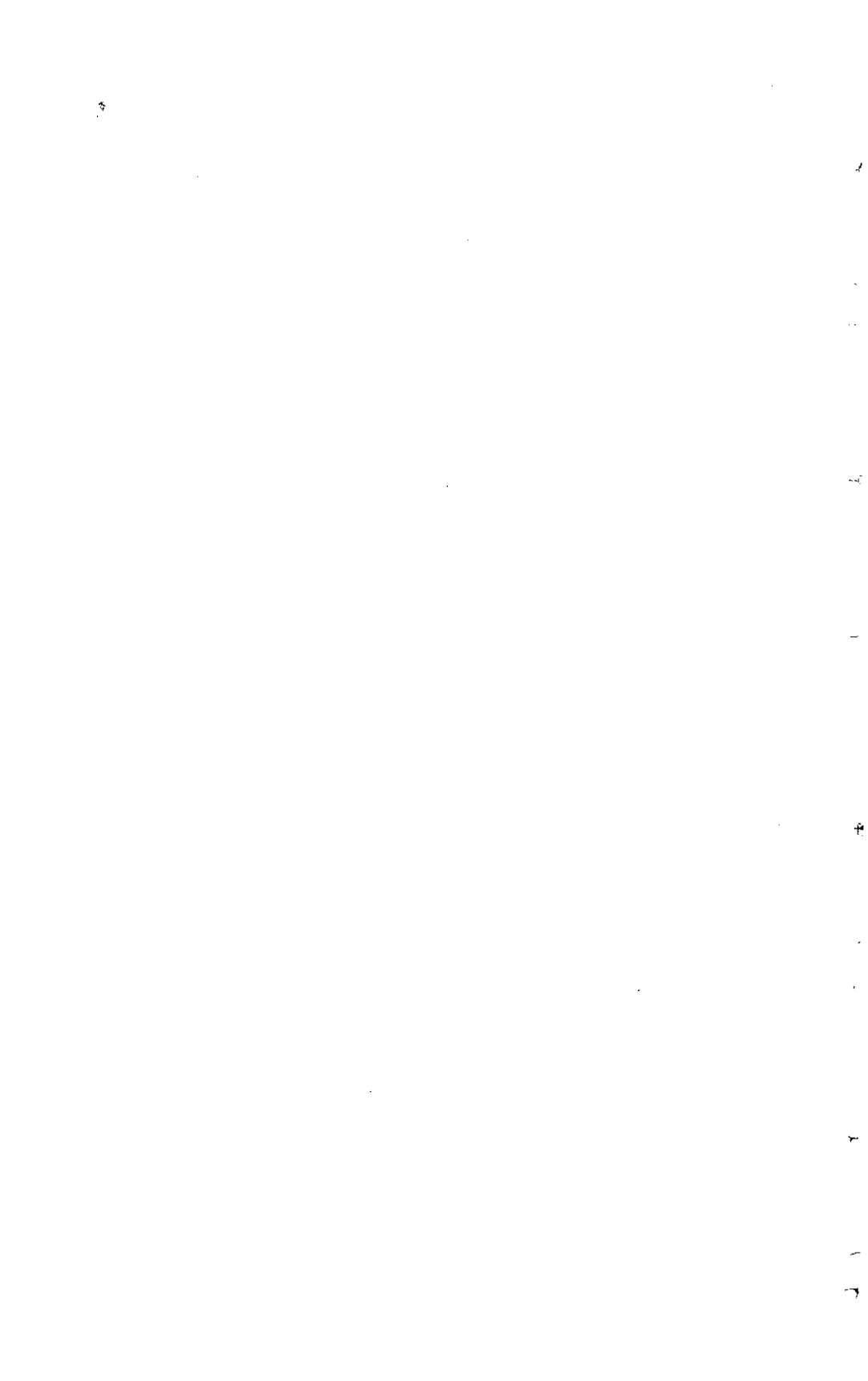
Los siguientes artículos de equipo y cristalería que se usan comúnmente en el laboratorio serológico han sido omitidos en las listas que aparecen en el texto de cada una de las técnicas de análisis a fin de evitar la repetición de las mismas.

Equipo

1. Centrífuga con tacómetro.
2. Bomba filtro para conexión de agua.
3. Relojes de aviso.
4. Microscopio, monocular o binocular.
5. Lámpara de microscopio.
6. Gradillas de madera o de alambre para los tubos con las muestras.
7. Refrigerador de 6° a 10°C. con departamento de congelación.
8. Reloj cronómetro.
9. Termómetros adecuados para los baños de María y el refrigerador.
10. Baños de María para 37°C. y 56°C.

Cristalería

1. Frascos con tapón de vidrio, Pyrex, con capacidades de 100 ml. a 1 litro.
2. Cilindros graduados con capacidades de 50 ml. a 1 litro.
3. Frascos de Erlenmeyer con capacidades de 25 ml. a 2 litros.
4. Pipetas serológicas graduadas hasta la punta:
 - 0,1 ml., graduadas en $\frac{1}{100}$ de ml.
 - 0,2 ml., graduadas en $\frac{1}{100}$ de ml.
 - 1,0 ml., graduadas en $\frac{1}{100}$ de ml.
 - 5,0 ml., graduadas en $\frac{1}{10}$ de ml.
 - 10,0 ml., graduadas en $\frac{1}{10}$ de ml.
5. Tubos para muestras, de tamaños adecuados para recolección de sangre y de líquido céfalloorraquídeo.



Reacción de Referencia de APHA

Antes de ejecutar esta reacción, el técnico debe familiarizarse con el contenido de los capítulos Informaciones Generales y Equipo General.

Equipo

1. Máquina rotatoria, ajustable a 180 r.p.m., capaz de moverse en círculos de $\frac{3}{4}$ de pulgada de diámetro sobre un plano horizontal.
2. Dispositivo para hacer anillos de parafina de aproximadamente 14 mm. de diámetro.
3. Soportes para láminas. Hechos de un material conveniente y destinados a acomodar láminas de 2 x 3 pulgadas.
4. Agujas hipodérmicas.
 - a. Calibre 23, que rindan aproximadamente 100 gotas de solución salina por mililitro. (Si se sostiene la jeringa en posición casi vertical generalmente rendirá la cantidad deseada.)
 - b. Calibre 25, agujas de bisel corriente, calibradas para dar 75 gotas de emulsión de antígeno por mililitro. (Sosteniendo la jeringa en posición horizontal, con el bisel hacia abajo.)

Nota: Se pueden emplear otros medios para repartir los reactivos, pero es de primordial importancia que en cada análisis se use la cantidad adecuada ($\frac{1}{75}$ ml.) de emulsión de antígeno.

Cristalería

1. Pipetas, de 0,2 ml., graduadas en 0,01 ml.
2. Frascos con tapón de vidrio o con tapón de rosca (recubierto con papel de estaño), redondos, de 30 ml. de capacidad.
3. Láminas de vidrio, de 3 x 2 pulgadas.
4. Jeringas, tipo Luer, de 1 ó 2 ml.

Reactivos

1. Antígeno

El antígeno para esta prueba es una solución alcohólica que contiene 0,03% de cardiopina, 0,9% de colesterol (precipitado Pfanstiehl en alcohol etílico absoluto o de igual calidad) y suficiente lecitina purifi-

cada para reproducir el nivel de reactividad del antígeno estándar. La Asociación Americana de Salud Pública y la Sección de Laboratorios de la Organización Mundial de la Salud realizan estudios conjuntos (1) para determinar la concentración óptima de locitina para este antígeno.

2. Soluciones salinas

a. Solución salina al 0,9 por ciento

Pésense cuidadosamente 900 mg. de cloruro de sodio previamente desecado al horno y agréguese a 100 ml. de agua destilada. Filtrese la solución salina antes de su uso.

b. Solución salina tope

Formaldehido, neutro, purísimo, ml.	0,5
Fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$), gm.	0,093
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) gm.	0,170
Cloruro de sodio, A.C.S., gm.	10,000
Agua destilada, ml.	1.000,0

La solución da lecturas potenciométricas de pH $6,0 \pm 0,1$ y se almacena en frascos con tapón de rosca o de vidrio.

Preparación de los Sueros

1. El suero claro se calienta al baño de María a 56°C . durante 30 minutos. Todos los sueros que contienen partículas visibles después de calentados deben ser centrifugados nuevamente.

2. Los sueros que vayan a usarse después de 4 horas de haber sido calentados se colocarán de nuevo durante 10 minutos en un baño de María a 56°C .

Preparación de las Láminas

1. Los anillos de parafina se preparan por medio del dispositivo especial (véase "Equipo" pág. 9).

2. Todas las láminas se limpian de la manera siguiente:

a. Las láminas nuevas se limpian con jabón Bon Ami, el cual se quita con un paño suave después de seco.

b. A las láminas usadas se les quita previamente la parafina con agua jabonosa caliente, después se lavan con agua y jabón y se les aplica Bon Ami en la forma descrita para la limpieza de las láminas nuevas.

3. Si las láminas están perfectamente limpias, el suero se extenderá por sí solo al colocarlo dentro del anillo de parafina.

4. Si el suero no se extiende, no se use la lámina, puesto que es una indicación de que no está completamente limpia.

Preparación de la Emulsión de Antígeno

1. Deposítese con una pipeta 0,4 ml. de solución salina tope en el fondo de un frasco redondo de 30 ml. con tapón de vidrio o de rosca.
 2. Añádase 0,5 ml. de antígeno (la mitad inferior de una pipeta de 1,0 ml. graduada hasta la punta) directamente sobre la solución salina, mientras se imprime un movimiento de rotación suave pero continuo a la botella sobre una superficie plana.
- Nota: El antígeno se añade gota a gota, pero con cierta rapidez, de modo que permita la salida de 0,5 ml. de antígeno en 6 segundos. La punta de la pipeta no deberá descender del tercio superior del frasco y la rotación no será tan fuerte como para mojar la pipeta con la solución salina.*
3. Sópese la última gota de antígeno de la pipeta sin que ésta toque la solución salina.
 4. Continúese la rotación de la botella durante otros 10 segundos.
 5. Con una pipeta de 5,0 ml. añádanse 4,1 ml. de solución salina tope.
 6. Tápese el frasco y agítese vigorosamente durante 10 segundos aproximadamente.
 7. La emulsión del antígeno está lista para su uso y puede ser utilizada durante un día.

Todas las emulsiones de antígeno deben ensayarse con sueros controles de reactividad conocida, así como con la solución salina. Las reacciones que se obtengan con estos sueros controles deben reproducir la escala de reactividad establecida para ellos. Las partículas de la emulsión del antígeno en el suero No Reactivo y en la solución salina control no deben ser demasiado grandes. Si las partículas de antígeno no son de tamaño satisfactorio (lo que determinará la experiencia), se desechará la emulsión.

La Reacción Serológica

1. Distribúyanse cantidades de 0,04 ml., 0,02 ml., y 0,01 ml. de suero previamente calentado en el primero, segundo y tercer anillos de parafina de las láminas, mediante una pipeta de 0,2 ml.
2. Agréguese, con una jeringa provista de aguja, dos y tres gotas de solución salina al 0,9 por ciento, al segundo y tercer anillos, respectivamente. (Cada gota debe contener 0,01 ml.; esto se logra usando la aguja de calibre 23, según se explica en la sección sobre "Equipo" pág. 9.)
3. Agréguese una gota de la emulsión del antígeno a cada uno de los tres anillos. (Cada gota contendrá $\frac{1}{75}$ ml., si se usa la aguja de calibre 25, sosteniendo la jeringa horizontalmente, con el bisel hacia abajo, según se explica en la sección "Equipo".)
4. **Hágase** girar la lámina durante 4 minutos a 180 r.p.m. sobre el aparato rotatorio mecánico.

5. Léase la reacción inmediatamente después de la rotación.
6. Si se observan grumos en el tercer anillo, dilúyase el suero al 1:8 (1 parte de suero por 7 partes de solución salina al 0,9 por ciento) y repítase la prueba como con suero sin diluir.

Pauta para la Reacción de Microfloculación de Referencia APHA (2)

	Anillo de Parafina Número:					
	1	2	3	4	5	6
Suero, sin diluir, ml.	0,04	0,02	0,01
Suero, diluido, 1:8 ml.	0,04	0,02	0,01
Solución salina (cada gota $\frac{1}{100}$ ml.)	0	2 gotas	3 gotas	0	2 gotas	3 gotas
Emulsión del antígeno (cada gota $\frac{1}{5}$ ml.)	1 gota	1 gota	1 gota	1 gota	1 gota	1 gota
Dilución de suero	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32

Nota: Si hay grumos en el anillo 6 (dilución 1:32), dilúyase el suero al 1:64 y repítase la prueba. Se debe obtener un resultado No Reactivo antes de que la prueba esté terminada.

Lectura e Informe de los Resultados de la Reacción

1. Léanse las reacciones microscópicamente, con un aumento de 100 X.
2. Se considera que el resultado de la reacción del suero con el antígeno es Reactivo o No Reactivo.
3. Si hay grumos formados por las partículas del antígeno en el suero o en la dilución del suero, o en ambos, la prueba se informa como Reactiva.
4. Si no hay grumos o sólo ligera irregularidad de las partículas del antígeno, se informa como No Reactiva.
5. Todos los resultados Reactivos se informan indicando la más alta dilución de suero que produjo los grumos de las partículas de antígeno. Por ejemplo:

Reactivo, únicamente sin diluir, ó 1 dil
 Reactivo, dilución al 1:2, ó 2 dils
 Reactivo, dilución al 1:4, ó 4 dils

Referencias Bibliográficas

- (1) Organización Mundial de la Salud, Sección de Laboratorio. Comunicación personal.
- (2) Subcomisión para el Desarrollo de Métodos de Referencia para la Serología de la Sífilis. Am. J. Pub. Health, Parte 2, Anuario, 42: 78-82, mayo 1952.

Reacciones de Hinton

Antes de ejecutar esta reacción, el técnico debe familiarizarse con el contenido de los capítulos Informaciones Generales y Equipo General.

Equipo

1. Agitador de Kahn (275 a 285 oscilaciones por minuto, con amplitud de pulgada y media en cada una).

Cristalería

1. Tubos de ensayo,¹ de 100 x 11¼ mm. de diámetro exterior, en adelante denominados tubos de Hinton.
2. Frascos, Erlenmeyer, de 125 ó 250 ml. de capacidad, con un sollevamiento en la base en forma de V invertida que produce dos compartimientos semicirculares (frascos de Hinton).

Reactivos

1. Indicador de Hinton

La solución madre del indicador para esta reacción es una solución alcohólica que contiene 0,0884 por ciento de cardiolipina, 0,6188 por ciento de lecitina purificada, y 0,24 por ciento de colesterol. Cada lote de antígeno debe ser estandarizado serológicamente mediante comparación adecuada con un antígeno de reactividad reconocida (1-3).

Nota: El Dr. Hinton recomienda a los laboratorios que no dependan exclusivamente de esta fórmula, sino que adquieran el indicador de los fabricantes que lo venden, siempre que su potencia sea del más alto grado, determinada por medio de ensayos serológicos y clínicos.

2. Solución de cloruro de sodio al 5 por ciento

- a. Pésense 5 gramos de cloruro de sodio previamente desecado (A.C.S.).
- b. Añádase el cloruro de sodio a 100 ml. de agua destilada y caliéntese la solución en un autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.
- c. Guárdese la solución salina en botellas tapadas con tapón de vidrio, a temperatura ambiente (23° a 29°C.).

3. Solución de cloruro de sodio al 0,85 por ciento

Añádase la cantidad necesaria (8,5 gramos por cada litro) de cloruro de sodio desecado al agua destilada. No es necesario calentar esta solución y se debe preparar el día en que se vaya a usar.

¹ N° de catálogo 45060/S73, Kimble Glass Co., Vineland, N. J.

4. Solución de glicerina al 50 por ciento

Mézclense volúmenes iguales de glicerina² Baker y Adamson (purísima) y agua destilada. Esta solución dura indefinidamente sin alterarse.

REACCIONES DE HINTON CON SUERO

Preparación de los Sueros

1. Sepárense los sueros de los coágulos por centrifugación y aspiración con pipeta o decantación.
2. Caliéntense los sueros en el baño de María durante 30 minutos a 56°C. Este calentamiento no se hará antes del día en que se ejecute la reacción. Si hay necesidad de repetir el examen en una muestra, úsese suero recién separado del coágulo, si lo hubiera.
3. Vuélvase a centrifugar cualquier muestra a la que se le hayan formado partículas visibles al calentarla.

Preparación del Indicador Glicerinado de Hinton

1. Depósitese con pipeta una parte del indicador de Hinton dentro de uno de los compartimientos de un frasco de Hinton.

Nota: No se debe mezclar de una vez una cantidad menor de 1 ml. ni mayor de 5 ml. del indicador de Hinton.

2. Depósitese con pipeta 0,8 partes de la solución de cloruro de sodio al 5 por ciento dentro del otro compartimiento del frasco de Hinton. Debe tenerse cuidado al colocar la solución salina dentro del frasco a fin de evitar una mezcla prematura de las soluciones.
3. Mézclese el contenido del frasco, agitándolo rápidamente de un lado a otro durante 1 minuto exactamente.
4. Déjese reposar la mezcla durante 5 minutos exactos.
5. Agréguese 13,2 partes de la solución de cloruro de sodio al 5 por ciento y agítese el frasco vigorosamente.
6. Agréguese 15 partes de la solución de glicerina al 50 por ciento y agítese la botella hasta que la suspensión sea homogénea.
7. Guárdese en un frasco tapado con tapón de cristal, en el refrigerador. Esta suspensión, que se designa como solución glicerizada del indicador, se conserva en buen estado por lo menos durante 3 semanas.

Reacción Cualitativa Estándar de Hinton con Suero

1. Colóquense los tubos de Hinton en gradillas adecuadas, de manera que haya un tubo para cada suero que se va a analizar (y también para los

² General Chemical Division, Allied Chemical and Dye Corp., Nueva York, N. Y.

sueros controles de reactividad conocida).³ Numérense los tubos de manera que correspondan a los números que identifican a los sueros.

2. Deposítense con pipeta 0,5 ml. de cada suero calentado dentro del tubo correspondiente.

Nota: Ocasionalmente sueros que son fuertemente Reactivos producirán un resultado No Reactivo cuando se usan en cantidad de 0,5 ml. en la prueba. Si se sospecha una reacción de este tipo, deberá hacerse el análisis usando 0,1 ml. además del efectuado con la cantidad de 0,5 ml. de suero.

3. Añádase con pipeta 0,5 ml. del indicador glicerinado de Hinton dentro de cada tubo con suero.

Nota: Debe agitarse bien el frasco que contiene el indicador glicerinado de Hinton al sacarlo del refrigerador. Extráigase la cantidad necesaria del indicador glicerinado y vuelva a colocarse el frasco en el refrigerador inmediatamente.

4. Agítense a mano las gradillas que contienen los tubos hasta observar que los sueros y el indicador glicerinado están bien mezclados.

5. Agítense las gradillas con los tubos en la agitadora de Kahn durante 5 minutos.

6. Quítense las gradillas de la agitadora y pónganse en el baño de María a 37°C. durante 16 horas.

Nota: El baño de María debe permanecer destapado durante este período, y a temperatura constante de 37°C. $\pm 1^\circ$.

Lectura e Informe de los Resultados de la Reacción

1. Colóquese una lámpara cilíndrica fluorescente (luz día) de 18 ó más pulgadas de largo, con pantalla, frente a un lugar con fondo oscuro. El foco de la lámpara deberá quedar escasamente arriba del nivel de los ojos.

2. Sáquese cada tubo de la gradilla cuidadosamente sin mover su contenido.

3. Sosténgase el tubo en un ángulo de 45°, a nivel de los ojos, cerca de la pantalla de la lámpara.

4. Obsérvese si hay clarificación del líquido y la presencia o ausencia de un anillo de copos o gránulos blancos y gruesos a la altura del menisco.

5. Levántese el tubo inclinado, un poco más arriba del nivel de los ojos y mírese a través del mismo hacia el fondo oscuro, para así determinar la presencia o ausencia de floculación.

6. Infórmense los resultados del modo siguiente:

Reactivo Copos o gránulos blancos y gruesos en el menisco, y floculación claramente visible cuando se agita el tubo.

³ El Dr. W. A. Hinton recomienda que no se usen sueros de control de reactividad escalonada (4) en la forma usada en el Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas, puesto que los considera "las substancias menos estables usadas en la reacción" y, por lo tanto, una posible fuente de confusión.

No Reactivo..... Ausencia de un anillo o banda de flocúlos y de floculación o granularidad al agitar ligeramente el tubo. Los sueros hemolizados o contaminados con bacterias frecuentemente producen un anillo blanquecino que se adhiere fuertemente al tubo.

7. Centrifúguense a 2.000 r.p.m., durante 5 minutos, todos los tubos en los cuales no se pueda hacer lecturas claramente No Reactivas o Reactivas.
8. Retírense los tubos de la centrífuga y léanse las reacciones en la forma antes descrita.
9. Infórmense los resultados como sigue:

Débilmente Reac-

tivo..... Aquellas reacciones que muestran una granulación gruesa en el menisco, y floculación definida cuando se agita el tubo suavemente.

No Reactivo..... Todas aquellas muestras que no reaccionan como se describe bajo la denominación "Débilmente Reactivo".

No Satisfactorio..... Aquellas muestras hemolizadas o con contaminación bacteriana, a menos que el resultado sea fuertemente Reactivo.

Reacción Rápida de Hinton con Suero

1. Caliéntese el suero fresco durante 3 minutos a 60°C.
2. Colóquense los tubos de Hinton en gradillas adecuadas de modo que haya un tubo para cada suero que se va a analizar y también para la escala de sueros controles.
3. Depósitese con pipeta 0,5 ml. del suero por analizar dentro de los tubos de ensayo adecuadamente numerados.
4. Añádase 0,5 ml. del indicador de Hinton glicerinado a cada tubo con suero y, previo agitado a mano, sométanse a la acción de la agitadora mecánica por 10 minutos, a fin de mezclar el contenido de los tubos.
5. Retírese de la agitadora la gradilla con los tubos y colóquese en el baño de María a 37°C. durante 20 minutos.
6. Sáquense los tubos del baño de María y centrifúguense a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos.
7. Extráiganse los tubos de la centrífuga sin agitar su contenido.
8. Léase cada uno como se describe bajo "Lectura e Informe de los Resultados de la Reacción" (pág. 15).
9. Infórmense los resultados observados de la manera siguiente:

Reactivo..... Copos claramente visibles en el menisco, y floculación bien definida al agitar los tubos suavemente.

No Reactivo..... Ausencia de anillo o banda de flocúlos en el menisco, falta

de floculación que persiste aun cuando los tubos se agiten después ligeramente.

No Satisfactorio. Aquellas muestras hemolizadas o con contaminación bacteriana, a menos que la reacción sea fuertemente Reactiva.

Reacción Cuantitativa Estándar de Hinton con Suero

1. Prepárense las diluciones de suero en la siguiente forma:
 - a. Colóquese una hilera de tubos de Hinton numerados del 1 a 8.
 - b. Añádase 0,5 ml. de una solución de cloruro de sodio al 0,85 por ciento a los tubos del 2 al 8.
 - c. Añádase 0,5 ml. de suero calentado a los tubos 1 y 2.
 - d. Mézclese y transfírase 0,5 ml. del tubo 2 al tubo 3.Continúese este procedimiento hasta el tubo 8 y deséchense 0,5 ml. del tubo 8.
2. Añádase 0,5 ml. del indicador glicerinado a cada uno de los 8 tubos.
3. Agítense a mano las gradillas que contienen los tubos hasta observar que los sueros y el indicador glicerinado están mezclados.
4. Colóquense las gradillas en la agitadora de Kahn y agítense por 5 minutos.
5. Déjense las gradillas con los tubos en un baño de María destapado, a 37°C., durante 16 horas.
6. Léanse las reacciones en la forma descrita bajo "Lectura e Informe de los Resultados de la Reacción" (pág. 15).
7. Infórmense los resultados en términos de la mayor dilución que produce un resultado Reactivo, por ej., Reactivo en una dilución al 1:8, Reactivo en una dilución al 1:16, etc.

El tubo N° 1 contiene suero no diluido.

REACCIONES DE DAVIES-HINTON

Reacción de Microfloculación de Davies-Hinton con Suero

Equipo

1. Tapones de goma.⁴
2. Bulbos de goma para pipetas capilares.

⁴ Tapón de tubo N° 3 del catálogo N° 68 de West Co., 1117 Shakamaxon St., Filadelfia, Pa.

Cristalería

1. Tubos de vidrio con diámetro interior de 80 x 2,5 mm.
2. Pipeta capilar (10- x 1-cm. de diámetro; el extremo capilar debe tener 1 mm. de diámetro aproximadamente).

Preparación de los Sueros

1. Colóquese la sangre en tubos de vidrio (80 x 2,5 mm.), en adelante denominados tubos de recolección.
2. Quítese el tapón de un extremo y utilícese un alambre para separar el coágulo de las paredes del tubo.
3. Colóquese el tubo de recolección, tapado, en un tubo de ensayo rotulado, de 13 x 100 mm. y centrifúguese a alta velocidad por 10 minutos. En el caso de que el suero no esté bien separado vuélvase a centrifugar.
4. Añádase agua a los tubos de ensayo de 13 x 100 mm. que contienen los tubos de recolección tapados (con el coágulo hacia abajo) y colóquense en el baño de María a 56°C. durante 10 minutos.
5. Retírense los tubos del baño de María y deséchese el agua de los tubos de ensayo.
6. Retírese el tapón del tubo de recolección en el extremo en el que está el suero y márchese el tubo, inmediatamente arriba de la unión del suero y el coágulo, con una lima para vidrio.
7. Sosteniendo horizontalmente el tubo de recolección, rómpase y deséchese la parte que contiene el coágulo.

PROCEDIMIENTO DE LA REACCION DE MICROFLOCULACION CON SUERO

1. Traspáscese cada suero a dos tubos de recolección. Uno deberá contener una columna de suero de 2,5 cm. de largo y el otro una columna de 0,5 cm. a 1,0 cm. de largo.
2. Añádase al tubo que contiene la columna de 2,5 cm. una cantidad igual de indicador glicerinado de Hinton. Usese una pipeta capilar para este objeto. Deberá tenerse cuidado de que no se interponga aire entre el suero y el indicador.
3. Añádase una columna de 2,5 cm. a 5 cm. de alto del indicador glicerinado de Hinton al suero contenido en el segundo tubo (con la columna de suero de 0,5 cm. a 1,0 cm.).
4. Mézclense el suero y el indicador de Hinton inclinando cada tubo hacia ambos lados alternadamente por 10 veces.
5. Tápanse ambos extremos de los dos tubos de recolección y colóquense en los tubos de ensayo de 13 x 100 mm, que estarán numerados en forma idéntica.

6. Llénense con agua los tubos de ensayo conteniendo los tubos de recolección tapados y pónganse al baño de María a 37°C. durante 16 horas.

7. Retírense los tubos del baño de María, váciense el agua que contienen y centrifúguense los tubos de ensayo conteniendo los de recolección tapados, durante 5 minutos a 2.000 r.p.m. aproximadamente.

Lectura e Informe de los Resultados de la Reacción

1. Léanse los resultados mediante el objetivo de bajo aumento del microscopio y sólo con la luz suficiente para que los conglomerados en el menisco sean fácilmente visibles. La platina del microscopio deberá estar inclinada a 30° aproximadamente de la línea horizontal y el tubo será colocado bajo la lente con el menisco hacia arriba.

2. Obsérvese la cantidad de grumos en el menisco, en caso de haberlos, e infórmense los resultados en la siguiente forma:

Reactivo. Grumos bien definidos, discretos o compactos en el menisco en cualquiera de los tubos. (La acción de golpear suavemente el tubo puede ayudar a que los grumos floten a la vista.)

No Reactivo. No hay grumos visibles en los tubos. Las partículas granulares turbias y amorfas en el menisco deben ser interpretadas como No Reactivas.

Débilmente Reactivo. Algunos pequeños grumos en el menisco de cualquiera de los tubos. En este caso los grumos deberán ser redispersados golpeando el tubo con el dedo, después de lo cual será nuevamente centrifugado durante 3 minutos. Si a continuación se ven nuevamente pequeños grumos en el menisco, la reacción será informada como Débilmente Reactiva; pero si los grumos son grandes y compactos en cualquiera de los tubos, deberá informarse como Reactiva.

Reacción de Floculación Davies-Hinton con Líquido Céfalorraquídeo

Reactivos

1. Indicador glicerinado de Hinton. (Véase "Preparación del Indicador Glicerinado de Hinton", pág. 14.)

2. Solución de cloruro de sodio al 0,85 por ciento. (Véase "Reactivos" para las "Reacciones de Hinton", pág. 13.)

3. Solución de cloruro de sodio al 3,0 por ciento

Añádase al agua destilada la cantidad necesaria (3 gramos por cada 100 ml.) de cloruro de sodio desecado. Esta solución debe ser preparada el día de su uso.

4. Suero humano No Reactivo al Hinton

Selecciónese uno o más sueros claramente No Reactivos a la reacción de Hinton y vuélvase a examinar con la técnica de la "Reacción

Rápida de Hinton con Suero" (pág. 16), empleando las dos cantidades siguientes:

Tubo N° 1: 0,5 ml. de suero y 0,5 ml. del indicador glicerinado de Hinton.

Tubo N° 2: 0,1 ml. de suero y 0,5 ml. del indicador glicerinado de Hinton.

Nota: Cuando se examina un gran número de líquidos céfalorraquídeos es conveniente mezclar los sueros, filtrarlos en seguida por filtro Seitz, agregarles mertiolato hasta una concentración de 1:10.000 y finalmente practicar con ellos reacciones rápidas de Hinton en la forma antes descrita. Guárdense los sueros así examinados a temperaturas de 8° a 10°C. durante no más de 3 semanas. Evítese el uso de sueros turbios.

5. Solución de goma acacia al 20 por ciento

a. Colóquense 20 gramos de goma acacia en forma de polvo blanco (U.S.P.) en un frasco de 4 oz.

b. Añádanse 100 ml. de solución de cloruro de sodio al 3 por ciento.

c. Colóquese el tapón de baquelita forrado por dentro con "vinylite" sobre el frasco, en forma floja (no atornille el tapón).

d. Caliéntese el frasco en el autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

e. Retírese el frasco del autoclave, atornillese bien el tapón, agítese en seguida hasta disolver completamente la acacia y manténgase en condiciones estériles.

Reacción Preliminar de Suero No Reactivo al Hinton y Solución de Goma Acacia

1. Mézclense 5 ml. de suero No Reactivo al Hinton con 5 ml. de solución de goma acacia al 20 por ciento por cada 10 líquidos céfalorraquídeos que se vayan a examinar.

2. Practíquese una reacción rápida en la siguiente forma:

a. Deposítese con pipeta 0,6 ml. de solución de cloruro de sodio al 0,85 por ciento en un tubo de ensayo de Hinton, añádanse 0,2 ml. de mezcla recientemente hecha de suero-acacia y 0,2 ml. de indicador glicerinado de Hinton mezclando bien por agitación.

b. Colóquese el tubo en el baño de María a 37°C. durante 20 minutos.

c. Centrifúguese a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos.

d. Una mezcla satisfactoria de suero-acacia debe dar un resultado No Reactivo.

Preparación del Líquido Céfalorraquídeo

El líquido céfalorraquídeo debe ser previamente centrifugado y decantado. Los líquidos visiblemente contaminados o que contienen demasiada cantidad de sangre no son satisfactorios para el análisis.

PROCEDIMIENTO DE LA REACCION DE FLOCULACION CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

1. Prepárese una gradilla con 4 tubos de ensayo, uno detrás del otro, para cada líquido céfalorraquídeo que deba ser examinado y para los controles de líquidos céfalorraquídeos Reactivo y No Reactivo. Numérense los tubos de modo que correspondan a los números de identificación de cada líquido.
2. Con pipeta depositense 0,6 ml. de cada líquido céfalorraquídeo en el correspondiente tubo numerado de la primera hilera, 0,4 ml. en el tubo de la segunda hilera, 0,2 ml. en el de la tercera hilera y 0,1 ml. en el tubo de la última hilera.
3. Añádase 0,2 ml. de la mezcla de suero-acacia a cada tubo.
4. Agréguese 0,2 ml. de indicador glicerinado de Hinton a cada tubo.
5. Agítense vigorosamente las gradillas con los tubos hasta que su contenido se haga completamente homogéneo.
6. Colóquense las gradillas en el baño de María a 37°C. durante 16 horas.
7. Retírense todos los tubos del baño de María y centrifúguense a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos.

Lectura e Informe de los Resultados de las Reacciones

1. Retírense suavemente los tubos de la centrifuga sin agitar su contenido.
2. Delante de una luz artificial adecuada (véase "Lectura e Informe de los Resultados de la Reacción" en la parte correspondiente a "Reacción Cualitativa Estándar de Hinton con Suero", pág. 14) golpéese suavemente el tubo en su base mientras se lo sostiene por su extremo superior.
3. Infórmense como Reactivos todos los líquidos céfalorraquídeos que muestren flóculos definidos, que se dispersan del menisco hacia abajo, en cualquiera de los cuatro tubos.
4. Vuélvase a centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos todos los otros tubos.
5. Relírense los tubos de la centrifuga y procédase a examinarlos de nuevo golpeándolos en la forma antes descrita.
6. Infórmese del siguiente modo:

Reactivo. Flóculos definidos que se dispersan hacia abajo del menisco en uno o más de los cuatro tubos.

Débilmente Reactivo. Floculación no definida en cualquier tubo.

No Reactivo. Ausencia de floculación y aspecto de vidrio esmerilado en todos los tubos.

Referencias Bibliográficas

- (1) STUART, G. O.; GRANT, J. F.; HINTON, W. A.: A note on the use of cardiolipin in the preparation of indicator (antigen) for the Hinton test. *J. Ven. Dis. Inform.*, 29: 27 de enero 1948.

- (2) HINTON, W. A.; STUART, G. O.; GRANT, J. F.: The use of cardiolipin-lecithin in the preparation of antigen for the Hinton test. *Am. J. Syph., Gonor. and Ven. Dis.*, 33: 587-592, noviembre 1949.
- (3) HINTON, W. A.: Comunicación personal, abril 1953.
- (4) HINTON, W. A.: Comunicación personal, junio 1954.

Reacciones de Kahn

Antes de practicar esta reacción, el técnico debe estar familiarizado con el contenido de los capítulos Informaciones Generales y Equipo General.

Equipo

1. Gradillas para tubos de Kahn.
2. Gradillas para los tubos de suspensión antigénica.
3. Máquina agitadora de Kahn (275-285 oscilaciones por minuto, con amplitud de $1\frac{1}{2}$ pulgada).
4. Espejo de microscopio.
5. Lámpara tipo cuello de ganso con bombilla azul opaca, o lámpara fluorescente (ajustable).

Cristalería

1. Tubos de Kahn con diámetro exterior de 75 x 12 mm.
2. Pipetas de Kahn para medir cantidades de 0,25 ml. de suspensión de antígeno, graduadas en 0,0125 ml.
3. Tubos de Kahn para la suspensión de antígeno, de fondo plano y con un diámetro interior de 55 x 15 mm.

Reactivos

I. Antígeno estándar de Kahn. (Véase "Preparación del Antígeno Estándar de Kahn", pág. 37.) El rótulo debe indicar el título del antígeno.

a. El antígeno debe guardarse a la temperatura ambiente (23° a 29°C.) y en la oscuridad.

b. Los cambios registrados en el antígeno, debido a su envejecimiento, generalmente se reflejan en la aparición de reacciones No Reactivas. Si las reacciones se hacen demasiado claras o turbias, el antígeno deberá ser titulado y estandarizado nuevamente. Rara vez, sin embargo, ocurre la necesidad de modificar otra vez este reactivo. Estos procedimientos deben ser efectuados únicamente por un laboratorio calificado para hacer esos ajustes.

2. Solución salina

a. Pésense 9,0 gramos de cloruro de sodio desecado, químicamente puro (A.C.S.), para cada litro de solución salina.

b. Disuélvase la sal en agua destilada. Agítese la solución perfectamente para asegurar una mezcla completa. El pH de la solución salina al 0,9 por ciento no debe ser inferior a 5,5 ni superior a 7,0.

REACCIONES DE KAHN CON SUERO

Preparación de los Sueros

1. Sepárese el suero de los coágulos por medio de centrifugación y extráigase con pipeta o por decantación el suero sobrenadante.
2. Caliéntense los sueros en el baño de María a una temperatura de 56°C. durante 30 minutos. Después de sacarlos del baño de María se dejan a la temperatura ambiente por lo menos 10 minutos, de manera que las muestras vuelvan a esa temperatura (23° a 29°C.) antes de ser analizadas.

Cuando se necesite repetir el examen, los sueros deberán calentarse nuevamente por 10 minutos, siempre que dicha repetición se lleve a cabo dentro de 2 a 24 horas del primer calentamiento, o durante 15 minutos si la repetición se hace después del calentamiento inicial.

Si los sueros se han conservado en el refrigerador, debe esperarse a que vuelvan a la temperatura ambiente antes de calentarlos.

3. Todo suero en el cual se hayan formado partículas visibles durante el calentamiento o conservación debe ser centrifugado y decantado de nuevo.

Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con Suero

1. Dispónganse tubos en gradillas estándar de Kahn, de modo que haya tres tubos para cada suero que se va a analizar, incluyendo sueros controles de reactividad escalonada y solución salina control. Numérese la primera fila de tubos en forma de que correspondan a los sueros que se están analizando.

2. Prepárese la solución de antígeno estándar del modo siguiente:

a. Mídase en un tubo de suspensión de antígeno la cantidad de solución salina requerida, de acuerdo con el título, para una cantidad determinada de antígeno.

b. Mídase en un segundo tubo similar la cantidad requerida de antígeno.

Nota: El título en el frasco de antígeno indicará la cantidad de solución salina que debe ser mezclada con 1 ml. de antígeno para obtener una suspensión de reactividad estándar. Generalmente 1 ml. de antígeno da suficiente suspensión para 20 reacciones. No deberá medirse en un sólo tubo menos de 1 ml. ni más de 2 ml. de antígeno.

c. Viértase la solución salina sobre el antígeno y, sin dilación, pásese la mezcla de un tubo al otro 12 veces, evitando derramar el contenido al hacer esta operación.

d. La suspensión de antígeno se dejará reposar por 10 minutos antes de usarla y no deberá emplearse después de 30 minutos de preparada.

3. Colóquese el dedo pulgar sobre la boca del tubo y agítelo bruscamente para suspender las partículas de antígeno.

4. Deposítase 0,05 ml. de suspensión de antígeno directamente en el fondo

de cada tubo de la fila delantera de la gradilla, empleando una pipeta de antígeno de Kahn.

5. Deposítense 0,025 ml. de suspensión de antígeno directamente en el fondo de cada tubo de la fila del medio de la gradilla.

6. Deposítense 0,0125 ml. de suspensión de antígeno directamente en el fondo de cada tubo de la fila de atrás, de la gradilla.

7. Agréguese 0,15 ml. de cada suero a los tres tubos de la serie correspondiente que contienen las cantidades de 0,05 ml., 0,025 ml. y 0,0125 ml. de suspensión de antígeno, respectivamente.

Nota: Complétese el agregado de suspensión de antígeno y sueros de una gradilla antes de añadir la suspensión de antígeno y los sueros a otra gradilla.

8. Agítense las gradillas a mano durante 10 segundos después que la suspensión de antígeno y los sueros hayan sido agregados a todos los tubos de esa gradilla.

9. Déjese reposar la suspensión suero-antígeno a temperatura ambiente durante 3 a 7 minutos.

10. Agítense la gradilla con los tubos durante 3 minutos en la agitadora de Kahn.

11. Sáquese la gradilla de la máquina agitadora. Agréguese 1,0 ml. de solución salina a cada uno de los tubos de la fila delantera y 0,5 ml. a cada tubo de las otras dos filas.

Nota: Agréguese la solución salina a una gradilla y complete la lectura de los tubos antes de continuar con otra.

12. Agítense la gradilla a mano suavemente por unos pocos segundos para mezclar el contenido de los tubos.

13. Léase cada tubo de la gradilla inmediatamente (dentro de 2 minutos) después de haberle agregado la solución salina. (Vease "Lectura de los Resultados" e "Informe de los Resultados", pág. 26.)

14. Repítase la lectura de cada tubo 15 minutos después de hecha la primera, en todos los casos en que no se haya obtenido un resultado No Reactivo en la primera lectura.

Esquema de la Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con Suero

	Tubo 1 (frente)	Tubo 2 (medio)	Tubo 3 (atrás)
Proporciones entre suero y suspensión de antígeno.....	3:1	6:1	12:1
Suspensión de antígeno, ml.....	0,05	0,025	0,0125
Suero, ml.....	0,15	0,15	0,15
Agítense a mano durante 10 segundos.			
Déjese reposar de 3 a 7 minutos.			
Agítense durante 3 minutos en la máquina agitadora de Kahn.			
Solución salina, ml.....	1,0	0,5	0,5
Agítense lo necesario para mezclar los componentes y examínese si hay presencia o ausencia de precipitados.			

Lectura de los Resultados

1. Colóquese un espejo de microscopio en la mesa de lectura, con la superficie cóncava hacia arriba.
2. Ajústese una lámpara de lectura (bombilla de luz día o tubo fluorescente) arriba del espejo de manera que la imagen de la bombilla no sea visible en él, pero en tal forma que el tubo pueda ser sostenido dentro del cono de luz.
3. Colóquese cada tubo que se va a leer en una posición casi horizontal, de modo que la parte baja quede de 1 a 2 pulgadas sobre el espejo.
4. Véase la imagen del contenido del tubo en el espejo y anótese el grado de floculación.

Interpretación de los Resultados

Anótese el grado de floculación en la siguiente forma:

- 4+ Flóculos relativamente grandes.
- 3+ Flóculos de tamaño mediano.
- 2+ Flóculos finos fácilmente distinguibles.
- 1+ Flóculos muy finos.
- ± Flóculos extremadamente finos, apenas distinguibles.
- Un medio opalescente, libre de partículas visibles.

Informe de los Resultados

En la prueba de Kahn se observan dos tipos generales de reacciones:

1. *Reacciones típicas*—caracterizadas por la presencia del *mayor* grado de floculación en relación con las *menores* cantidades de suspensión de antígeno.

O

2. *Reacciones zonales*—caracterizadas por la presencia del *mayor* grado de floculación en relación con las *mayores* cantidades de suspensión de antígeno o *igual* grado de floculación (que no sea 4 4 4) con las *tres* cantidades de suspensión de antígeno.

En todos los casos en que se observen estas reacciones (con las excepciones que figuran en el cuadro 2), deben realizarse ambas pruebas suplementarias (pág. 29) y ser interpretadas antes de hacer el informe. (Véase "Informe de los Resultados" bajo *Reacciones Suplementarias de Kahn*, pág. 30.)

Informe de las reacciones típicas

- a. Súmense las cruces (descartando las lecturas de ±) obtenidas en la primera y segunda lecturas.
- b. Infórmense los resultados de las pruebas como Reactivo, Débilmente Reactivo y No Reactivo, tal como se describe en el cuadro 1.

Cuadro 1. Informe de las reacciones típicas

Suma de cruces en la primera y segunda lecturas de los tubos ¹	Informe
22 a 24.....	Reactivo (4+)
16 a 21.....	Reactivo (3+)
10 a 15.....	Reactivo (2+)
5 a 9.....	Débilmente Reactivo (1+)
^a 4.....	Débilmente Reactivo (±)
^b 3 ó menos.....	No Reactivo

¹ Las lecturas de ± son descartadas.

^a Una suma de 4 cruces significa un informe No Reactivo cuando los resultados son -11 y -11 en la primera y segunda lecturas.

^b Una suma de 3 cruces significa un informe Débilmente Reactivo (±) cuando los resultados son -- 3 en la primera lectura y -- ± en la segunda lectura, o cuando son -- 2 en la primera lectura y -- 1 en la segunda lectura.

El Informe de las Reacciones Zonales se describe en los cuadros 2 al 8.

**Cuadro 2. Reacciones zonales informadas "Reactivas (4+)"
(no son necesarias las pruebas suplementarias)**

Suero Núm.	Primera lectura			Segunda lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1.....	4	4	3	4	4	3
2.....	4	4	2	4	4	2
3.....	4	4	1	4	4	1
4.....	4	4	—	4	4	—

Cuadro 3. Reacciones zonales informadas "Reactivas (4+)" cuando las pruebas suplementarias 1 y 2 son Reactivas

Suero Núm.	Primera lectura			Segunda lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1.....	4	3	3	3	3	3
2.....	4	3	2	4	3	2
3.....	4	3	—	4	3	—
4.....	4	1	—	4	—	—
5.....	3	3	3	3	3	3
6.....	2	2	2	2	2	2
7.....	2	—	—	2	—	—
8.....	1	1	1	1	1	1
9.....	1	—	—	1	—	—
10.....	±	±	±	±	±	±
11.....	±	—	—	±	—	—

**Cuadro 4. Reacciones zonales informadas "Reactivas (3+)"
cuando las pruebas suplementarias 1 y 2 son No Reactivas**

Suero Núm.	Primera lectura			Segunda lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1.....	4	3	3	3	3	3
2.....	4	3	2	4	3	2
3.....	3	3	3	3	3	3

**Cuadro 5. Reacciones zonales informadas "Reactivas (2+)"
cuando las pruebas suplementarias 1 y 2 son No Reactivas**

Suero Núm.	Primera lectura			Segunda lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1.....	4	2	2	3	2	2
2.....	4	1	1	4	1	1
3.....	4	3	±	4	3	±
4.....	3	3	2	3	3	—

**Cuadro 6. Reacciones zonales informadas "Débilmente Reactivas
(1+)" cuando las pruebas suplementarias 1 y 2 son No Reactivas**

Suero Núm.	Primera lectura			Segunda lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1.....	4	1	±	3	1	±
2.....	3	2	±	3	—	—
3.....	3	±	—	3	±	—
4.....	2	2	2	2	2	2

**Cuadro 7. Reacciones zonales informadas "Débilmente Reactivas
(±)" cuando las pruebas suplementarias 1 y 2 son No Reactivas**

Suero Núm.	Primera lectura			Segunda lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1.....	2	2	1	2	2	±
2.....	2	2	—	2	1	—
3.....	2	1	—	2	±	—

**Cuadro 8. Reacciones zonales informadas "No Reactivas"
cuando las pruebas suplementarias 1 y 2 son No Reactivas**

Suero Núm.	Primera lectura			Segunda lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1.....	2	±	±	2	±	±
2.....	2	±	±	2	—	—
3.....	2	±	—	2	—	—
4.....	2	—	—	2	—	—
5.....	1	1	±	1	±	±
6.....	1	±	±	1	—	—
7.....	±	±	±	±	—	—
8.....	±	—	—	±	—	—

REACCIONES SUPLEMENTARIAS DE KAHN CON SUERO

Reacción Suplementaria No. 1

1. Depósitese con pipeta 0,05 ml. de la suspensión de antígeno (véase "Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con Suero", párrafo 2, pág. 24) en el fondo de cada uno de dos tubos (numerados 1 y 2).
2. Añádase 0,05 ml. de suero (previamente calentado) al tubo 1 y 0,10 ml. de suero al tubo 2.
3. Agítese la gradilla a mano durante 10 segundos para mezclar el contenido de los tubos. Déjese reposar de 3 a 7 minutos.
4. Agítese la gradilla en la agitadora de Kahn durante 3 minutos.
5. Quítese la gradilla de la agitadora, agréguese 1,0 ml. de solución salina a cada tubo y agítense a mano para mezclar.
6. Léase inmediatamente, y de nuevo después de 15 minutos, en la forma descrita bajo "Lectura de los Resultados" (pág. 26).

Reactiva: Una reacción de 4+ ó 3+ en cada uno de los dos tubos.

No Reactiva: Una reacción inferior a 3+ en cada uno de los dos tubos.

Reacción Suplementaria No 2

1. Prepárense diluciones de suero al 1:4, 1:8 y 1:16 de la siguiente manera:
 - a. Depósitense con pipeta dentro de tres tubos (numerados 1, 2 y 3) 0,6, 0,4 y 0,4 ml. de solución salina, respectivamente.
 - b. Agréguese 0,2 ml. de suero al tubo 1 y mézclase.
 - c. Pásese 0,4 ml. del tubo 1 al tubo 2 y mézclase.
 - d. Pásese 0,4 ml. del tubo 2 al tubo 3 y mézclase.

2. Deposítase con pipeta 0,0125 ml. de la suspensión de antígeno (véase "Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con Suero", párrafo 2, pág. 24) en el fondo de tres tubos de Kahn (numerados 1, 2 y 3).
3. Añádase 0,15 ml. de las diluciones de suero al 1:4, 1:8 y 1:16 a los tubos 1, 2 y 3, respectivamente, comenzando con la dilución de suero más alta.
4. Agítese la gradilla a mano durante 10 segundos para mezclar el contenido de los tubos. Déjese reposar de 3 a 7 minutos.
5. Agítese la gradilla en la agitadora de Kahn durante 3 minutos.
6. Quítese la gradilla de la agitadora, añádase 0,5 ml. de solución salina a cada tubo y agítese para mezclar.
7. Léase inmediatamente como se describe en "Lectura de los Resultados", pág. 26.

Reactiva: Una reacción de 4+ ó 3+, por lo menos en la dilución al 1:4.
 No Reactiva: Una reacción de 2+, ó menos, en la dilución al 1:4 y en las más altas.

Informe de los Resultados

1. *Reacciones suplementarias 1 y 2, Reactivas.*

Infórmense los resultados de la prueba estándar como Reactiva (4+).

2. *Reacciones suplementarias 1 y 2, No Reactivas.*

Infórmense los resultados de la prueba estándar según se indica en los cuadros 4 a 8 (págs. 28-29).

3. *Reacción suplementaria N° 1 Reactiva y suplementaria N° 2 No Reactiva.*

Prepárense diluciones del suero al 1:32, 1:64 y 1:128 y ensáyese en la forma indicada bajo la reacción suplementaria N° 2 (pág. 29). Si el resultado es Reactivo en uno o más tubos (una reacción de 4+ ó 3+), infórmense los resultados de la prueba estándar como Reactiva (4+). Si el resultado es No Reactivo en todos los tubos (una reacción inferior a 3+), infórmense los resultados de la prueba estándar en la forma indicada en los cuadros 4 a 8 (págs. 28-29).

4. *Reacción suplementaria No. 1 No Reactiva y suplementaria No. 2 Reactiva.*

Ensáyese el suero sin diluir en una suspensión suero: antígeno al 1:2 (0,05 ml. de suspensión antigénica más 0,025 ml. de suero). Si el resultado es Reactivo (una reacción de 4+ ó 3+), infórmese el resultado de la reacción estándar como Reactivo (4+). Si el resultado es No Reactivo (inferior a 3+), infórmese el resultado de la reacción estándar como se indica en los cuadros 4 a 8 (págs. 28-29).

Sistema de Control para la Reacción Estándar

1. Sueros de control de reactividad escalonada y una solución salina de control deberán ser probados con cada suspensión de antígeno, conjuntamente con las pruebas regulares.

2. Los resultados obtenidos con sueros o líquidos cefalorraquídeos no deben ser informados si no se obtiene el tipo de reactividad característica de esos controles. El fracaso en la obtención de resultados satisfactorios puede ser causado por

- a. solución salina impropriamente preparada,
- b. antígeno no satisfactorio,
- c. suspensión de antígeno preparada incorrectamente,
- d. el uso de una suspensión de antígeno que ha sido preparada más de 30 minutos antes,
- e. realización de las pruebas en una habitación a baja temperatura.

3. En el laboratorio del Dr. Kahn se efectúa el sistema de control antes de realizar las pruebas ordinarias. La suspensión de antígeno para el control se reparte a los 10 minutos exactos de preparada. Después de distribuir los controles se agitan en seguida los tubos en la agitadora Kahn durante 3 minutos, se agrega la solución salina y los resultados se leen sólo una vez.

Nota: Esta clase de control, que se completa en no más de 5 minutos, permite la lectura de los resultados de las pruebas de control antes de realizar las pruebas regulares y hace posible descubrir cualquier error técnico en la preparación de la suspensión de antígeno.

Reacción Cuantitativa Estándar de Kahn con Suero

Las reacciones cuantitativas se realizan en todos los sueros que dan 4+ ó 3+ en la reacción cualitativa estándar de Kahn.

1. Prepárense diluciones de suero al 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y mayores, si es necesario, en la siguiente forma:

- a. Colóquese con pipeta dentro de cada uno de seis (o más) tubos, 0,5 ml. de solución salina al 0,9 por ciento.
- b. Añádase 0,5 ml. del suero calentado al primer tubo y mézclese.
- c. Pásese 0,5 ml. del primer tubo al segundo y mézclese.
- d. Continúese traspasando y mezclando de un tubo al siguiente hasta que se hayan hecho todas las diluciones. Déjese la pipeta con que se mezcla dentro del último tubo.

Nota: Las diluciones de suero deben ser preparadas y empleadas dentro del término de 2 horas de haber calentado o recalentado el suero no diluido.

2. Prepárese la suspensión de antígeno como se describe en la "Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con Suero" (pág. 24), mezclando antígeno estándar de Kahn con solución salina al 0,9 por ciento.

3. Después que la suspensión de antígeno ha reposado 10 minutos (pero no más de 30 minutos), colóquese el pulgar en la boca del tubo conteniendo la suspensión y agítese vivamente para obtener una suspensión homogénea.

4. Deposítase con pipeta 0,0125 ml. de la suspensión de antígeno en el fondo de seis o más tubos de Kahn numerados.
 5. Añádase 0,15 ml. de la dilución de suero al 1:64 a la suspensión de antígeno contenida en el tubo 6.
 6. Añádase 0,15 ml. de la dilución de suero al 1:32 a la suspensión de antígeno contenida en el tubo 5.
 7. Continúese añadiendo 0,15 ml. de las diluciones decrecientes del suero a los tubos 4, 3, 2 y 1, respectivamente.
 8. Agítase la gradilla a mano durante 10 segundos y déjese reposar de 3 a 7 minutos.
 9. Agítase la gradilla en la agitadora mecánica durante 3 minutos.
 10. Quítase la gradilla de la agitadora, y agréguese 0,5 ml. de la solución salina al 0,9 por ciento a cada tubo.
- Nota: Añádase la solución salina a una gradilla y termínese la lectura de ella antes de añadir la solución salina a otra gradilla.*
11. Agítase la gradilla a mano durante unos segundos para mezclar el contenido de los tubos.
 12. Léase cada tubo de la gradilla dentro de los 2 minutos después de haber añadido la solución salina al 0,9 por ciento.
 13. Anótase el título correspondiente al punto final, esto es, la dilución mayor del suero en la cual se observan reacciones de 4+, 3+ ó 2+.
 14. Calcúlese el título cuantitativo aplicando la fórmula $S = 4D$, en la cual S es la potencia del suero en términos de unidades Kahn y D es la mayor dilución en la que se observa reacción de 4+, 3+, ó 2+.

Ejemplos:

- a. Si la mayor dilución en la cual se observa una reacción de 4+, 3+, ó 2+ es 1:64, entonces $S = 4 \times 64$ ó 256 unidades Kahn.
 - b. Si la mayor dilución en la cual se observa una reacción de 4+, 3+, ó 2+ es 1:16, entonces $S = 4:16$ ó 64 unidades Kahn.
15. Infórmense los resultados dando tanto el número de unidades Kahn como la dilución mayor en la cual se observa una reacción de 4+, 3+, ó 2+.

Ejemplos:

- a. 256 unidades Kahn (dilución al 1:64).
 - b. 64 unidades Kahn (dilución al 1:16).
16. Los sueros que den reacciones de 3+, 2+, ó 1+ en la reacción cualitativa de Kahn pueden informarse como con 3, 2 y 1 unidad Kahn, respectivamente, en la reacción cuantitativa, si las diluciones de sueros resultaron No Reactivas.

REACCIONES DE KAHN CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

Preparación de la Solución Saturada de Sulfato de Amonio

1. A 500 gm. de sulfato de amonio purísimo añádanse 500 ml. de agua bidestilada usando un matraz Pyrex limpio de 3 a 5 litros de capacidad.
2. Hiérvase la solución hasta que se aclare.
3. Déjese enfriar a la temperatura ambiente.
4. Fíltrese y almacénese en frascos con tapón de vidrio, a la temperatura ambiente.

Preparación de la Solución Concentrada de Globulina de Cada Líquido Cefalorraquídeo

1. Centrifúguense y decántense todos los líquidos cefalorraquídeos para eliminar los restos celulares y partículas.
2. Colóquese con pipeta 1,5 ml. de líquido cefalorraquídeo en un tubo de Kahn.
3. Añádase 1,5 ml. de la solución saturada de sulfato de amonio.
4. Colóquese el pulgar (protegido con dedal de goma) en la boca del tubo y agítese vigorosamente para mezclar el contenido.
5. Póngase la mezcla en el baño de María a 56°C. durante 15 minutos para acelerar la precipitación de la globulina.
6. Sáquese el tubo del baño de María y centrifúguese a 2.000 r.p.m. durante 15 minutos. (El precipitado de globulina se encontrará acumulado en el fondo del tubo.)
7. Decántese y deséchese el líquido sobrenadante invirtiendo y haciendo girar el tubo al mismo tiempo. Cúbrase toda la pared del tubo con el líquido sobrenadante para permitir su drenaje y evitar que el sulfato de amonio se cristalice en la pared.

Nota: Raras veces es excesiva la cantidad de globulina. En esos casos no se debe decantar el líquido sobrenadante, sino que debe extraerse con pipeta capilar.

8. Inviértase el tubo sobre papel filtro para escurrirlo durante 10 minutos, golpéese suavemente, y úsese una tira de papel filtro para quitar las gotas del líquido sobrenadante que hayan quedado.
9. Añádanse 0,15 ml. de solución salina al precipitado de globulina colocando la punta de la pipeta cerca del fondo del tubo para evitar que arrastre cualquier residuo del sulfato de amonio que haya quedado adherido en las proximidades de la boca del tubo.

10. Golpéese suavemente la base del tubo para redissolver la globulina.

Nota: Cuando la globulina no se disuelve completamente en 0,15 ml. de solución salina, añádanse 0,05 ml. más de esta solución y agítese suavemente. Si todavía no se disuelve, vuélvase a añadir 0,05 ml. de solución salina. En raras ocasiones la globulina permanecerá completamente insoluble. En esos casos la solución clara de globulina se separará de la proteína insoluble por medio de centrifugación. Si mediante la centrifugación no se obtuviera un líquido sobrenadante claro, agréguese una pequeña cantidad de talco o caolín a la mezcla y vuélvase a centrifugar el tubo. El líquido sobrenadante claro (que es la solución de globulina) se saca entonces con una pipeta capilar, se pasa a un tubo limpio y está así listo para probarse con la suspensión de antígeno.

Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con Globulina Concentrada de Líquido Céfalorraquídeo

1. Colóquense tubos de Kahn en una gradilla de tal manera que haya un tubo para cada globulina concentrada de LCR que se vaya a probar, incluyendo concentrados de líquidos céfalorraquídeos Reactivo y No Reactivo y controles de antígeno-solución salina. Numérense los tubos para que correspondan con los LCR que se están probando.

2. Prepárese la suspensión de antígeno estándar como se describe en "Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con Suero" (pág. 24).

3. Colóquese el pulgar en la boca del tubo de mezcla y agítese vivamente para suspender las partículas del antígeno.

4. Deposítense con pipeta 0,01 ml. de la suspensión de antígeno estándar directamente en el fondo de cada tubo.

5. Añádase 0,15 ml. de la globulina concentrada de LCR a cada uno de los tubos correspondientes.

Nota: Complétese el agregado de la suspensión de antígeno y de la globulina concentrada a una gradilla antes de repetir la misma operación con la siguiente.

6. Agítese la gradilla a mano durante 10 segundos después de haber añadido la suspensión de antígeno y los LCR concentrados a todos los tubos.

7. Agítese la gradilla durante 4 minutos en la agitadora de Kahn.

8. Sáquese la gradilla de la agitadora y añádanse 0,5 ml. de solución salina al 0,9 por ciento a cada tubo.

Nota: Añádase la solución salina a una gradilla y termínese la lectura antes de añadirla a otra.

9. Agítese la gradilla a mano unos segundos para mezclar el contenido de los tubos.

10. Léase cada tubo de la gradilla en la forma descrita en "Lectura de los Resultados" (pág. 26) dentro del término de 2 minutos después de haber

agregado la solución salina y vuélvase a leer 15 minutos más tarde. Para el informe final calcúlese el promedio de los resultados de ambas lecturas.

11. Infórmese de acuerdo con el cuadro 9.

Cuadro 9. Informe de las reacciones cualitativas estándar de Kahn con líquido céfalorraquídeo

Lectura	Informe
4+	Reactivo (4+)
3+	Reactivo (3+)
2+	Reactivo (2+)
1+	Débilmente Reactivo (1+)
±	No Reactivo
-	No Reactivo

Esquema de la Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con Líquido Céfalorraquídeo

Suspensión de antígeno, ml.....	0,01
Globulina concentrada del ICR, ml.....	0,15
Agítese la gradilla a mano por 10 segundos	
Agítese durante 4 minutos en la agitadora de Kahn	
Solución salina, ml.....	0,5
Léase dentro del término de 2 minutos y nuevamente 15 minutos más tarde.	

Reacción Cuantitativa Estándar de Kahn con Líquido Céfalorraquídeo

Las reacciones cuantitativas en líquido céfalorraquídeo se practican en aquellas muestras que producen resultados Reactivos en la prueba cualitativa de Kahn.

1. Prepárense diluciones de líquido céfalorraquídeo en la forma indicada en el cuadro 10.
2. Dispóngase una suspensión estandarizada de antígeno en la forma descrita en "Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con Suero" (pág. 24).
3. Colóquese el pulgar sobre la boca del frasco de la mezcla y agítese suavemente para suspender las partículas de antígeno.
4. Deposítese con pipeta 0,01 ml. de la suspensión de antígeno directamente en el fondo de cada tubo. Se requiere un tubo para cada dilución del líquido céfalorraquídeo que se examina.
5. Añádase 0,15 ml. de líquido céfalorraquídeo diluido a cada tubo, comenzando con la dilución más alta.
6. Agítese la gradilla a mano durante 10 segundos.

7. Agítese la gradilla en una agitadora de Kahn durante 4 minutos.

Cuadro 10

Tubo	Líquido céfalorraquídeo ¹ (ml.)	Solución salina (ml.)	Dilución resultante
1	Cantidad disponible	Ninguna	1:10
2	0,2	0,1	1:15
3	0,2	0,2	1:20
4	0,1	0,2	1:30
5	0,1	0,3	1:40

¹ El líquido céfalorraquídeo total es considerado como una dilución al 1:10 ya que el análisis cualitativo se practica en globulina del líquido céfalorraquídeo concentrado 10 veces.

8. Sáquese la gradilla del agitador, añádanse 0,5 ml. de solución salina a cada tubo y léase inmediatamente.

9. Obsérvese la dilución más alta del líquido céfalorraquídeo que muestra un resultado Reactivo (4+, 3+, ó 2+).

10. Calcúlense las unidades de Kahn de acuerdo con la fórmula $S = 4D$, en donde S es la potencia del líquido céfalorraquídeo en términos de unidades Kahn y D es la dilución más alta en la cual se observa una reacción de 4+, 3+, ó 2+.

Ejemplo

a. Líquido céfalorraquídeo Reactivo a dilución al 1:10 (dil. resultante)
 $10 \times 4 = 40$ unidades Kahn.

b. Líquido céfalorraquídeo Reactivo a dilución al 1:40 (dil. resultante)
 $40 \times 4 = 160$ unidades Kahn.

II. Vúelvansé a analizar los líquidos céfalorraquídeos que den únicamente resultados No Reactivos en las diluciones anteriores, en la siguiente forma:

a. Prepárese un concentrado de globulina de líquido céfalorraquídeo en la forma descrita en "Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con Líquido Céfalorraquídeo" (pág. 34).

b. Añádase una cantidad suficiente de solución salina a la solución de globulina como para hacer una dilución al 1:5 (0,15 ml. de solución de globulina, más 0,6 ml. de solución salina).

c. Practíquese la reacción en un tubo, en la forma prescrita para analizar las diluciones del líquido céfalorraquídeo.

d. Si esta dilución al 1:5 da resultado Reactivo, el título cuantitativo es de 20 unidades Kahn; si da un resultado No Reactivo, el título es equivalente a la lectura obtenida con la concentración de globulina no diluida.

Preparación del Antígeno Estándar de Kahn

Cristalería y Equipo

1. Frasco filtro con tubo lateral, Pyrex™
2. Filtro embudo Buchner de porcelana.
3. Papel filtro de tamaño adecuado para el embudo Buchner.
4. Hoja de estaño delgada, de alta calidad.

Reactivos

1. Polvo de corazón de buey.

El polvo de corazón de buey puede ser adquirido¹ o bien preparado en el laboratorio en la siguiente forma:

- a. Quítese la grasa y el tejido conjuntivo de 3 ó más corazones frescos de buey.
- b. Muélase 3 ó 4 veces el tejido en un molino para carne.
- c. Extiéndase una capa delgada en una placa de porcelana o de vidrio y séquese con la corriente de aire de uno o más ventiladores eléctricos durante 6 horas.
- d. Rómpace el material en pequeños pedazos y cúbrase los con una gasa.
- e. Continúese la desecación hasta que los trocitos se hagan quebradizos.
- f. Pulverícense las partículas en un mortero o en un molino apropiado.
- g. Almacénese el polvo en el refrigeradora antes de usarlo.

2. Eter

Debe usarse éter anestésico libre de alcohol.

3. Alcohol

Usese alcohol etílico con un contenido de alcohol no inferior al 95 por ciento.

4. Colesterol

Deberá emplearse colesterol químicamente puro, exento de cenizas, de alta calidad.

Método de Preparación del Extracto Alcohólico

1. Pésense 100 gm. de polvo de corazón de buey y colóquense en un matraz de Erlenmeyer de 1 litro tapado herméticamente con un corcho recubierto de papel de estaño o con un tapón de vidrio.
2. Añádanse 400 ml. de éter anestésico.
3. Tápese el frasco y agítase a frecuentes intervalos durante 10 minutos.

¹ Difco Laboratories, Detroit, Mich.

4. Colóquese el papel filtro en un embudo Buchner, ajustado al frasco filtro con tubo lateral por medio de un tapón de goma con una perforación.
5. Viértase el contenido del frasco de extracción de 1 litro en el embudo y fíltrese rápidamente por succión.
6. Pásese el polvo de corazón de buey húmedo a una hoja de papel filtro.
7. Fragméntese el material en pequeños pedazos y póngase de nuevo, inmediatamente, en el frasco de extracción de un litro.
8. Añádanse 300 ml. de éter al frasco, tápese y agítese a intervalos frecuentes durante 10 minutos.
9. Viértase el contenido del frasco en el embudo, usando un papel filtro nuevo, y fíltrese por succión.
10. Vuélvase a pasar el polvo de corazón de buey húmedo a una hoja de papel filtro.
11. Fragméntese el material en pequeños pedazos y pásese inmediatamente al frasco de extracción.
12. Repítanse los pasos 8, 9 y 10 hasta un total de cuatro extracciones etéreas.
13. Extiéndase el polvo de corazón de buey en una hoja de papel filtro limpia y séquese con la ayuda de una espátula hasta que el polvo esté exento de olor a éter.
14. Inviértase el frasco en el que se hizo la extracción etérea hasta que haya desaparecido el olor a éter.
15. Pésese el polvo seco y exento de éter y póngaselo de nuevo en el frasco.
16. Añádanse 5 ml. de alcohol al 95 por ciento para cada gramo de polvo.
17. Tápese el frasco con el tapón y agítese intermitentemente durante 10 minutos.
18. Déjese reposar durante 3 días a la temperatura ambiente (aproximadamente 23° a 29°C.) en la obscuridad.
19. Agítese el frasco intermitentemente durante 10 minutos y fíltrese el contenido. Si es necesario vuélvase a filtrar para eliminar todas las partículas visibles.
20. Guárdese a la temperatura ambiente en la obscuridad, como solución madre.

Colesterolización del Extracto Alcohólico

1. Péseñse 6,0 mg. de colesterol por cada mililitro de extracto alcohólico del antígeno.
2. Colóquese el colesterol en un frasco con tapón de vidrio o en matraz de Erlenmeyer de tamaño adecuado.
3. Añádase la cantidad apropiada de extracto alcohólico medida con un cilindro graduado.

4. Tápese herméticamente el frasco y colóquese al baño de María caliente para apresurar la disolución del colesterol, agitando el frasco intermitentemente.

5. Después que el colesterol se haya disuelto completamente, déjese enfriar el antígeno a la temperatura ambiente y fíltrese a través de un papel exento de grasa (Whatman Núm. 1).²

Estandarización del Antígeno

El propósito de la estandarización es hacer un antígeno recientemente preparado, comparable a un antígeno estándar de Kahn. Para realizarla se emplean los tres procedimientos siguientes:

1. *Determinación del título.*—Determinése la cantidad mínima de solución salina al 0,9 por ciento que debe ser añadida a 1 ml. de antígeno para producir una suspensión de agregados que se disperse completamente con la adición de una cantidad dada de solución salina, reproduciendo la opalescencia del antígeno estándar.

2. *Determinación del nivel de reactividad.*—Pruébese el antígeno, por lo que se refiere a su título, con sueros sifilítico y no sifilítico, empleando el antígeno estándar simultáneamente como control.

3. *Corrección del antígeno.*—Corrójase el antígeno hasta que llene los requisitos estándar cuando la reactividad no es comparable con la del antígeno patrón. (Véase "Antígenos" bajo "Informaciones Generales", pág. 2.)

Determinación del Título

1. Mídase con una pipeta de 1,0 ml. (graduada en 0,01 ml.) 0,9, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, y 1,9 ml., respectivamente, de solución salina al 0,9 por ciento en ocho tubos para suspensión de antígeno.

2. Mídase con una pipeta de 1,0 ml. en cada uno de ocho tubos similares, 1 ml. del antígeno colesterolizado al 0,6 por ciento que debe ser titulado (un control de antígeno estándar debe ser hecho al mismo tiempo diluyéndolo al título indicado en la etiqueta).

3. Prepárense las suspensiones de antígeno mezclando las cantidades de 1 ml. de antígeno con las cantidades variables de solución salina. Váciese la solución salina sobre el antígeno y tan rápidamente como sea posible (sin esperar a que escurra el tubo) páscese la mezcla de un tubo al otro 12 veces. Déjese la mezcla en reposo durante 30 minutos en vez del período habitual de 10 minutos.

4. Investíguese la dispersabilidad en la solución salina de los agregados lípidos presentes en las suspensiones antígeno-solución salina, del modo siguiente:

² Papel Whatman, Springfield Mills, Maidstone, Inglaterra. A la venta en Fisher Scientific Company, Pittsburgh, Pa.

a. Prepárense nueve series con 3 tubos de ensayo de Kahn cada una.

b. Depósitense 0,05, 0,025 y 0,0125 de cada una de las ocho suspensiones de antígeno (después de cuidadosa agitación) en el fondo de los tubos de cada serie, usando una pipeta de antígeno de 0,25 ml. Las mismas cantidades de emulsión, preparadas a partir del antígeno estándar, se deben colocar dentro de los tres últimos tubos.

Nota: Deberá usarse una pipeta de antígeno de Kahn diferente para cada suspensión de antígeno.

c. Añádase 0,15 ml. de solución salina con una pipeta de 1 ml. a cada uno de los 27 tubos.

d. Agítese vigorosamente a mano la gradilla con los tubos durante 10 segundos; después durante 3 minutos en un agitador mecánico a la velocidad de 275 a 285 oscilaciones por minuto.

e. Agréguese 1 ml. de solución salina a los tubos que contienen las cantidades de 0,05 ml. de suspensión de antígeno y 0,5 ml. a los tubos restantes. Agítese la gradilla a mano para mezclar los componentes y obsérvese si las mezclas son opalescentes o contienen conglomerados.

Una titulación típica puede mostrar nebulosidades en los tres tubos que contienen la suspensión de antígeno que fue preparada con 0,9 ml. y con 1,1 ml. de solución salina. Estas suspensiones contienen conglomerados que no fueron redispersados por completo en la solución salina. Las reacciones producidas por la suspensión de antígeno que fue mezclada con 1,3 ml. de solución salina pueden ser opalescentes, exactamente como el control de antígeno estándar. Las otras reacciones con suspensiones de antígeno conteniendo 1,4, 1,5, 1,7 y 1,9 ml. de solución salina pueden ser más claras que el control. En este caso el título del antígeno será 1 ml. de antígeno más 1,3 ml. de solución salina, es decir, 1,3 ml. es la menor cantidad de solución salina que, añadida a 1 ml. de antígeno, produce conglomerados capaces de redispersarse con la adición de más solución salina, y que reproduce la opalescencia del antígeno estándar. La siguiente tabulación muestra una titulación típica de antígeno. Los títulos "normales" para antígeno estándar pueden variar en una escala de 1 + 1, 1 a 1 + 1,5.

Titulación típica de antígeno

<i>Antígeno + solución salina al 0,9%</i> (ml.)	<i>Aspecto de la mezcla</i>
1 + 0,9.....	Nebulosa, conglomerados no dispersables.
1 + 1,1.....	Conglomerados ligeramente nebulosos, finos, no dispersables.
1 + 1,2.....	Muy ligeramente nebulosa.
1 + 1,3.....	Opalescente, estándar (título).
1 + 1,4.....	Muy ligeramente más clara.
1 + 1,5.....	Ligeramente más clara.
1 + 1,7.....	Muy clara.
1 + 1,9.....	Casi clara como el agua.

Control de antígeno estándar: Opalescente, estándar

Las suspensiones de antígeno hechas con volúmenes progresivamente crecientes de solución salina, es decir, 0,9, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7 y 1,9 ml., habitualmente muestran un correspondiente incremento progresivo en la claridad de las mezclas de suspensión de antígeno y solución salina. Raramente, sin embargo, una suspensión de antígeno mostrará una "titulación de zona". Esto es, que puede aparecer, más allá del título, nebulosidad y agregados no dispersables, por ejemplo, en los tubos conteniendo 1,7 ml. ó 1,9 ml. de solución salina. Este factor indica que este antígeno en particular tiene límites muy cortos para ser trabajado y es mejor no destinarlo para uso general.

Nota: Después que el título de un antígeno ha sido establecido, el siguiente paso es determinar si el nivel de reactividad del antígeno es comparable con el del antígeno estándar. Esto se logra probando simultáneamente varios sueros con el antígeno en cuestión y el antígeno estándar.

Determinación del Nivel de Reactividad del Antígeno Recién Preparado

1. Preparación de los sueros

Una serie de sueros con reactividades escalonadas pueden ser preparados mezclando sueros Reactivos y No Reactivos, filtrados por filtro Seitz, combinándolos en proporciones tales que se obtenga el número deseado de mezclas que reaccionan unas fuertemente y otras débilmente. Estas mezclas así preparadas pueden ser usadas para todas las pruebas preliminares, pero solamente sueros individuales seleccionados son adecuados para la comprobación final de la reactividad del antígeno. Todos los sueros deben ser calentados antes de usarse.

2. Análisis preliminar de un antígeno recientemente preparado

Prepárense las suspensiones con ambos antígenos de acuerdo con sus títulos respectivos. Después que ambas suspensiones de antígeno se han dejado en reposo durante 10 minutos, practíquense los análisis por lo menos con 10 sueros, exactamente en la forma descrita en "Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con Suero" (págs. 24-25). Si se obtienen reacciones comparables con ambas suspensiones de antígeno, deberá llevarse a cabo la revisión final que se describe a continuación.

3. Revisión final del antígeno recientemente preparado

Obténganse por lo menos 50 sueros que muestren distintos grados de reactividad a la reacción de Kahn y 50 sueros con resultado No Reactivo. Practíquense los análisis usando ambas suspensiones de antígeno simultáneamente, en la forma descrita en "Reacción Cualitativa Estándar de Kahn con Suero" (págs. 24-25).

Cada suero deberá ser analizado con ambos antígenos en la misma gradilla de modo que el factor tiempo sea constante. Deberán hacerse dos lecturas en cada caso en que haya reacciones perceptibles durante la primera lectura.

Las dos lecturas son necesarias ya que algunos antígenos que producen primeras lecturas estándar pueden dar lugar a que las partículas legibles se redispersen en una proporción distinta a la del antígeno estándar. En este caso el informe final de una muestra dada podría ser menor o mayor que el obtenido con antígeno estándar. Si los resultados producidos por el nuevo antígeno son iguales a los del antígeno estándar, el antígeno recientemente preparado puede ser considerado como de reactividad estándar.

Corrección del Antígeno

El nivel de reactividad del antígeno recientemente preparado puede ser mayor o menor que el del antígeno estándar. En cualquiera de estos casos, puede llevarse a cabo la corrección de él hasta que llene los requisitos exigidos. Los reactivos necesarios habitualmente para la corrección del antígeno se enumeran a continuación:

Estandarización del antígeno estándar de Kahn

<i>Reactividad del antígeno</i>	<i>Método de ajuste</i>
Menos reactivo que el estándar.....	1. Adición de alcohol colesteroilizado. 2. Adición de reactivo sensibilizante. 3. Adición de reactivo sensibilizante más alcohol colesteroilizado. 4. Adición de un antígeno hiperreactivo.
Más reactivo que el estándar.....	1. Adición de alcohol colesteroilizado. 2. Adición de un antígeno menos reactivo. 3. Solución correctiva de lecitina.

1. Preparación del alcohol colesteroilizado

A 100 ml. de alcohol al 95 por ciento en un matraz de Erlenmeyer o en una botella con tapón de cristal de 250 ml. agréguese 600 mg. de colesteroil. Hágase rotar el frasco en un baño de María caliente hasta que todo el colesteroil esté disuelto. Fíltrese cuando esté frío.

2. Preparación del reactivo sensibilizante

a. Vuélvase a filtrar el filtrado etéreo obtenido en la preparación del antígeno para eliminar los restos de músculo pulverizado. Colóquese en una placa de evaporación y evapórese el éter con ayuda de un ventilador eléctrico. Durante el período de evaporación pueden condensarse algunos centímetros cúbicos de agua. Esta agua aparecerá en el fondo de la placa de evaporación y se sugiere que sea eliminada con una pipeta capilar a medida que se forme para evitar la emulsificación de los lípidos. El residuo lípido es de color café, semitransparente y viscoso.

b. Cuando el volumen ha sido reducido a un punto en el cual ya no puede descubrirse el olor a éter, el residuo se pasa a una pequeña placa de evaporación ya tarada, y se pesa.

c. Se añade en seguida un volumen de alcohol absoluto equivalente a 10 ml. por gramo del residuo y la mezcla lípida se transfiere a un frasco.

d. Se deja efectuar la extracción durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación frecuente del frasco. Relativamente poco del residuo es soluble en alcohol, estando las masas lípidas distribuidas en la mezcla.

e. La mezcla se coloca en el refrigerador (4° a 9°C .) durante 3 horas.

f. Se filtra la mezcla mientras está fría y el frasco conteniendo el filtrado claro se coloca en el incubador a 37°C . durante 24 horas.

g. El filtrado claro deberá quedar en reposo durante 3 días a la temperatura ambiente. Si se forma un precipitado durante este período, la solución habrá de ser filtrada nuevamente.

h. El filtrado se colesteroaliza con 6 mg. de colesterol por ml., de acuerdo con la técnica habitual.

i. El extracto colesteroalizado, conocido como reactivo sensibilizante, se filtra y queda listo para el uso. Deberá ser guardado en la obscuridad a la temperatura ambiente.

3. La corrección de los antígenos más sensibles que el estándar puede ser llevada a cabo

a. *Mezclando el antígeno hipersensible con un antígeno hiposensible.*

(1) Añádanse cantidades iguales de antígeno hipersensible e hiposensible (por ejemplo, 10 ml. de cada uno) en un pequeño frasco y mézclese bien.

(2) Efectúese la titulación (de acuerdo con "Determinación del Título" págs. 39-40).

(3) Practíquense los análisis comparativos preliminares usando los títulos obtenidos y un antígeno estándar como control.

(4) Si los resultados son comparables, puede efectuarse la comprobación final (pág. 41).

(5) Si la reactividad del antígeno no es comparable a la del antígeno estándar, pruébense diferentes proporciones de ambos antígenos.

(6) La revisión final (pág. 41) deberá ser hecha después que el lote completo del antígeno haya sido corregido.

b. *Por la adición de "solución correctiva de lecitina" al antígeno.³*

Manera de preparar la solución correctiva madre de lecitina, a partir de la ovolectina.

(1) Agréguese 5 gm. de ovolectina comercial a 100 ml. de alcohol absoluto colesteroalizado al 0,6 por ciento.

(2) Extrágase durante 1 hora al baño de María a 56°C .

³ Este método, recomendado por el Dr. Kahn, para la corrección del antígeno no ha sido empleado en el Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas.

(3) Enfríese y fíltrese la solución clara.

(a) Agréguese una cantidad determinada, por ejemplo 0,2 ml. de la solución madre de lecitina a 10 ml. del antígeno hiperreactivo.

(b) Títúlese el antígeno (de acuerdo con la "Determinación del Título", págs. 39-40).

(c) Pruébese este antígeno con 10 sueros que sean en su mayoría conocidos como productores de reacciones Débilmente Reactivas, empleando antígeno estándar como control.

(d) Si el antígeno modificado da resultados comparables a los obtenidos con el antígeno estándar, la cantidad total del antígeno hiperreactivo puede ser ajustada y sometida a la revisión final (pág. 41).

c. *Por dilución con alcohol colesteroilizado.*

Véase "Corrección del antígeno menos reactivo que el estándar," sección 4a. más abajo. La técnica descrita es también aplicable a la corrección del antígeno más reactivo que el estándar.

4. Se puede realizar la corrección de antígenos menos reactivos que el antígeno estándar.

a. *Por dilución de antígeno con alcohol colesteroilizado.*

(1) En un frasco de $\frac{1}{2}$ onza colóquense 10 ml. del antígeno menos reactivo (colesterolizado al 0,6 por ciento) y 1 ml. del alcohol colesteroilizado al 0,6 por ciento. En otro frasco de $\frac{1}{2}$ onza mézclense 10 ml. de antígeno colesteroilizado al 0,6 por ciento y 2 ml. de alcohol colesteroilizado al 0,6 por ciento, obteniéndose así diluciones al 10 y al 20 por ciento, respectivamente.

(2) Practíquese la titulación de esos dos antígenos (de conformidad con "Determinación del Título", págs. 39-40).

(3) Efectúense análisis comparativos con sueros Débilmente Reactivos, usando antígeno estándar simultáneamente como control.

(4) Si ninguna de las diluciones con alcohol colesteroilizado al 10 % o al 20 por ciento lleva el antígeno a la reactividad estándar, inténtese otras diluciones que no excedan del 30 %.

b. *Por la adición al antígeno de reactivo sensibilizante.*

Algunos antígenos poco reactivos pueden ser llevados al nivel estándar de reactividad por la adición de una pequeña cantidad de reactivo sensibilizante, por ej. 0,2 a 0,7 %. En ciertos casos es necesario agregar reactivo sensibilizante además de la dilución con alcohol colesteroilizado.

c. *Mezclando antígeno menos reactivo con uno de mayor reactividad.*

Este método es esencialmente el mismo descrito en la sección 3a.

(pág. 43) para la corrección de un antígeno más reactivo por mezcla con uno menos reactivo.

Notas sobre Características de Titulación de Diferentes Antígenos Estándar de Kahn y su Importancia en los Resultados Serológicos

Hay dos características básicas de titulación de los antígenos estándar de Kahn. Los antígenos pueden mostrar títulos "en declive" o títulos "planos."

1. Antígenos que muestran títulos "en declive".

Estos antígenos muestran imágenes de titulación de claridad creciente con el aumento de las cantidades de solución salina empleadas en la preparación de las suspensiones de antígeno. La tabulación siguiente muestra una imagen de titulación "en declive".

Titulación de antígeno "en declive"

<i>Antígeno + solución salina al 0,9% (ml.)</i>	<i>Resultados de la titulación</i>
1 + 0,9.....	Nebuloso; conglomerados.
1 + 1,1.....	Ligeramente nebuloso; conglomerados pequeños.
1 + 1,3.....	Opalescente (título); no hay conglomerados, opalescencia estándar.
1 + 1,5.....	Un poco más claro que lo debido; no hay conglomerados.
1 + 1,7.....	Demasiado claro; no hay conglomerados.
1 + 1,9.....	Claro como el agua; no hay conglomerados.

2. Antígenos que muestran títulos "planos."

Estos antígenos muestran imágenes de titulación de claridad constante, a pesar del aumento en las cantidades de solución salina empleadas en la preparación de las suspensiones de antígeno. La siguiente tabulación muestra una imagen de titulación "plana."

Titulación de antígeno "plana"

<i>Antígeno + solución salina al 0,9% (ml.)</i>	<i>Resultados de la titulación</i>
1 + 0,9.....	Nebuloso; conglomerados.
1 + 1,1.....	Ligeramente nebuloso; conglomerados pequeños.
1 + 1,3.....	Vestigios de nebulosidad; conglomerados dudosos.
1 + 1,5.....	Opalescente (título); opalescencia estándar.
1 + 1,7.....	Opalescente (igual); no hay conglomerados.
1 + 1,9.....	Opalescente (igual); no hay conglomerados.

Los antígenos que tienen títulos "en declive" son los más convenientes para la prueba estándar de Kahn. Algunos antígenos que muestran una titulación "plana" antes de la estandarización pueden mostrar después de ella

una titulación "en declive". Los antígenos que continúan mostrando una titulación plana después de ser estandarizados resultan seguros en su uso, siempre que no comiencen a mostrar una titulación en declive "inversa", es decir, una mayor nebulosidad si se aumenta la cantidad de solución salina agregada al antígeno.

Referencias Bibliográficas

- (1) KAHN, R. L.: Technique of Standard Kahn Test and of Special Kahn Procedures. Rev. and enl. ed. University of Michigan Press, junio 1945.
- (2) KAHN, R. L.: Serology with Lipid Antigens. Williams & Wilkins, Baltimore, 1950.

Reacciones de Kline

Antes de realizar esta reacción, el técnico debe estar familiarizado con el contenido de los capítulos Informaciones Generales y Equipo General.

Equipo

1. Máquina rotatoria, adaptable a 180 r.p.m., que circunscribe un círculo de $\frac{3}{4}$ de pulgada de diámetro en un plano horizontal.
2. Dispositivos para hacer anillos de parafina de 14 mm. de diámetro aproximadamente.
3. Juego de moldes¹ para reacciones con líquido céfalorraquídeo, consistente en un molde de acero ($3\frac{1}{8} \times 2\frac{3}{16} \times \frac{1}{8}$ de pulgada, con dos receptáculos de $1\frac{9}{16}$ de pulgada de diámetro) y dos discos de metal ($1\frac{5}{16}$ de pulgada de diámetro $\times \frac{3}{16}$ de pulgada de espesor) con tornillos en el centro.
4. Soportes para láminas de 2 x 3 pulgadas.
5. Agujas hipodérmicas, calibre 22 y 26, con bisel limado.

Cristalería

1. Pipetas de 0,2 ml., graduadas en $\frac{1}{100}$ ml. hasta la punta.
2. Tubos de centrifuga, fondo redondo, 3 x 1 pulgada.
3. Frascos redondos, de 30 ml. de capacidad, con tapones de cristal.
4. Láminas de vidrio² de 3 x 2 pulgadas, lisas, para anillos de parafina.
5. Jeringas de vidrio, hipodérmicas, de 1,0 ó 2,0 ml. de capacidad.

Reactivos

1. Antígeno

El antígeno¹ para la prueba estándar de Kline se compone de cardioli-pina (0,2 por ciento) y lecitina purificada (1,6 a 2,6 por ciento) en alcohol absoluto. Este reactivo deberá prepararse con componentes químicos estandarizados y ajustarse serológicamente por comparación con un antígeno de reactividad estándar. Será mantenido en el refrigerador a temperatura de 6° a 10°C.

¹ La Motte Chemical Products Co., Towson 4, Md.

² El Dr. B. S. Kline ha rehusado la aprobación de algunas láminas de vidrio cóncavas y ha aprobado otras de la misma procedencia comercial. En el Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas no se usan las láminas de cristal cóncavas para las reacciones de Kline.

2. Solución de colesterol

Disuélvase 1,0 gramo de colesterol (Pfanstiehl, exento de cenizas, precipitado por alcohol) en 100 ml. de alcohol absoluto y guárdese en frascos con tapón de cristal a la temperatura ambiente (23° a 29°C.).

3. Agua destilada

El agua destilada apropiada para las reacciones de Kline deberá tener un mínimo de iones positivos u otros electrólitos y el pH será de 6,0 aproximadamente.

4. Solución de cloruro de sodio (0,85 por ciento)

Añádase la cantidad necesaria de cloruro de sodio (850 mg.) seco y de calidad purísima (A.C.S.) a 100 ml. de agua destilada. Esta solución deberá prepararse de preferencia el día que se vaya a usar. Puede conservarse en estado satisfactorio hasta durante una semana, si se mantiene en un frasco limpio con tapón de cristal.

REACCIONES DE KLINE CON SUERO

Preparación de los Sueros

1. Sepárense los sueros de los coágulos por centrifugación y extracción con pipeta o decantación.

2. Calíentense los sueros en el baño de María a 56°C. durante 30 minutos. Cuando sea necesario repetir el examen en días posteriores, el suero deberá ser recalentado a 56°C. durante 5 minutos.

3. Vuélvase a centrifugar cualquier suero al cual se le hayan formado partículas visibles durante el calentamiento.

Preparación de las Láminas con Anillos de Parafina

1. Límpiense las láminas de vidrio de 3 x 2 pulgadas con jabón Bon Ami.

2. Por medio de una máquina de mano o eléctrica para hacer anillos de parafina colóquense 12 anillos (14 mm. de diámetro) en cada lámina. Se puede usar parafina o una mezcla de dos partes de parafina y una parte de vaselina, calentada a 120°C. Se tendrá cuidado de que los anillos sean del diámetro prescrito.

Preparación de la Emulsión de Antígeno

1. Deposítese 0,85 ml. de agua destilada en el fondo de un frasco de 30 ml. de capacidad con tapón de cristal.

2. Añádase 1,0 ml. de la solución de colesterol al 1 por ciento, dejando gotear muy despacio desde una pipeta la solución de colesterol, mientras que con la otra mano se le da un movimiento giratorio vigoroso al frasco, que es sostenido en ángulo sobre una superficie plana.

3. Continúese la rotación del frasco durante 20 segundos más.
4. Añádase con una pipeta de 0,2 ml. 0,1 ml. de antígeno, dejándolo escurrir contra un lado del cuello del frasco, pero evitando la parte de vidrio deslustrado.
5. Tápese el frasco y agítese vigorosamente durante 1 minuto, lanzando el líquido de abajo hacia arriba y viceversa.
6. Añádanse rápidamente 2,45 ml. de la solución de cloruro de sodio al 0,85 por ciento y agítese con menos fuerza durante 30 segundos.

La emulsión está ahora lista para usarse y, si se coloca en el refrigerador, se podrá utilizar durante 48 horas. Puede prepararse doble cantidad de emulsión de antígeno en los mismos frascos de 30 ml.

Reacciones Preliminares con Suero

1. Revítese el rendimiento de la aguja hipodérmica (calibre 22 ajustada a una jeringa de vidrio) y háganse los ajustes necesarios de manera que se obtengan aproximadamente 125 gotas (0,008 ml. por gota) por cada mililitro de emulsión de antígeno.
2. Termínense las pruebas usando controles de suero de reactividad escalonada en la forma descrita bajo "Reacción Cualitativa Estándar de Kline con Suero."
3. Las reacciones con suero de control deben reproducir el patrón de reactividad. El suero No Reactivo debe mostrar completa dispersión de las partículas de antígeno con un número óptimo de ellas por campo microscópico.

Reacción Cualitativa Estándar de Kline con Suero

1. Depósitese 0,05 ml. del suero calentado dentro de un anillo parafinado de la lámina de vidrio.
2. Añádase una gota (0,008 ml.) de la emulsión de antígeno a cada suero.
3. Imprímase un movimiento de rotación a las láminas, en una máquina rotatoria a 180 r.p.m., durante 4 minutos.

Nota: Cuando las pruebas son ejecutadas en un clima caliente y seco, se pueden cubrir las láminas con la tapa de una placa que contenga un secante húmedo para evitar el exceso de evaporación durante la rotación.

4. Examínense las reacciones al microscopio usando un aumento de 100 X.
5. Infórmense de la siguiente manera los resultados observados:

a. Reacciones típicas

No Reactiva.....	Partículas de antígeno dispersas, no hay grumos.
Débilmente Reactiva (\pm ó 1+)	Partículas de antígeno en grumos pequeños, bien definidos.
Reactiva (2+, 3+, ó 4+).....	Partículas de antígeno en grumos medianos o grandes.

b. Reacciones atípicas

Las reacciones atípicas se caracterizan por grumos irregulares y plumosos predominantemente de tamaño pequeño. En los sueros que den reacciones atípicas se deberán repetir las pruebas en diluciones desde 1:2 hasta 1:64, como se describe en "Reacción Cuantitativa Estándar de Kline con Suero". El resultado se informará Reactivo si se obtiene una prueba Reactiva con una o más diluciones del suero.

Reacción Cuantitativa Estándar de Kline con Suero

1. Añádase 0,5 ml. de la solución de cloruro de sodio a cada uno de 6 ó más tubos.
2. Agréguese 0,5 ml. del suero calentado al primer tubo y mézclese.
3. Pásese 0,5 ml. del primer tubo al segundo y mézclese.
4. Continúese pasando 0,5 ml. de cada tubo al siguiente, y mezclando, hasta que el último tubo contenga 1,0 ml.
5. Colóquese con pipeta 0,05 ml. de suero no diluido y de cada dilución de suero en diferentes anillos parafinados de la lámina de vidrio.
6. Añádase una gota de la emulsión de antígeno (0,008) a cada dilución del suero.
7. Imprímase movimiento de rotación a la lámina a razón de 180 r.p.m., durante 4 minutos.
8. Léanse y anótense las reacciones como se describe en "Reacción Cualitativa Estándar de Kline con Suero" (pág. 49).
9. Infórmense los resultados en términos de la más alta dilución que produce un resultado Reactivo (2+, 3+, ó 4+).

Ejemplo:

Suero no diluido	Diluciones del suero							Informe
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
4	4	3	1	—	—	—	Reactivo: dilución al 1:4 ó 4 dils.	
4	4	4	4	2	—	—	Reactivo: dilución al 1:16 ó 16 dils.	
4	4	4	4	4	2	—	Reactivo: dilución al 1:32 ó 32 dils.	

REACCIONES DE KLINE CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

Preparación del Líquido Cefalorraquídeo

1. Centrifúguese el líquido cefalorraquídeo a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos y elimínese el líquido sobrenadante por decantación. Los líquidos cefalorraquídeos contaminados o que contienen sangre no son satisfactorios para el análisis.

2. Analícese cada líquido céfalorraquídeo para investigar la presencia de glucosa.

a. Pónganse 5 ml. de solución Benedict en un tubo de ensayo.

b. Colóquese el tubo de ensayo en agua hirviendo durante 5 minutos.

c. Sáquese el tubo del baño. No debe presentarse reducción del cobre durante este período de calentamiento.

d. Añádase 0,5 ml. de líquido céfalorraquídeo. Agítese el tubo para mezclar su contenido.

e. Llévase nuevamente al agua hirviendo durante 5 minutos.

f. Sáquese el tubo del baño y examínese en busca de precipitado que indique la presencia de glucosa. Los líquidos céfalorraquídeos que dan reacción negativa para la glucosa no son satisfactorios para el examen.

3. Colóquense los líquidos céfalorraquídeos en baño de María a 56°C. durante 5 minutos inmediatamente antes de su análisis.

Preparación de las Láminas con Anillo Doble

1. Límpiense las láminas de vidrio de 3 x 2 pulgadas, usando Bon Ami.

2. Colóquese un molde de acero y dos discos centrales sobre la lámina.

3. Llénense los espacios entre los discos y el molde externo con la mezcla de parafina caliente (1 parte de parafina y 2 partes de vaselina).

4. Remuévanse el molde y los discos de la lámina después que la parafina se haya enfriado. Los discos pueden ser aflojados haciendo girar el tornillo central hacia la derecha. El molde se quita insertando la hoja de un cuchillo entre la lámina y el molde.

Preparación de la Emulsión de Antígeno

1. Deposítese con pipeta 0,6 ml. de solución de colesterol al 1% en el fondo de un tubo de ensayo de fondo redondo, de 3 x 1 pulgada.

2. Añádase rápidamente 0,4 ml. de agua destilada, quitando el dedo de la pipeta y soplando hasta la última gota, mientras se imprime un movimiento de rotación vigoroso al tubo sobre una superficie plana.

3. Continúese la rotación del tubo durante 10 segundos más.

4. Agréguese 0,1 ml. de antígeno y hágase rotar el tubo vigorosamente durante 1 minuto.

5. Añádase 1,4 ml. de solución de cloruro de sodio al 0,85 por ciento e imprímase un movimiento de rotación al tubo, sobre una superficie plana, durante 30 segundos.

6. Centrifúguese el tubo con la emulsión de antígeno a 1.100 r.p.m. durante 5 minutos.

Nota: Se necesitará experimentar para determinar el tiempo y la velocidad de centrifugación necesarios para obtener un sedimento con el número óptimo de partículas. El sedimento estará formado por una cantidad tal que, cuando sea nuevamente suspendido en 0,6 ml. de solución salina, una gota (0,008 ml.) de la emulsión en 0,3 ml. de líquido céfalorraquídeo contenga el número óptimo de partículas de antígeno por campo microscópico.

7. Decántese el líquido turbio sobrenadante.
8. Añádase 0,6 ml. de solución de cloruro de sodio al 0,85 por ciento al sedimento e imprímase un movimiento de rotación vigoroso al tubo, durante 30 segundos, para suspender uniformemente las partículas de antígeno.
9. Pásese la emulsión de antígeno a un tubo de 13 x 100 mm. con tapón. Si se guarda esta emulsión en el refrigerador, puede usarse durante 48 horas después de preparada.

Reacciones Preliminares con Líquido Céfalorraquídeo

1. Compruébese el rendimiento de la aguja hipodérmica (calibre 26, conectada a una jeringa de vidrio). Deberán hacerse ajustes a fin de obtener aproximadamente 125 gotas (0,008 ml. por gota) por cada mililitro de emulsión de antígeno.
2. Complétense los análisis con controles de líquidos céfalorraquídeos Reactivos y No Reactivos en la forma descrita en "Reacción Cualitativa Estándar de Kline con Líquido Céfalorraquídeo."
3. En el líquido céfalorraquídeo Reactivo se observarán grumos de partículas de antígeno. Los controles de líquido céfalorraquídeo No Reactivo deberán mostrar dispersión completa de las partículas de antígeno y el número óptimo de ellas por campo microscópico.

Reacción Cualitativa Estándar de Kline con Líquido Céfalorraquídeo

1. Colóquese el número necesario de láminas con anillo doble en un soporte, mientras se calientan los líquidos céfalorraquídeos.
2. Depósitese 0,3 ml. de líquido céfalorraquídeo caliente en una cámara anillada. Se incluirán controles de líquido céfalorraquídeo Reactivo y No Reactivo.
3. Añádase una gota (0,008 ml.) de emulsión de antígeno al líquido céfalorraquídeo de cada cámara.
4. Háganse rotar las láminas con fuerza moderada sobre una superficie plana, durante 30 segundos, para distribuir la emulsión de antígeno.
5. Muévase el soporte de la lámina hacia adelante y hacia atrás rápidamente (aproximadamente 3 movimientos completos por segundo) en una distancia lineal de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ pulgada, durante 8 minutos.

6. Examínense las reacciones al microscopio con 100X de aumento e infórmense los resultados observados de acuerdo con la descripción que sigue. La lámina puede ser inclinada para facilitar la lectura.

- No Reactivo.....Partículas de antígeno dispersas; no hay grumos.
Débilmente Reactivo (\pm ó 1+)...Partículas de antígeno en pequeños grumos bien definidos.
Reactivo (2+, 3+, ó 4+).....Partículas de antígeno en grumos de tamaño mediano o grande.

Reacción Cuantitativa Estándar de Kline con Líquido Céfalorraquídeo

1. Prepárense diluciones de líquido céfalorraquídeo al 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc., usando líquido céfalorraquídeo No Reactivo o solución salina al 0,9% como diluyente.
2. Analícese el líquido céfalorraquídeo no diluido y cada dilución de él, en la forma descrita en "Reacción Cualitativa de Kline con Líquido Céfalorraquídeo."
3. Infórmense los resultados en términos de la mayor dilución que produce resultado Reactivo (2+, 3+, ó 4+), en la forma descrita en "Reacción Cuantitativa de Kline con Suero" (pág. 50).

4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Reacciones de Kolmer

Antes de realizar esta reacción, el técnico debe estar familiarizado con el contenido de los capítulos Informaciones Generales y Equipo General.

Equipo

1. Gradillas para tubos de ensayo, de alambre galvanizado, para 72 tubos.

Cristalería

1. Tubos de ensayo, Pyrex, con diámetro exterior de 15 x 85 mm.
2. Tubos Pyrex para centrifuga, graduados, de 15 ml. de capacidad.
3. Tubos para centrifuga, fondo redondo, de 50 ml. de capacidad.

Reactivos

I. Antígeno

El antígeno para las reacciones de Kolmer consiste en una solución alcohólica que contiene 0,03 por ciento de cardiolipina, 0,05 por ciento de lecitina, y 0,3 por ciento de colesterol. Cada nuevo lote de antígeno se debe ensayar en comparación con un antígeno estándar, tanto en las pruebas cualitativas como en las cuantitativas de sueros Reactivo, Débilmente Reactivo y No Reactivo, antes de usarlo en forma rutinaria.

2. Solución salina

a. Pénsese 8,5 gm. de cloruro de sodio desecado (A.C.S.) y 0,1 gm. de sulfato de magnesia por cada litro de solución salina.¹

b. Disuélvanse las sales en agua destilada y filtrese en los frascos, que estarán provistos de tapones de vidrio o de algodón cubierto de gasa. Las pruebas se deben hacer con solución salina recién preparada.

c. Colóquese en el refrigerador una cantidad de solución salina suficiente para diluir el complemento que va a ser usado en las reacciones y déjese reposar el resto a la temperatura ambiente (23° a 29°C.).

3. Glóbulos rojos de carnero. (Véase "Recolección y Preservación de Sangre de Carnero", *Apéndice*, p. 101.)

La sangre de carnero recientemente recolectada deberá ser refrigerada durante 48 horas antes de su uso.

¹ Cuando se obtienen títulos del complemento excepcionalmente bajos, el Dr. Kolmer recomienda que se agreguen 40 mg. de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a cada litro de solución salina. En esas circunstancias no se debe usar el complemento a una dilución mayor de 1:37 (para 2 unidades completas).

4. Hemolisina. (Véase "Preparación de la Hemolisina", *Apéndice*, págs. 104-106.)

5. Complemento. (Véase "Preparación y Conservación del Complemento", *Apéndice*, págs. 106-107).

a. Cuando se acostumbra en el laboratorio sangrar a los cobayos el día anterior a aquel en que se practican las reacciones de fijación del complemento, puede obtenerse el suero de cobayo exento de glóbulos centrifugando los tubos con sangre y decantando el suero de los coágulos. Los sueros de tres cobayos o más deberán ser mezclados y llevados al refrigerador.

b. El suero-complemento deshidratado se restituirá a su *volumen original* disolviéndolo en la cantidad prescrita de solución tope o de agua destilada y se conservará en el refrigerador.

c. El suero-complemento guardado en estado de congelación deberá ser llevado al estado líquido dejándolo a temperatura ambiente o a 37°C. sólo durante el tiempo necesario para su fusión. Como el contenido de proteína de estos sueros tiende a depositarse en el fondo del tubo durante la descongelación, estos tubos de suero se mezclarán adecuadamente por inversión y serán llevados de nuevo al refrigerador (6° a 10°C.).

Preparación de los Sueros

1. Sepárense los sueros de los coágulos sanguíneos por centrifugación y extracción con pipeta o decantación.

2. Caliéntese el suero a 56°C. durante 30 minutos. Los sueros previamente calentados deberán ser recalentados durante 5 minutos a 56°C. el día del análisis.

3. Vuélvase a centrifugar cualquier suero al que se le hayan formado partículas visibles durante el calentamiento.

Nota: Si se desea obtener reacciones de fijación del complemento de sensibilidad máxima en la prueba cuantitativa de Kolmer, será necesario eliminar las hemolisinas naturales anticarnero de los sueros. Se puede lograr esto en la siguiente forma:

a. Deposítense 1 ml. de cada suero en un tubo pequeño (12 x 75 mm.) y colóqueselo en el refrigerador durante 15 minutos o más.

b. Añádase una gota de glóbulos rojos de carnero, lavados y concentrados, a cada suero y mézclese bien.

c. Llévense de nuevo todos los tubos al refrigerador durante 15 minutos.

d. Centrifúguense todos los tubos y sepárense los sueros por decantación. Evítese arrastrar el residuo celular de las paredes y del fondo de los tubos.

e. Estos sueros se calentarán a 56°C. durante 30 minutos. Los sueros absorbidos, previamente calentados, deberán ser recalentados durante 5 minutos.

Preparación del Líquido Céfalorraquídeo

1. Centrifúguense y decántense todos los líquidos céfalorraquídeos para eliminar los restos celulares y partículas. Los líquidos céfalorraquídeos visiblemente contaminados o que contienen sangre a simple vista deben desecharse.
2. Calientense todos los líquidos céfalorraquídeos recibidos por correo, o almacenados durante tres días o más, a 56°C. durante 15 minutos para eliminar las substancias anticomplementarias termolábiles.
3. Los líquidos céfalorraquídeos recientemente extraídos se analizarán sin calentamiento preliminar.

Preparación de la Suspensión de Glóbulos Rojos de Carnero

1. Filtrese, a través de una gasa, una cantidad adecuada de sangre de carnero preservada, recojiéndola en un tubo de centrifuga de fondo redondo, de 50 ml. de capacidad.
2. Añádase a cada tubo dos o tres volúmenes de solución salina.
3. Centrifúguense los tubos con fuerza suficiente para sedimentar los corpúsculos en 5 minutos (centrífuga I.E.C.² N° 1 a 2.000 r.p.m., centrífuga I.E.C. N° 2 a 7.000 r.p.m.).
4. Sepárese el líquido sobrenadante por succión a través de una pipeta capilar, quitando la capa superior de glóbulos blancos.
5. Llénese el tubo con solución salina y resuspéndanse los glóbulos por inversión y agitación suave.
6. Vuélvase a centrifugar los tubos y repítase este procedimiento hasta efectuar tres lavados. Si al tercer lavado el líquido sobrenadante no es incoloro, los glóbulos son demasiado frágiles y no deberán usarse.
7. Después de separar el líquido sobrenadante del tercer lavado, los glóbulos se vierten o arrastran a tubos de centrifuga, graduados, de 15 ml. y se centrifugan a la misma velocidad usada antes, durante 10 minutos, con el objeto de sedimentar las células firme y uniformemente.
8. Léase el volumen de glóbulos sedimentados en el tubo de centrifuga y sepárese con cuidado el líquido sobrenadante.
9. Prepárese una suspensión de glóbulos de carnero al 2%, traspasando los corpúsculos a un frasco con 49 volúmenes de solución salina. Agítese el frasco para asegurar una suspensión uniforme de los glóbulos.

² International Equipment Co., Boston, Mass.

Ejemplo:

2,1 ml. (glóbulos sedimentados) \times 49 = 102,9 ml. (solución salina necesaria).

10. Colóquese 15 ml. de la suspensión de glóbulos al 2% en un tubo de centrifuga graduado y centrifúguese a la velocidad antes usada durante 10 minutos. Una parte alícuota de 15 ml. de suspensión de glóbulos, preparada en forma adecuada, producirá 0,3 ml. \pm 0,01 ml. de corpúsculos sedimentados.

Advertencia: Usense solamente tubos de centrifuga cuya calibración haya sido comprobada en cuanto a las zonas de volumen de 15 ml. y de glóbulos sedimentados.

Nota: Cuando el volumen de glóbulos sedimentados queda fuera de los límites tolerables arriba establecidos, la concentración de la suspensión de glóbulos deberá ser modificada. La cantidad de solución salina que hay que eliminar o añadir a la suspensión para hacer el ajuste se determina de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Lectura obtenida en el tubo de centrifuga}}{\text{Lectura correcta en el tubo de centrifuga}} \times \text{Volumen de suspensión de glóbulos} \\ = \text{Volumen corregido de la suspensión de glóbulos}$$

Ejemplo 1:

Volumen de la suspensión de glóbulos..... 100 ml.
Lectura obtenida en el tubo de centrifuga (15 ml.)..... 0,27 ml.

$$\frac{0,27 \text{ ml.}}{0,3 \text{ ml.}} \times 100 \text{ ml.} = 90 \text{ ml.}$$

Por lo tanto, se eliminarán 10 ml. de solución salina de cada 100 ml. de suspensión de glóbulos. La solución salina puede ser separada centrifugando una parte alícuota de la suspensión de glóbulos y sacando con una pipeta el volumen deseado de solución que debe ser descartado.

Ejemplo 2:

Volumen de la suspensión de glóbulos..... 100 ml.
Lectura obtenida en el tubo de centrifuga (15 ml.)..... 0,33 ml.

$$\frac{0,33 \text{ ml.}}{0,3 \text{ ml.}} \times 100 \text{ ml.} = 110 \text{ ml.}$$

Por lo tanto, deberán añadirse 10 ml. de solución salina para cada 100 ml. de suspensión de glóbulos. Una suspensión de glóbulos ajustada deberá ser revisada de nuevo centrifugando una porción de 15 ml.

11. Colóquese el frasco con la suspensión de glóbulos en el refrigerador cuando no esté en uso. Agítese siempre antes de usarlo para asegurar una suspensión uniforme, ya que los corpúsculos se sedimentan en el fondo del frasco cuando son dejados en reposo.

Preparación de la Dilución del Antígeno

1. Colóquese la cantidad requerida de solución salina en un frasco y añádase el antígeno gota a gota mientras se agita el frasco continuamente. Se puede calcular la cantidad necesaria teniendo en cuenta el número de tubos que llevarán antígeno en el análisis y en las titulaciones. La cantidad para el análisis la constituye 0,5 ml. de la dilución de antígeno indicado en la etiqueta del frasco, que usualmente es de 1:150.
2. La dilución de antígeno se conserva en un frasco tapado a la temperatura ambiente.
3. El antígeno diluido debe mantenerse a la temperatura ambiente por lo menos 1 hora antes de usarlo.

Preparación de la Dilución Madre de Hemolisina

1. Prepárese la dilución madre de hemolisina al 1:100 en la siguiente forma:

	<i>ml.</i>
Solución salina.....	94,0
Fenol (al 5% en solución salina).....	4,0
Hemolisina glicerinada (50%).....	2,0

La solución de fenol se mezclará perfectamente con la solución salina antes de añadir la hemolisina glicerinada. Esta solución se conserva bien a la temperatura del refrigerador, pero deberá ser desechada cuando contenga precipitados.

2. Cada nuevo lote de dilución madre de hemolisina (1:100) debe ser verificado por titulación paralela con la anterior dilución madre de hemolisina antes de adoptarla para uso ordinario.
3. Las diluciones de hemolisina al 1:1.000 ó mayores son preparadas diluyendo partes alcuotas de la solución al 1:100.

Después de preparados estos reactivos se puede pensar en efectuar las titulaciones del complemento y de la hemolisina.

Titulaciones del Complemento y de la Hemolisina

1. Practíquense simultáneamente estas dos titulaciones en la misma gradilla.
2. Colóquense 10 tubos (numerados del 1 al 10) en un lado de la gradilla para la titulación de la hemolisina y 8 tubos (numerados del 1 al 8) en el otro lado para la titulación del complemento. Añádanse 2 tubos más a la gradilla, uno para la solución de hemolisina al 1:1.000 y el otro para la dilución del complemento al 1:30.
3. Prepárese una dilución de hemolisina al 1:1.000 colocando 4,5 ml. de solución salina en un tubo de ensayo y añadiendo 0,5 ml. de solución madre de hemolisina al 1:100. Mézclese bien.

4. Colóquese 0,5 ml. de solución de hemolisina al 1:1.000 en los 5 primeros tubos de la titulación de la hemolisina.

5. Añádanse las siguientes cantidades de solución salina a los tubos de titulación de hemolisina:

	Tubo Núm.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solución salina	Ninguna	0,5 <i>ml.</i>	1,0 <i>ml.</i>	1,5 <i>ml.</i>	2,0 <i>ml.</i>	0,5 <i>ml.</i>	0,5 <i>ml.</i>	0,5 <i>ml.</i>	0,5 <i>ml.</i>	0,5 <i>ml.</i>

6. Procédase en la siguiente forma:

Tubo Núm.	Procedimiento	Dilución final de hemolisina
1	Ninguno	1:1.000
2	Mézclese. Deséchese 0,5 ml.	1:2.000
3	Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 6. Deséchese 0,5 ml.	1:3.000
4	Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 7. Deséchese 1,0 ml.	1:4.000
5	Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 8. Deséchese 1,5 ml.	1:5.000
6	Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 9.	1:6.000
7	Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 10.	1:8.000
8	Mézclese. Deséchese 0,5 ml.	1:10.000
9	Mézclese. Deséchese 0,5 ml.	1:12.000
10	Mézclese. Deséchese 0,5 ml.	1:16.000

7. Prepárese una dilución del complemento al 1:30 añadiendo 0,2 ml. de suero de cobayo a 5,8 ml. de solución salina. Mézclese bien.

8. Colóquese 0,3 ml. del complemento al 1:30 en cada uno de los 10 tubos de la titulación de hemolisina.

9. Añádanse las siguientes cantidades del complemento al 1:30 a los tubos de titulación del complemento.

	Tubo Núm.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Complemento al 1:30	0,2 <i>ml.</i>	0,25 <i>ml.</i>	0,3 <i>ml.</i>	0,35 <i>ml.</i>	0,4 <i>ml.</i>	0,45 <i>ml.</i>	0,5 <i>ml.</i>	0,0

10. Agréguese 0,5 ml. de dilución de antígeno a cada uno de los primeros 7 tubos de la titulación del complemento.

11. Añádase 1,7 ml. de solución salina a cada uno de los 10 tubos de la titulación de hemolisina.

12. Agréguese las siguientes cantidades de solución salina a los tubos de titulación del complemento.

	Tubo Núm.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución salina	1,3 <i>ml.</i>	1,3 <i>ml.</i>	1,2 <i>ml.</i>	1,2 <i>ml.</i>	1,1 <i>ml.</i>	1,1 <i>ml.</i>	1,0 <i>ml.</i>	2,5 <i>ml.</i>

13. Añádase 0,5 ml. de suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2% a cada tubo de titulación de hemolisina.

14. Agítese cada tubo de titulación de hemolisina para asegurar una distribución uniforme de los glóbulos y colóquese la gradilla que contiene las dos titulaciones en el baño de María a 37°C. durante 1 hora.

En este momento la titulación del complemento y la titulación completa de la hemolisina están en la forma que puede verse en los cuadros 1 y 2.

Cuadro 1. Titulación del complemento (primer período)

Tubo Núm.	Complemento al 1:30	Dilución de antígeno	Solución salina
	(<i>ml.</i>)	(<i>ml.</i>)	(<i>ml.</i>)
1	0,2	0,5	1,3
2	0,25	0,5	1,3
3	0,3	0,5	1,2
4	0,35	0,5	1,2
5	0,4	0,5	1,1
6	0,45	0,5	1,1
7	0,5	0,5	1,0
8	0	0	2,5

Cuadro 2. Titulación de la hemolisina (completa)

Tubo Núm.	Dilución de hemolisina (0,5 ml.)	Complemento al 1:30	Solución salina	Suspensión de glóbulos de carnero (2%)
		(<i>ml.</i>)	(<i>ml.</i>)	(<i>ml.</i>)
1	1:1.000	0,3	1,7	0,5
2	1:2.000	0,3	1,7	0,5
3	1:3.000	0,3	1,7	0,5
4	1:4.000	0,3	1,7	0,5
5	1:5.000	0,3	1,7	0,5
6	1:6.000	0,3	1,7	0,5
7	1:8.000	0,3	1,7	0,5
8	1:10.000	0,3	1,7	0,5
9	1:12.000	0,3	1,7	0,5
10	1:16.000	0,3	1,7	0,5

15. Sáquese la gradilla del baño de María y léase la titulación de la hemolisina.

La unidad de hemolisina es la mayor dilución que da una hemólisis brillante completa.

La hemolisina para la titulación del complemento y la reacción propiamente dicha se diluye de modo que 2 unidades estén contenidas en 0,5 ml.

16. Prepárese una cantidad de hemolisina diluida, conteniendo 2 unidades por 0,5 ml., suficiente para la titulación del complemento de acuerdo con la siguiente descripción en el cuadro 3.

Cuadro 3

Dilución conteniendo 1 unidad por 0,5 ml.	Dilución conteniendo 2 unidades por 0,5 ml.	Para preparar dilución con 2 unidades de hemolisina, mézclase	
		Solución de hemolisina 1:100	Solución salina
		(ml.)	(ml.)
1:4.000	1:2.000	0,3	5,7
1:5.000	1:2.500	0,2	4,8
1:6.000	1:3.000	0,2	5,8
1:8.000	1:4.000	0,15	5,85
1:10.000	1:5.000	0,1	4,9
1:12.000	1:6.000	0,1	5,9
1:16.000	1:8.000	0,1	7,9

17. Añádase 0,5 ml. de hemolisina diluida (conteniendo 2 unidades de hemolisina) a cada uno de los primeros 7 tubos de la titulación del complemento.

18. Agréguese 0,5 ml. de suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2% a cada uno de los 8 tubos de la titulación del complemento. La adición de hemolisina y de glóbulos a la titulación del complemento deberá ser completada sin retraso, de preferencia dentro de los 5 minutos posteriores al momento en que la gradilla sea sacada del baño de María.

19. Agítese cada tubo de la titulación del complemento para asegurar una distribución uniforme de los glóbulos y lléveselos de nuevo al baño de María a 37°C. durante 30 minutos. La titulación completa del complemento puede verse en el cuadro 4.

Cuadro 4. Titulación del complemento (completa)

Tubo Núm.	Complemento al 1:30	Dilución del antígeno	Solución salina		Hemolisina	Suspensión de glóbulos de carnero al 2%	
	(ml.)	(ml.)	(ml.)		(ml.)	(ml.)	
1	0,20	0,5	1,3	Baño de María a 37°C. durante 1 hora	0,5	0,5	Baño de María a 37°C. durante ½ hora
2	0,25	0,5	1,3		0,5	0,5	
3	0,30	0,5	1,2		0,5	0,5	
4	0,35	0,5	1,2		0,5	0,5	
5	0,40	0,5	1,1		0,5	0,5	
6	0,45	0,5	1,1		0,5	0,5	
7	0,50	0,5	1,0		0,5	0,5	
8	Ninguno	Ninguna	2,5		Ninguna	0,5	

20. Retírese la gradilla del baño de María y léase la titulación del complemento.

La menor cantidad de complemento que da una hemólisis brillante completa es la unidad exacta. La unidad completa es 0,05 ml. mayor que la unidad exacta.

Para las reacciones de fijación del complemento, éste se diluye de modo que 1,0 ml. contenga 2 unidades completas.

Ejemplo:	<i>ml.</i>
Unidad exacta.....	0,3
Unidad completa.....	0,35
Dosis (dos unidades completas).....	0,7

La dilución del complemento que debe ser empleada en la reacción propiamente dicha puede ser calculada dividiendo $30 \times$ la dosis. Ejemplo: $\frac{30}{0,7} = 43$ ó una dilución al 1:43 de suero de cobayo.

El cuadro 5 da ejemplos adicionales:

Cuadro 5

Unidad exacta	Unidad completa	Dos unidades completas	Dilución que debe usarse	Preparación	
				Suero-complemento	Solución salina
<i>(ml.)</i>	<i>(ml.)</i>	<i>(ml.)</i>		<i>(ml.)</i>	<i>(ml.)</i>
0,3	0,35	0,7	1:43	1	+ 42
0,35	0,4	0,8	1:37	1	+ 36
0,4	0,45	0,9	1:33	1	+ 32
0,45	0,50	1,0	1:30	1	+ 29

Ocasionalmente se encuentran sueros-complementos hiperactivos que dan titulaciones de 2 unidades completas por mililitro en diluciones mayores que 1:43. Estos complementos deberán ser diluidos al 1:43 para lograr reacciones satisfactorias.

Nota: Los tubos de las titulaciones del complemento o de la hemolisina que muestran hemólisis completa pueden ser retirados y colocados en el refrigerador para usarlos posteriormente como soluciones de hemoglobina en las lecturas estándar (véanse págs. 68-69).

Reacciones Cualitativas de Kolmer con Suero y Líquido Céfalorraquídeo

1. Prepárense tubos de ensayo en gradillas de alambre de modo que haya dos tubos para cada suero y líquido céfalorraquídeo que se va a analizar. Se incluirán sueros controles de reactividad escalonada. Numérese la primera hilera de tubos de modo que correspondan a los sueros y líquidos céfalorraquídeos en análisis. Se destinarán cuatro tubos de ensayo adicionales para control de los reactivos especificados.

2. Deposítense 0,5 ml. de solución salina en cada tubo de la segunda hilera.
3. Añádanse las siguientes cantidades de solución salina a los cuatro tubos de control:

	<i>ml.</i>
Control de antígeno (para reacciones con suero)	0,2
Control de antígeno (para reacciones con líquido céfalorraquídeo)	0,5
Control del sistema hemolítico	1,0
Control de los glóbulos	2,5

4. Colóquese 0,2 ml. de cada suero en estudio en los tubos 1 y 2.
5. Colóquese 0,5 ml. de cada líquido céfalorraquídeo en estudio en los tubos 1 y 2.
6. Colóquese 0,2 ml. de cada suero de control utilizado en los tubos 1 y 2.
7. Añádase 0,5 ml. de la dilución de antígeno al primer tubo de cada reacción, ya sea suero, suero de control o líquido céfalorraquídeo y a los dos tubos controles de antígeno.
8. Déjense las gradillas en reposo durante 10 a 30 minutos a la temperatura ambiente.
9. Prepárese la dilución del complemento durante este intervalo. La cantidad necesaria es equivalente a 1,0 ml. para cada tubo de la reacción, más un ligero exceso.

Nota: El volumen de suero-complemento que debe ser diluido es determinado por la cantidad de complemento diluido necesario para el análisis propiamente dicho. Dividiendo el número de mililitros de complemento diluido que se necesita por el factor de dilución de la titulación (2 unidades completas) se obtiene el número de mililitros de suero-complemento necesario. Los cálculos pueden ser hechos de acuerdo con el cuadro siguiente:

Cuadro 6

Titulación del complemento (2 unidades completas)	Complemento diluido necesario	Suero-complemento requerido	Solución salina fría requerida.
	<i>(ml.)</i>	<i>(ml.)</i>	<i>(ml.)</i>
1:43	43	1	42
1:43	215	5	210
1:37	37	1	36
1:30	210	7	203

10. Añádase 1 ml. de complemento diluido (conteniendo 2 unidades completas) a todos los tubos de las reacciones con suero, suero de control y líquido céfalorraquídeo, incluyendo el tubo de control del antígeno y el de control del sistema hemolítico.

11. Mézclese el contenido de los tubos agitando bien las gradillas y colóqueselas en el refrigerador a temperaturas de 6° a 8°C. durante 15 a 18 horas.

12. Prepárese el volumen de hemolisina diluida necesaria para la reacción propiamente dicha, calculando 0,5 ml. (conteniendo 2 unidades) por cada tubo. Prepárese un ligero exceso. Puede usarse la fórmula siguiente para calcular las cantidades de solución de hemolisina al 1:100 y diluyente requeridos para preparar el volumen necesario de hemolisina diluida.

$$\frac{100}{\text{Factor de dilución de la titulación de hemolisina (2 unidades)}} \times \text{Volumen de hemolisina diluida necesaria (ml.)} = \text{ml. requeridos de hemolisina al 1:100}$$

En el cuadro 7 se presentan nuevos ejemplos:

Cuadro 7

Título de la hemolisina, 2 unidades en 0,5 ml.	Dilución de hemolisina necesaria	Hemolisina al 1:100 requerida	Solución salina requerida
	(ml.)	(ml.)	(ml.)
1:3.000	30	1	29
1:4.000	120	3	117
1:2.500	25	1	24
1:2.500	250	10	240

13. Retírese cada gradilla de tubos del refrigerador a intervalos regulares y colóquese inmediatamente en el baño de María a 37°C. durante 10 minutos. El intervalo se determinará por el período de tiempo necesario para agregar la hemolisina y la suspensión de glóbulos de carnero a cada gradilla.

14. Retírese cada gradilla del baño de María y añádase a todos los tubos 0,5 ml. de hemolisina diluida, excepto al tubo de control de los glóbulos.

15. Añádase 0,5 ml. de suspensión de glóbulos de carnero al 2% (preparada el día anterior) a todos los tubos. La suspensión de glóbulos al 2% deberá ser agitada ocasionalmente para asegurar la dispersión uniforme de los corpúsculos durante el período en que este reactivo es añadido a las reacciones de fijación del complemento.

16. Mézclase bien el contenido de los tubos agitando cada gradilla antes de volverla al baño de María a 37°C. para la segunda incubación. Examinense los controles a intervalos de 5 minutos. El tiempo necesario de la segunda incubación se determinará por el lapso requerido para reproducir el patrón de reactividad predeterminado de los sueros de control. Sin embargo, en todos los casos el tiempo de lectura debe ser, por lo menos, 10 minutos más del que se necesita para hemolizar los controles de antígeno y sistema hemolítico, pero no debe exceder, en total, de 60 minutos de incubación. Cuando no se cuenta con sueros de control, se terminará el período secundario de incubación 10 minutos después de la hemólisis del control del sistema hemolítico y del control del antígeno. En ningún caso este período excederá de una hora.

17. Retírese cada gradilla de tubos del baño de María al final del segundo período de incubación. Anótese la hemólisis observada en la forma descrita en "Preparación de los Estándares de Lectura" (pág. 68) y "Lectura e Informe de los Resultados de la Reacción" (pág. 69-70), excepto en aquellos casos en que se note inhibición de la hemólisis en el tubo de control.

Todos los sueros y líquidos céfalorraquídeos que muestren inhibición de la hemólisis en el tubo de control deberán ser llevados nuevamente al baño de María a 37°C. durante un período suficiente para completar una hora de incubación secundaria. Al final de este período, estas reacciones serán retiradas del baño de María y anotadas las lecturas de los tubos (incluyendo los tubos de control).

Esquema de las Reacciones Cualitativas de Kolmer con Suero y Líquido Céfalorraquídeo

Tubo Núm.		Solución salina	Antígeno		Dos unidades completas de complemento	Dos unidades de hemolisina	Suspensión de glóbulos de carnero al 2 por ciento	
	<i>Suero (ml.)</i>	<i>(ml.)</i>	<i>(ml.)</i>		<i>(ml.)</i>	<i>(ml.)</i>	<i>(ml.)</i>	
1.....	0,2	Ninguna	0,5	Agítese bien la gradilla. Déjese a temperatura ambiente por 10 a 30 minutos.	1,0	0,5	0,5	
2.....	0,2	0,5	Ninguno		1,0	0,5	0,5	
	<i>Líquido céfalorraquídeo (ml.)</i>							
1.....	0,5	Ninguna	0,5		1,0	0,5	0,5	
2.....	0,5	0,5	Ninguno		1,0	0,5	0,5	
<i>Controles</i>								
	Antígeno (suero)	0,2	0,5		1,0	0,5	0,5	
	Antígeno (líquido céfalorraquídeo)	0,5	0,5		1,0	0,5	0,5	
	Sistema hemolítico	1,0	Ninguno		1,0	0,5	0,5	
	Corpúsculos	2,5	Ninguno		Ninguno	Ninguna	0,5	

Reacciones Cuantitativas de Kolmer con Suero y Líquido Céfalorraquídeo

1. Colóquense tubos de ensayo en gradillas de alambre, destinando 8 para cada suero y 6 para cada líquido céfalorraquídeo que deba ser analizado. Inclúyanse controles de los reactivos y controles de sueros de reactividad escalonada.
2. Para cada suero, deposítense 0,9 ml. de solución salina en el tubo 1 y 0,5 ml. de solución salina en los tubos 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8.
3. Colóquese 0,5 ml. de solución salina en los tubos 2, 3, 4, 5, y 6 de cada reacción con líquido céfalorraquídeo.
4. Deposítense las cantidades indicadas de solución salina en cada uno de

los siguientes tubos de control de reactivos:

	<i>Solución salina</i>
Control de antígeno.....	0,5 ml.
Control hemolítico.....	1,0 ml.
Control de glóbulos.....	2,5 ml.

5. Para cada suero procedase en la forma siguiente:

Tubo Núm.	Procedimiento	Dilución de suero
1.....	Añádase 0,6 ml. de suero inactivado. Mézclese y pásese 0,5 ml. al tubo 8 (control) y al tubo 2.	No diluido
2.....	Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 3	1:2
3.....	Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 4	1:4
4.....	Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 5	1:8
5.....	Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 6	1:16
6.....	Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 7	1:32
7.....	Mézclese. Deséchese 0,5 ml.	1:64
8.....	No diluido (control)

6. Para cada líquido céfalorraquídeo procedase en la forma siguiente:

Tubo Núm.	Procedimiento	Dilución de líquido céfalorraquídeo
1.....	Añádase 0,5 ml. de líquido céfalorraquídeo	No diluido
2.....	Añádase 0,5 ml. de líquido céfalorraquídeo. Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 3	1:2
3.....	Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 4	1:4
4.....	Mézclese. Pásese 0,5 ml. al tubo 5	1:8
5.....	Mézclese. Deséchese 0,5 ml.	1:16
6.....	Añádase 0,5 ml. de líquido céfalorraquídeo	No diluido (control)

7. Añádase 0,5 ml. de antígeno diluido a los primeros siete tubos de cada reacción de suero, a los primeros cinco tubos de cada reacción de líquido céfalorraquídeo y al tubo de control del antígeno. Agítense las gradillas para mezclar bien.

8. Déjense las gradillas en reposo a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.

9. Termínense los análisis en la forma indicada en los párrafos 9 al 17 de la técnica para la práctica de las "Reacciones Cualitativas de Kolmer con Suero y Líquido Céfalorraquídeo" (págs. 63-66). Tanto las reacciones cualitativas como las cuantitativas pueden ser hechas con la mitad del volumen. Las cantidades de complemento, antígeno y otros reactivos necesarios son, en esta forma, reducidos a la mitad. Sin embargo, se sacrifica cierta exactitud en la operación por el uso de estas cantidades reducidas, ya que se aumentan los efectos relativos de los errores de medición. La hemolisina y

el complemento son titulados en volumen completo en la forma descrita para la reacción regular. La práctica de las reacciones con mitad del volumen es idéntica a los métodos regulares, excepto que se usa la mitad de los volúmenes de suero, líquido céfalorraquídeo y reactivos.

Esquema de las Reacciones Cuantitativas de Kolmer con Suero y Líquido Céfalorraquídeo

Tubo Núm.	Antígeno		Dos unidades completas de complemento		Dos unidades de hemolisina	Suspensión de glóbulos de carnero al 2%
	<i>Suero (en 0,5 ml.)</i>	(ml.)	(ml.)		(ml.)	(ml.)
1...	0,2 (no diluido)	0,5	1,0	Agítese bien la gradilla. Incubación primaria de 15 a 18 horas entre 6° y 8°C. seguida por 10 minutos a 37°C. en baño de María.	0,5	0,5
2...	0,1 (1:2)	0,5	1,0		0,5	0,5
3...	0,05 (1:4)	0,5	1,0		0,5	0,5
4...	0,025 (1:8)	0,5	1,0		0,5	0,5
5...	0,012 (1:16)	0,5	1,0		0,5	0,5
6...	0,006 (1:32)	0,5	1,0		0,5	0,5
7...	0,003 (1:64)	0,5	1,0		0,5	0,5
8...	0,2 (no diluido, control)	Ninguno	1,0		0,5	0,5
	<i>Líquido céfalorraquídeo (en 0,5 ml.)</i>					
1...	0,5 (no diluido)	0,5	1,0	Agítese bien la gradilla. Déjesela a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos	0,5	0,5
2...	0,25 (1:2)	0,5	1,0		0,5	0,5
3...	0,125 (1:4)	0,5	1,0		0,5	0,5
4...	0,062 (1:8)	0,5	1,0		0,5	0,5
5...	0,031 (1:16)	0,5	1,0		0,5	0,5
6...	0,5 (no diluido, control)	Ninguno	1,0		0,5	0,5
	<i>Controles de los reactivos</i>					
	Antígeno, 0,5 ml. de solución salina	0,5	1,0		0,5	0,5
	Hemolítico, 1,0 ml. de solución salina	Ninguno	1,0		0,5	0,5
	Glóbulos 2,5 ml. de solución salina	Ninguno	Ninguno		Ninguna	0,5

Preparación de los Estándares de Lectura

1. Caliéntense los tubos de solución de hemoglobina (guardada de la titulación o bien obtenida de los tubos de control de las pruebas del día) en el baño de María a 56°C. durante 5 minutos.
2. Prepárese una dilución al 1:6 de suspensión de glóbulos al 2%, añadiendo 5 ml. de solución salina a 1 ml. de suspensión al 2%.
3. Prepárense los estándares de lectura mezclando la solución de hemoglobina y la suspensión de glóbulos en las proporciones dadas en el cuadro 8.
4. Cuando se ejecuta la reacción con la mitad del volumen, los estándares de lectura se preparan también con la mitad del volumen de suspensión de células y de solución de hemoglobina.

Cuadro 8

Suspensión de glóbulos al 1:6	Solución de hemoglobina	Fijación del complemento equivalente	
		Porcentaje	Registro
(ml.)	(ml.)		
3,0	0,0	100	4+
1,5	1,5	50	3+
0,75	2,25	25	2+
0,3	2,7	10	1+
0,15	2,85	5	±
....	3,0	0	-

Lectura e Informe de los Resultados de las Reacciones

1. Todos los controles de suero y de líquido céfalorraquídeo deberán mostrar hemólisis completa.
2. Háganse las lecturas individuales de los tubos por comparación con los estándares de lectura al final del período de incubación secundaria y anótese el grado observado de fijación del complemento, excepto para aquellas muestras que presenten inhibición de la hemólisis en el tubo de control.
3. Los tubos que se hayan llevado de nuevo al baño de María a 37°C. para integrar 1 hora de incubación secundaria deben leerse, estimando y anotando el grado de fijación del complemento de cada tubo y del tubo de control, por comparación con los estándares de lectura.
4. Infórmense³ los resultados de las reacciones cualitativas de acuerdo con el cuadro 9.

Cuadro 9. Informe de la reacción cualitativa de Kolmer

Lectura del tubo de análisis	Lectura del tubo de control	Informe	Lectura del tubo de análisis	Lectura del tubo de control	Informe
4+	—	Reactivo	3+	3+	Anticomplementario
3+	—	Reactivo	3+	2+	Anticomplementario
2+	—	Reactivo	3+	1+	Débilmente Reactivo
1+	—	Reactivo	3+	±	Reactivo
±	—	Débilmente Reactivo	2+	2+	No Reactivo
—	—	No Reactivo	2+	1+	No Reactivo
4+	4+	Anticomplementario	2+	±	Débilmente Reactivo
4+	3+	Anticomplementario	1+	1+	No Reactivo
4+	2+	Débilmente Reactivo	±	±	No Reactivo
4+	1+	Reactivo			

5. Las reacciones cuantitativas se informan en términos de la más alta di-

³ Véanse las recomendaciones para "Informe de los Resultados de las Reacciones Serológicas", *Informaciones Generales* (pág. 3).

lución que da un resultado reactivo (1+, 2+, 3+ ó 4+) como se muestra en el cuadro 10.

Cuadro 10

Sueros o Líquido Céfalorraquídeo							Informe
Sin diluir	Diluciones						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
4	3	1	—	—	—	—	Reactivo, dilución al 1:4, ó 4 dils.
4	—	—	—	—	—	—	Reactivo, (4+), sin diluir, ó 1 dil.
4	4	3	2	—	—	—	Reactivo, dilución al 1:8, ó 8 dils.
4	4	4	4	4	1	—	Reactivo, dilución al 1:32 ó 32 dils.
3	1	—	—	—	—	—	Reactivo, dilución al 1:2, ó 2 dils.
1	—	—	—	—	—	—	Reactivo, (1+), sin diluir, ó 1 dil.
2	1	±	—	—	—	—	Reactivo, dilución al 1:2, ó 2 dils.
±	—	—	—	—	—	—	Débilmente Reactivo.
—	—	—	—	—	—	—	No Reactivo.
4	4	4	4	4	4	4	Véase <i>Nota</i> .

Nota: Si se obtiene resultado Reactivo con la más alta dilución de la reacción cuantitativa ordinaria (1:64), se pueden preparar y analizar diluciones más altas.

6. Cuando sea necesaria una hora completa de incubación a 37°C., infórmense los resultados de los análisis cuantitativos de acuerdo con el cuadro 11.

Cuadro 11. Informe de la reacción cuantitativa

(Después de una hora de incubación secundaria a 37°C.)

Lectura del tubo de análisis	Lectura del tubo de control	Informe ¹
4 4 4 4 4 2 -	4+	Anticomplementario
4 4 3 - - - -	2+	Reactivo
4 4 1 - - - -	1+	Reactivo
4 4 1 - - - -	±	Reactivo
3 2 - - - - -	±	Reactivo
4 4 1 - - - -	3+	Débilmente Reactivo
3 2 - - - - -	1+	Débilmente Reactivo
2 1 - - - - -	±	Débilmente Reactivo
3 - - - - -	±	Reactivo
1 - - - - -	±	No Reactivo
1 - - - - -	1+	No Reactivo
2 - - - - -	1+	No Reactivo
2 - - - - -	2+	No Reactivo

¹ Las designaciones cuantitativas del punto final de dilución o dils. han sido omitidas.

Segundo Análisis de los Sueros Anticomplementarios (Método de Sachs Modificado)

1. Caliéntese 0,5 ml. de suero en baño de María a 56°C. durante 15 minutos. Si el suero ha sido previamente inactivado, vuélvase a calentar durante 5 minutos.
 2. Añádase al suero 4,1 ml. de ácido clorhídrico exactamente titulado N/300 e inviértase varias veces. Déjese reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 3. Centrifúguese durante 10 minutos. Sepárese el líquido sobrenadante, desechando el sedimento.
 4. Añádase 0,4 ml. de solución de cloruro de sodio al 10 % al líquido sobrenadante. No es necesario neutralizar.
 5. Prepárense dos hileras de 5 tubos de ensayo cada una y numérense del 1 al 5. La segunda hilera debe contener los controles del suero.
 6. Colóquese 0,5 ml. de solución salina en los tubos 3, 4 y 5 de ambas hileras.
 7. En ambas hileras:
 - a. Añádase 1,0 ml. del suero tratado al tubo 1.
 - b. Añádase 0,5 ml. del suero tratado a los tubos 2 y 3.
 - c. Mézclese el contenido del tubo 3 y pásese 0,5 ml. al tubo 4.
 - d. Mézclese el contenido del tubo 4 y pásese 0,5 ml. al tubo 5.
 - e. Mézclese el contenido del tubo 5 y deséchese 0,5 ml.
- Los cinco tubos de cada hilera contienen 0,1, 0,05, 0,025, 0,012 y 0,006 de suero, respectivamente.
8. Añádase 0,5 ml. de dilución de antígeno a cada tubo de la primera hilera.
 9. Agréguese 0,5 ml. de solución salina a cada tubo de la segunda hilera.
 10. Agítese la gradilla con los tubos y déjese reposar a la temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.
 11. Añádase 1,0 ml. de complemento diluido a todos los tubos de ambas hileras.
 12. Agítese la gradilla y colóquese en el refrigerador durante 15 a 18 horas a temperaturas de 6°-8°C.
 13. Complétese la reacción en la forma descrita en "Reacciones Cualitativas de Kolmer con Suero y Líquido Céfalorraquídeo" (págs. 63-66).
 14. Anótese el grado de hemólisis tanto en los tubos de análisis como en los de control.

15. Todos los tubos de la hilera posterior pueden mostrar hemólisis completa. Sin embargo, el primero y segundo tubos de la hilera posterior pueden mostrar una ligera inhibición de la hemólisis.

Con sueros No Reactivos los tubos respectivos de la primera hilera muestran el mismo grado de inhibición de la hemólisis, y si el grado es ligero puede darse un informe No Reactivo. Con los sueros Reactivos la inhibición de la hemólisis es mucho más notable en los tubos de la primera hilera. Infórmense los resultados como Reactivos, Débilmente Reactivos, o No Reactivos.

Segunda Reacción con Líquidos Céfalorraquídeos Anticomplementarios

1. Caliéntese el líquido céfalorraquídeo a 56°C. durante 15 minutos.
2. Prepárense dos hileras de cinco tubos de ensayo cada una y numérense del 1 al 5.
3. Colóquese 0,5 ml. de solución salina en los tubos 2, 3, 4 y 5 de ambas hileras.
4. En ambas hileras:
 - a. Añádase 0,5 ml. de líquido céfalorraquídeo a los tubos 1 y 2.
 - b. Mézclese el contenido del tubo 2 y pásese 0,5 ml. al tubo 3.
 - c. Mézclese el contenido del tubo 3 y pásese 0,5 ml. al tubo 4.
 - d. Mézclese el contenido del tubo 4 y pásese 0,5 ml. al tubo 5.
 - e. Mézclese el contenido del tubo 5 y deséchese 0,5 ml.
5. Añádase 0,5 ml. de la dilución del antígeno a cada tubo de la primera hilera.
6. Agréguese 0,5 ml. de solución salina a cada tubo de la segunda hilera.
7. Agítese la gradilla con los tubos, para mezclar, y déjese reposar a la temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.
8. Añádase 1,0 ml. de complemento diluido a todos los tubos de ambas hileras, agítese la gradilla, para mezclar, y colóquese después en el refrigerador durante 15 a 18 horas a temperaturas de 6°-8°C., completando la reacción en la forma descrita en "Reacciones Cualitativas de Kolmer con Suero y Líquido Céfalorraquídeo" (págs. 63-66).
9. Interpretense los resultados de acuerdo con los siguientes ejemplos:

Primera hilera: 4 4 4 1 - } Reactivo
Segunda hilera: 4 1 - - - }

Primera hilera: 4 3 2 - - } Reactivo
Segunda hilera: 4 1 - - - }

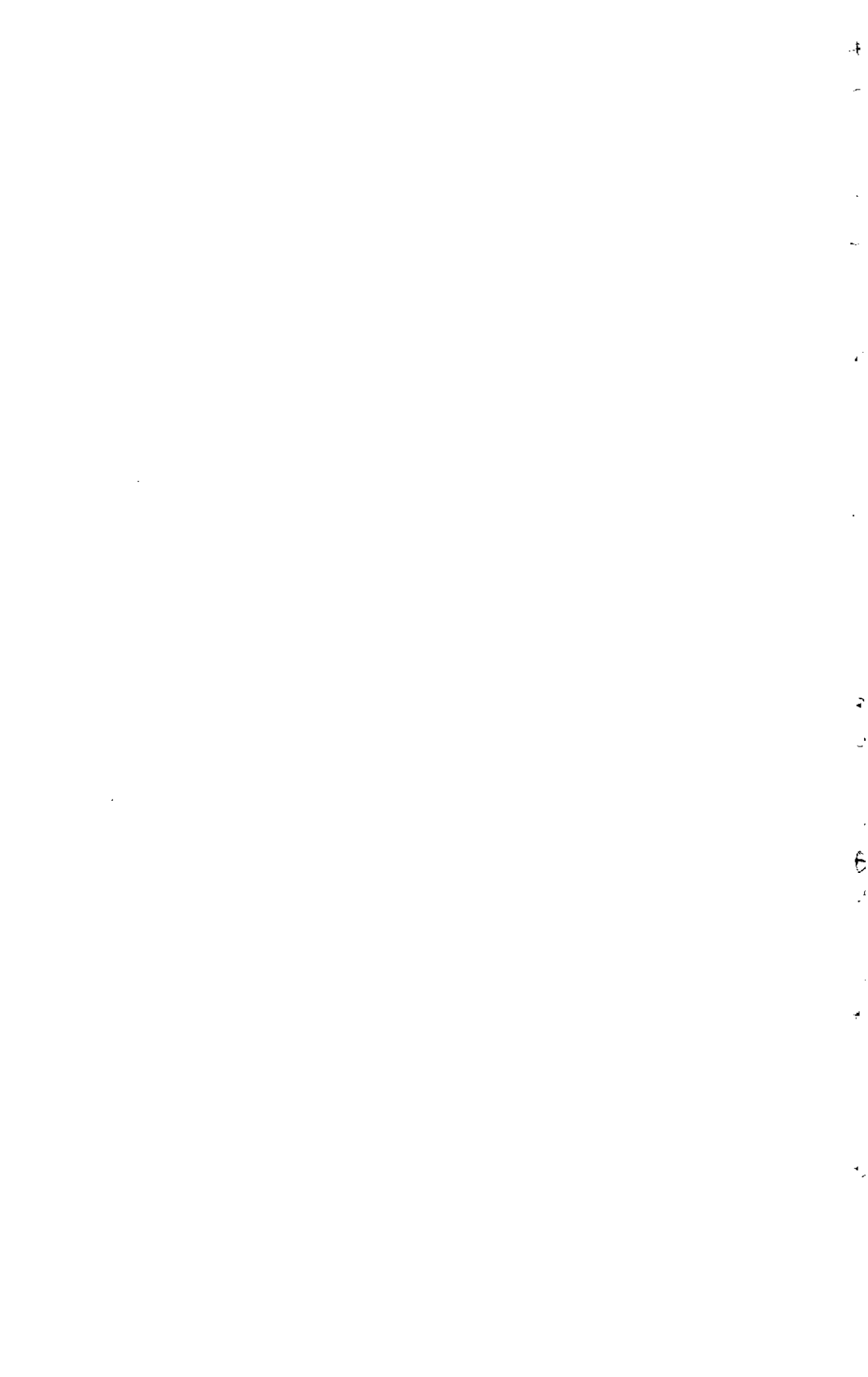
Primera hilera: 4 1 - - - } Reactivo
Segunda hilera: 1 - - - - }

Primera hilera: 4 4 2 - - } No Reactivo
Segunda hilera: 4 2 1 - - }

Primera hilera: 3 2 - - - } No Reactivo
Segunda hilera: 3 1 - - - }

Referencias Bibliográficas

- (1) KOLMER, J. A.; LYNCH, E. R.; Cardiolipin antigens in the Kolmer complement fixation test for syphilis. *J. Ven. Dis. Inform.*, 29: 166-172, junio 1948.
- (2) KOLMER, J. A.: Comunicaciones personales.



Reacciones de Mazzini

Antes de ejecutar esta reacción, el técnico debe estar familiarizado con el contenido de los capítulos *Informaciones Generales* y *Equipo General*.

Equipo

1. Máquina rotatoria, adaptable de 100 a 180 r.p.m., que circunscriba un círculo de $\frac{3}{4}$ de pulgada de diámetro en un plano horizontal.
2. Soporte para láminas. Hecho de algún material conveniente para acomodar de una a cuatro láminas de 2 x 3 pulgadas.
3. Agujas hipodérmicas de calibre 13 y 21 con biseles recortados.

Cristalería

1. Láminas de vidrio¹ de 2 x 3 pulgadas, con 10 concavidades de 16 mm. de diámetro por 3 mm. de profundidad, para análisis de sueros.
2. Láminas de vidrio¹ de 2 x 3 pulgadas, con tres concavidades, una de 38 mm. de diámetro y dos de 20 mm. de diámetro, para análisis de líquidos céfalorraquídeos.
3. Frascos con tapón de vidrio o tapa de rosca, redondos, de 30 ml. de capacidad.
4. Jeringa, tipo Luer, de 1 a 2 ml. de capacidad, o un "tubo de observación" N° 420 LST.¹

Reactivos

1. Antígeno

El antígeno (1) para esta reacción es una solución alcohólica que contiene 0,025 por ciento de cardiolipina, aproximadamente 0,2 por ciento de lecitina, y 0,75 a 0,9 por ciento de colesterol, que ha sido estandarizada serológicamente mediante comparación con un antígeno de reactividad conocida.

2. Solución salina tope al 1 por ciento, de pH 6,3 a 6,4:

a. Prepárese la solución de acuerdo con la siguiente fórmula:

	<i>gramos</i>
Cloruro de sodio (C.P.).....	8,1
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄).....	0,2
Fosfato disódico (Na ₂ HOP ₄ + 12 H ₂ O).....	1,7
	<i>ml.</i>
Agua destilada.....	1.000,0
Acido clorhídrico normal.....	3,2
Formaldhído (Merck).....	1,0

b. Filtrese la solución y verifíquese el pH.

¹ Serological Reagents Co., Indianapolis, Ind.

REACCIONES DE MAZZINI CON SUERO

Preparación de los Sueros

1. Sepárense los sueros de los coágulos por centrifugación y extraíganse con pipeta o por decantación.
2. Caliéntense en el baño de María durante 30 minutos a 56°C. Los sueros deberán ser recalentados durante 10 minutos si se va a repetir el examen después de 4 horas del primer período de calentamiento.
3. Vuélvase a centrifugar cualquiera muestra a la cual se le hayan formado partículas visibles durante el calentamiento.

Preparación de la Emulsión de Antígeno

1. Deposítense 0,4 ml. de la solución salina tope en el fondo de un frasco de 30 ml.
2. Con una pipeta de 1 ml., graduada hasta la punta, mézclase 0,4 ml. de antígeno colesteroilizado (leyendo desde la parte inferior de la pipeta).
3. Sosténgase el frasco con la mano izquierda e imprímasele un movimiento rotatorio rápido a medida que se expulsa el antígeno, directamente y de una vez, sobre la solución salina desde la pipeta que se sostiene en la mano derecha.
4. Mézclase aspirando y soplando la suspensión con la pipeta exactamente seis veces, restituyendo a la mezcla final toda la emulsión que queda en la pipeta.
5. Añádanse 2,6 ml. de la solución salina tope, ciérrase la botella y agítense de abajo arriba y viceversa *50 veces en 15 segundos*.
6. La emulsión, entonces, se encuentra lista para uso inmediato y continúa en condiciones de usarse durante todo el día. Agítense suavemente la emulsión de antígeno cada vez que se utilice.

Prueba Preliminar de la Emulsión de Antígeno

1. Compruébese el rendimiento de la jeringa o "tubo de observación", que estarán provistos de una aguja de calibre 21. Sostenida en posición vertical, debe dar salida a 0,01 ml. de suspensión de antígeno por cada gota.
2. Análcese los sueros de control de reactividad escalonada y la solución salina tope, en la forma descrita en "Reacción Cualitativa de Mazzini con Suero". Los resultados obtenidos deben reproducir la escala de reactividad previamente establecida para esos sueros, y mostrar completa dispersión de las partículas de antígeno en el suero No Reactivo y en la solución salina tope.

Reacción Cualitativa de Mazzini con Suero

1. Deposítese 0,03 ml. de cada suero en una concavidad separada.
2. Agréguese una gota de emulsión de antígeno (0,01 ml.) a cada suero.
3. Háganse girar las láminas en la máquina rotatoria durante 4 minutos.
Nota: Cuando se emplea la rotación mecánica, la velocidad debe ser de 160 a 180 rotaciones por minuto. Si la rotación se hace a mano, circunscriba un círculo de 2 pulgadas 120 veces por minuto.
4. Léase cada reacción microscópicamente usando un objetivo de poco aumento (16 mm.) con un ocular 6 X. Anótense e infórmense todos los sueros No Reactivos (sin grumos) y todos los sueros Reactivos (4+).
5. Agréguese a todo análisis que dé una reacción de 1+, 2+, 3+, ó atípica, una gota (aproximadamente 0,05 ml.) de solución salina al 0,9%, por medio de una jeringa, usando aguja de calibre 13, con bisel cortado.
6. Hágase rotar la lámina por un segundo período de 4 minutos en una máquina rotatoria ajustada a 100 ó 120 r.p.m., o a mano.
7. Examínese al microscopio, anotando e informando los resultados en la forma siguiente:

a. Reacciones típicas

Descripción	Lectura	Informe
Reacciones sin grumos o toscas.....	—	No Reactivo
Grumos muy pequeños.....	1+	Débilmente Reactivo
Pequeños grumos.....	2+	Débilmente Reactivo
Grumos de tamaño mediano.....	3+	Reactivo
Grumos grandes.....	4+	Reactivo

b. Reacciones atípicas

Las reacciones atípicas se caracterizan por conglomerados de partículas, irregulares y de varios tamaños, en los cuales predominan grumos pequeños y partículas de antígeno libres. Los sueros de reacción atípica se deben ensayar de nuevo en la forma descrita en "Reacción Cuantitativa de Mazzini con Suero."

Reacción Cuantitativa de Mazzini con Suero

1. Prepárense diluciones de suero al 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y mayores, si fuera necesario, en la siguiente forma:
 - a. Deposítese 0,5 ml. de solución salina tope en cada uno de 6 (ó más) tubos.
 - b. Añádase 0,5 ml. de suero calentado al primer tubo y mézclese.

c. Pásese 0,5 ml. de suero diluido del primero al segundo tubo y mézclese.

d. Continúese pasando y mezclando de un tubo al siguiente hasta que se hayan hecho todas las diluciones. Déjese la pipeta con la que se hizo la mezcla en el último tubo.

2. Colóquese 0,05 ml. de cada dilución de suero en la cámara respectiva de una lámina de vidrio.

3. Añádase una gota de suspensión de antígeno (suspensión de antígeno usada para la Reacción Cualitativa de Mazzini con Suero, pág. 77) a cada suero diluido que está en la lámina.

4. Hágase rotar la lámina en la máquina rotatoria mecánica durante 4 minutos a 180 r.p.m.

5. Léanse y anótense los resultados en la misma forma que para las reacciones cualitativas (pág. 77).

6. Infórmense los resultados de acuerdo con la mayor dilución de suero que da un resultado Reactivo (3+ ó 4+).

Ejemplo:

<i>Dilución de suero</i>						<i>Informe</i>
<i>1:2</i>	<i>1:4</i>	<i>1:8</i>	<i>1:16</i>	<i>1:32</i>	<i>1:64</i>	
4	4	4	2	—	—	Reactivo, dilución al 1:8, ó 8 dils.
4	3	1	—	—	—	Reactivo, dilución al 1:4, ó 4 dils.
4	4	4	4	1	—	Reactivo, dilución al 1:16, ó 16 dils.

REACCIONES DE MAZZINI CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

1. Análizese el líquido céfalorraquídeo tan pronto como sea posible después de haberlo recogido. Las muestras sanguinolentas o muy contaminadas no son satisfactorias para el examen. Los líquidos céfalorraquídeos se examinarán sin calentamiento previo.

2. Centrifúguese el líquido céfalorraquídeo, recientemente extraído, a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos.

3. Decántese y traspásese el líquido sobrenadante a un tubo limpio.

Reacción Cualitativa de Mazzini con Líquido Céfalorraquídeo

1. Colóquense 0,05 ml. y 0,2 ml. de líquido céfalorraquídeo, respectivamente, en cada una de las dos cámaras de 20 mm., y 0,5 ml. de líquido céfalorraquídeo en la cámara de 38 mm. de la lámina especial. Deben incluirse líquidos céfalorraquídeos conocidos Reactivos y No Reactivos como controles para la serie de estas muestras.

2. Agréguese una gota (0,01 ml.) de emulsión de antígeno (la misma

emulsión que se usa para la reacción con suero) a cada una de las cámaras que contienen el líquido céfalorraquídeo.

3. Háganse girar las láminas en una máquina rotatoria a razón de 100 a 120 r.p.m., durante 10 minutos.

4. Inmediatamente después de la rotación, agréguese dos gotas de solución salina al 0,9 por ciento por medio de una jeringa, con aguja de calibre 13 con bisel cortado, a la cámara que contiene 0,05 ml. de líquido céfalorraquídeo.

5. Hágase rotar de nuevo el soporte de la lámina durante 20 minutos más a razón de 80 a 100 r.p.m.

6. Léanse y anótese los resultados en la forma descrita para las reacciones con suero (págs. 77-78).

7. Infórmense los resultados de las reacciones más fuertes obtenidas, prescindiendo de considerar con cuál de las tres cantidades se obtuvieron.

Ejemplo:

<i>Cantidad del líquido céfalorraquídeo</i>			<i>Informe</i>
<i>0,05 ml.</i>	<i>0,2 ml.</i>	<i>0,5 ml.</i>	
1+	2+	4+	Reactivo
—	1+	3+	Reactivo
4+	2+	2+	Reactivo
2+	4+	3+	Reactivo
—	1+	2+	Débilmente Reactivo
—	—	1+	Débilmente Reactivo

Reacción Cuantitativa de Mazzini con Líquido Céfalorraquídeo

Las muestras de líquido céfalorraquídeo que reaccionen fuertemente pueden medirse aún más, de la siguiente manera:

1. Prepárense diluciones en serie del líquido céfalorraquídeo en solución salina tope desde 1:2 a 1:16 y más altas si es necesario.

2. Deposítense 0,5 ml. de cada dilución en las respectivas cámaras de 38 mm. de las láminas especiales de vidrio.

3. Agréguese una gota (0,01 ml.) de emulsión de antígeno (la misma emulsión que se usa para la reacción con suero) a cada una de las cámaras que contienen líquido céfalorraquídeo.

4. Háganse rotar las láminas en una máquina rotatoria mecánica a razón de 100 a 120 r.p.m., durante 10 minutos.

5. Háganse rotar de nuevo durante 20 minutos más a razón de 80 a 100 r.p.m.

6. Léanse y anótese los resultados de cada dilución de líquido céfalorraquídeo.

7. Infórmese en términos de la más alta dilución que produce un resultado

Reactivo, en la misma forma descrita para la reacción cuantitativa con suero (págs. 77-78).

Referencias Bibliográficas

- (1) MAZZINI, L. Y.: Mazzini cardiolipin microfloculation test for syphilis. J. Immunol., 66: 261-275, febrero 1951.
- (2) MAZZINI, L. Y.: Comunicaciones personales.

Reacciones de Rein-Bossak

Antes de ejecutar esta reacción, el técnico debe estar familiarizado con el contenido de los capítulos Informaciones Generales y Equipo General.

Equipo

1. Máquina rotatoria, adaptable a 180 r.p.m., que circunscriba un círculo de $\frac{3}{4}$ de pulgada de diámetro sobre un plano horizontal.
2. Dispositivo para preparar anillos de parafina de 14 mm. de diámetro aproximadamente.
3. Soporte para láminas, de material adecuado para acomodar tres o cuatro láminas de 2 x 3 pulgadas.
4. Agujas hipodérmicas, biseladas, de calibre 25, que rindan aproximadamente 120 gotas por mililitro cuando la jeringa y la aguja sean sostenidas verticalmente.

Cristalería

1. Frascos de 30 ml. de capacidad (1 onza), redondos, con tapón de vidrio o de corcho recubierto con papel de estaño.
2. Láminas de vidrio de 2 x 3 pulgadas, con 12 anillos de parafina de 14 mm. de diámetro aproximadamente. También pueden usarse láminas de vidrio con anillos de cerámica.
3. Tubos de centrifuga de 3 x 1 pulgada, de fondo redondo.
4. Jeringas de vidrio de 1 ó 2 ml. de capacidad.

Reactivos

1. Antígeno

Es una solución de cardiolipina-lecitina, que contiene 0,2 por ciento de cardiolipina y aproximadamente 1,3 por ciento de lecitina purificada, en alcohol absoluto, estandarizada previamente frente a un antígeno similar de reactividad conocida. Debe guardarse en la obscuridad a temperatura ambiente (23° a 29° C.).

2. Solución salina al 0,9 por ciento

Disuélvanse 9,0 gm. de cloruro de sodio purísimo en 1.000 ml. de agua destilada.

3. Agua destilada (pH 6,0 aproximadamente)

Hiérvase y enfríese a temperatura ambiente antes de usarla.

4. Solución de colesterol al 1%

Disuélvase 1,0 gm. de colesterol (Pfanstiehl, exento de cenizas) en 100 ml. de alcohol absoluto.

Preparación de los Sueros

1. Sepárese el suero del coágulo por medio de centrifugación y extracción con pipeta o decantación.
2. Caliéntese en baño de María a 56°C. durante 30 minutos. Enfríese hasta temperatura ambiente antes de usarse. Los sueros que se conservan hasta el día siguiente deberán ser nuevamente calentados durante 10 minutos.

Preparación de la Emulsión de Antígeno

1. Deposítese 0,8 ml. de agua destilada (hervida y enfriada a temperatura ambiente) en un frasco cilíndrico de 30 ml.
2. Sosténgase el frasco con el fondo hacia la mesa y al mismo tiempo que se le imprime un movimiento rápido de rotación, viértase con una pipeta de 1,0 ml., directa y bruscamente sobre el agua destilada, 0,9 ml. de colesterol al 1 %.
3. Continúese la rotación durante 15 segundos.
4. Mídase 0,1 ml. del antígeno cardioplipina-lectina con una pipeta de 0,1 ml. ó 0,2 ml.
5. Añádase el antígeno al frasco, soplando el contenido de la pipeta.
6. Tápese el frasco y sacúdaselo vigorosamente durante un minuto, golpeando rápidamente el fondo de él contra la palma de la mano.
7. Añádanse 2,5 ml. de solución salina al 0,9 %.
8. Agítese el frasco con fuerza moderada durante 1 minuto.
9. Pásense 3,0 ml. del antígeno emulsionado a un tubo de centrifuga, de fondo redondo y de 3 x 1 pulgada.
10. Colóquese el tubo que contiene la emulsión de antígeno en el baño de María a 56°C. durante 15 minutos.
11. Sáquese del baño de María el tubo que contiene la emulsión y centrifúguese a 1.800 r.p.m. durante 15 minutos en una centrifuga I.E.C.¹ N° 1.
12. Sáquese el tubo de la centrifuga e inviértaselo rápidamente para desecher el líquido turbio sobrenadante.
13. Límpiense las paredes del tubo con un pedazo de gasa o de algodón para quitar el exceso de líquido.
14. Añádanse 3,0 ml. de solución salina al 0,9 por ciento.
15. Resuspéndase el sedimento por medio de agitación suave.

¹ International Equipment Co., Boston, Mass.

Prueba Preliminar de la Emulsión de Antígeno

Cada lote de emulsión de antígeno debe ser primero examinado comparándolo con sueros controles de reactividad escalonada. Esto se efectúa agregando una gota de la emulsión de antígeno a 0,05 ml. de cada suero y completando las reacciones del modo descrito en "Reacción Cualitativa de Rein-Bossak con Suero." Los resultados obtenidos deben reproducir la escala de reactividad establecida previamente para esos sueros.

Reacción Cualitativa de Rein-Bossak con Suero

1. Deposítense 0,05 ml. del suero calentado dentro de un anillo de parafina en la lámina de vidrio.
2. Añádase una gota (aproximadamente $\frac{1}{120}$ ml.) de emulsión de antígeno al suero.
3. Hágase rotar durante 4 minutos.
4. Efectúese el examen microscópico inmediatamente después de la rotación.
5. Infórmese² el grado de floculación observada del modo siguiente:

Descripción	Lectura	Informe
No hay grumos.....	—	No Reactivo
Grumos muy pequeños.....	±	Débilmente Reactivo
Grumos pequeños.....	1+	Débilmente Reactivo
Grumos de tamaño mediano.....	2+	Débilmente Reactivo
Grumos medianamente grandes.....	3+	Reactivo
Grumos grandes.....	4+	Reactivo

Reacciones Zonales

Las reacciones atípicas están caracterizadas por escasos grumos irregulares entremezclados con partículas no floculadas. Vuélvansc a analizar los sueros que den reacciones atípicas, en la siguiente forma:

1. Deposítense 0,5 ml. de solución salina al 0,9 % en cinco tubos (numerados del 1 al 5).
2. Agréguese 0,5 ml. de suero calentado al tubo 1 y mézclese.
 - a. Pásese 0,5 ml. del tubo 1 al tubo 2 y mézclese.
 - b. Pásese 0,5 ml. del tubo 2 al tubo 3 y mézclese.
 - c. Pásese 0,5 ml. del tubo 3 al tubo 4 y mézclese.
 - d. Pásese 0,5 ml. del tubo 4 al tubo 5 y mézclese.

² Véanse las recomendaciones para "Informe de los Resultados de las Reacciones Serológicas", *Informaciones Generales* (pág. 3).

3. Análizese cada dilución del suero en la misma forma descrita en "Reacción Cualitativa de Rein-Bossak con Suero."
4. Hágase la lectura microscópica e infórmese como resultado del análisis la reacción más fuerte obtenida en cualquiera de las 5 diluciones.

Reacción Cuantitativa de Rein-Bossak con Suero

1. Prepárense diluciones en serie del suero (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc.) en la forma antes descrita para las "Reacciones Zonales" (pág. 83).
2. Análizese el suero no diluido y las diluciones de suero en la forma descrita en "Reacción Cualitativa de Rein-Bossak con Suero" (pág. 83).
3. Infórmese como punto cuantitativo final la dilución más alta que haya dado una reacción 4+ ó 3+. Estos resultados se informan en *dils* de la manera que se muestra a continuación:

Ejemplo:

Suero no diluido	Dilución del suero						Informe (dils)
1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
4+	4+	4+	4+	2+	1+	—	8
4+	4+	4+	4+	3+	—	—	16
4+	—	—	—	—	—	—	1

Referencias Bibliográficas

- (1) REIN, C. R.; BOSSAK, H. N.; Cardiolipin antigens in the serodiagnosis of syphilis. A microfloculation slide test. *Am. J. Syph., Gonor. and Ven. Dis.*, 30: 40-46, enero 1946.

Reacciones VDRL

Antes de ejecutar esta reacción, el técnico debe estar familiarizado con el contenido de los capítulos Informaciones Generales y Equipo General.

REACCIONES DE FLOCULACION VDRL EN LAMINA, CON SUERO (1, 2)

Equipo

1. Máquina rotatoria, adaptable a 180 r.p.m., que circunscriba un círculo de $\frac{3}{4}$ de pulgada de diámetro sobre un plano horizontal.
2. Dispositivo para hacer anillos de parafina de 14 mm. de diámetro aproximadamente.
3. Soporte para láminas de microscopio de 2 x 3 pulgadas.
4. Agujas hipodérmicas de medidas adecuadas, con o sin puntas.

Cristalería

1. Láminas¹ de 2 x 3 pulgadas, con anillos de parafina de 14 mm. de diámetro aproximadamente.
2. Frascos² de una onza, redondos, con tapón de vidrio o de rosca (recubierto con papel de estaño o de vinylite), de boca angosta.

Nota: Algunos frascos de una onza, con tapón de cristal, ahora disponibles, no resultan satisfactorios para preparar un solo volumen de emulsión de antígeno para estas reacciones, debido a que el fondo está combado hacia adentro y hace que los 0,4 ml. de emulsión salina se distribuyan solamente en la periferia. Se puede obtener una emulsión satisfactoria, al preparar cantidades dobles de emulsión de antígeno, si los 0,8 ml. de solución salina cubren la superficie del fondo de esta clase de frascos. Los frascos redondos, de un diámetro aproximado de 35 mm., con la superficie interior del fondo plana o cóncava, resultan satisfactorios para preparar los volúmenes simples de emulsión de antígeno.

¹ Se pueden usar también láminas de vidrio con anillos de cerámica para la reacción VDRL en lámina, con las siguientes precauciones. Los anillos deben ser suficientemente altos para evitar derramamiento cuando las láminas giran a la velocidad prescrita. Se deben limpiar las láminas cada vez que se usan de modo que el suero pueda extenderse por la superficie interior de los anillos de cerámica. Este tipo de lámina se debe desechar tan pronto como el anillo empieza a disgregarse, puesto que esas partículas en los sueros en estudio pueden tomarse por grumos de partículas de antígeno, dando lugar, por lo tanto, a un informe Reactivo falso.

² N° de Catálogo CA-1, 90525 (frascos sencillos); CA-1, 90530 (frascos con tapón de cristal). Corning Glass Works, Corning, N. Y.

El bajo costo de las tapas plásticas contribuye a que no se intente su limpieza para usarlas de nuevo, ya que el utilizar un tapón o tapa que no esté limpio puede producir emulsiones poco satisfactorias.

3. Jeringa, tipo Luer, de 1 ó 2 ml.

Reactivos

I. Antígeno

a. El antígeno para esta prueba es una solución alcohólica que contiene 0,03 por ciento de cardioplipina, 0,9 % de colesterol y suficiente lecitina purificada para producir una reactividad estándar. Durante los últimos años esta cantidad de lecitina ha sido de 0,21 por ciento $\pm 0,01$ por ciento.

b. Cada lote de antígeno debe ser estandarizado serológicamente por comparación adecuada con un antígeno de reactividad conocida.

c. El antígeno se distribuye en frascos de color café con tapón de rosca (recubierto con lámina de estaño o vinylite) o en ampollitas de vidrio selladas herméticamente, debiendo mantenerse a la temperatura ambiente (23° a 29°C.).

d. Los componentes de este antígeno permanecen en solución a temperaturas normales, de modo que cualquier precipitado que se note indica cambios debidos a factores tales como evaporación o adición de materiales arrastrados por las pipetas. Los antígenos que contengan precipitados deben rechazarse.

2. Soluciones salinas

a. La solución salina tope, que contiene 1 por ciento de cloruro de sodio, es preparada en la siguiente forma

Formaldehido neutro, calidad reactivo, ml	0,5
Fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$), gm.	0,093
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4), gm.	0,170
Cloruro de sodio (A.C.S.) gm.	10,0
Agua destilada, ml.	1.000,0

Esta solución da lecturas, en el potenciómetro, de pH 6,0 $\pm 0,1$ y será guardada en frascos con tapón de rosca o de vidrio.

b. Solución salina al 0,9 por ciento

Añádanse 900 mg. de cloruro de sodio seco por cada 100 ml. de agua destilada.

Preparación de los Sueros

1. El suero claro, obtenido por la centrifugación de sangre total coagulada, se calentará a 56°C. durante 30 minutos antes de analizarlo.

2. Los sueros serán examinados después de sacarlos del baño de María y aquellos en los que se hallen partículas de impurezas deberán ser nuevamente centrifugados.

3. Los sueros que sean analizados después de 4 horas de haber sido calentados deberán colocarse de nuevo a 56°C. durante 10 minutos.

Preparación de las Láminas de Vidrio

1. Las láminas nuevas se limpian con jabón Bon Ami, el cual se quita con un paño suave después de seco.

2. A las láminas usadas previamente se les quita la parafina, se lavan en seguida con jabón o detergente, enjuagándolas hasta que queden libres del material de limpieza, y se tratan entonces como láminas nuevas.

3. Se tratará de manejar por sus bordes las láminas de vidrio mientras se lavan, a fin de evitar impresiones dactilares grasosas sobre las superficies en que se va a hacer el análisis.

4. El suero se extenderá dentro de los círculos en las láminas limpias. Cuando no se extiende, es una indicación de que la limpieza es defectuosa y por lo tanto la lámina no debe ser usada.

5. Los anillos de parafina se hacen colocando parafina caliente en las láminas por medio de moldes metálicos.

Nota: No se recomiendan para esta reacción las láminas de vidrio con cavidades o con anillos de vidrio.

Preparación de la Emulsión de Antígeno

1. Depótese 0,4 ml. de solución salina tope en el fondo de un frasco redondo de 30 ml., con tapón de vidrio o de rosca.

2. Añádase 0,5 ml. (de la mitad inferior de una pipeta de 1 ml. graduada hasta la punta) directamente sobre la solución salina mientras se imprime a la botella un movimiento de rotación suave pero continuo, sobre una superficie plana.

La temperatura de la solución salina tope del antígeno debe oscilar entre 23° y 29°C. en el momento de preparar la emulsión de antígeno.

Nota: El antígeno se añade gota a gota, pero rápidamente, de modo que se permita la salida de 0,5 ml. de antígeno en 6 segundos. La punta de la pipeta deberá quedar en el tercio superior del frasco y la rotación no deberá ser lo suficientemente fuerte como para mojar la pipeta con la solución salina. Se obtiene la velocidad de rotación adecuada cuando el borde exterior del frasco circunscribe un círculo de 2 pulgadas de diámetro, aproximadamente, tres veces por segundo.

3. Sólase la última gota de antígeno de la pipeta, sin que ésta toque la solución salina.
4. Continúese la rotación de la botella durante 10 segundos más.
5. Añádanse 4,1 ml. de solución salina tope usando una pipeta de 5 ml.
6. Tápese el frasco y agítase vigorosamente durante 10 segundos aproximadamente.
7. La emulsión de antígeno está lista para su uso y puede ser utilizada durante un día.

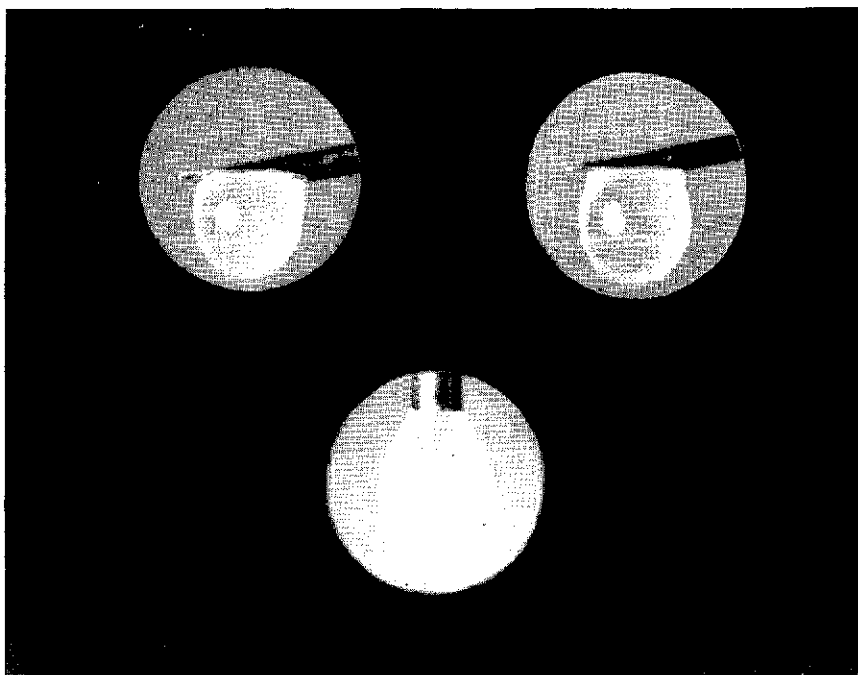


FIG. 1. Gotas del mismo tamaño

Puede prepararse el doble de esta cantidad de emulsión de antígeno de una sola vez, usando cantidades dobles de antígeno y de solución salina. En este caso deberá emplearse una pipeta de 10 ml. para medir un volumen de 8,2 ml. de solución salina. Si se necesitan cantidades mayores de emulsión, deberá prepararse más de una mezcla. Estas partes alícuotas pueden entonces ser probadas y finalmente mezcladas.

Cálculo de la Salida de la Emulsión de Antígeno por la Aguja

1. El número de partículas de antígeno por campo microscópico es determinado por el tamaño de la gota de emulsión de antígeno que se usa. Por esta razón debe revisarse diariamente la aguja que se utiliza.

2. La emulsión de antígeno se reparte mediante una jeringa provista de una aguja hipodérmica calibre 22 con bisel regular o con una de calibre 23 de bisel largo o finalmente con una de calibre 18, sin punta.

Nota: Es de primordial importancia usar la cantidad adecuada ($\frac{1}{60}$ ml.) de emulsión de antígeno en cada reacción cualitativa, de modo que cualquier método que produzca siempre gotas del mismo y apropiado tamaño resultará satisfactorio (véase fig. 1).

3. Si se emplea el método cuantitativo de VDRL en lámina de cuatro quintos de volumen (método B), se debe utilizar una aguja de calibre más pequeño (con punta o sin ella) que rinda 75 gotas de emulsión de antígeno por ml. En el Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas se usa una aguja de calibre 19, sin punta. La práctica permitirá dar salida rápidamente a la emulsión de antígeno, pero se deberá tener gran cuidado que las gotas sean siempre del mismo tamaño.

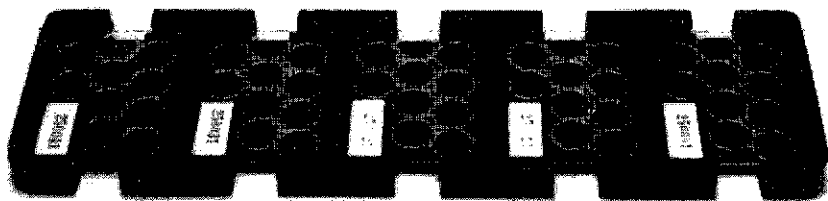


Fig. 2. Láminas y soporte de láminas para reacciones cualitativas

4. Cuando se guarde la emulsión de antígeno, antes de volverla a usar deberá mezclarse suavemente imprimiendo un movimiento de rotación al frasco y llenando y vaciando la jeringa.

Análisis Preliminar de la Emulsión de Antígeno

1. Cada preparación de emulsión de antígeno deberá ser primero examinada mediante el análisis de sueros de reactividad conocida, en las zonas Reactiva, Débilmente Reactiva y No Reactiva. Esto se puede realizar con el método descrito en "Reacción Cualitativa VDRL en Lámina, con Suero" (pág. 90). Dichos análisis deberán dar resultados típicos y las dimensiones y número de partículas de antígeno en el suero No Reactivo deben ser óptimos.

2. Sólo se usarán aquellas emulsiones de antígeno que hayan producido las reacciones debidas en las pruebas realizadas con sueros de control (Reactivo, Débilmente Reactivo y No Reactivo). Si las partículas de antígeno en los análisis de suero No Reactivo son demasiado grandes, la razón puede estar en la forma de preparar la emulsión de antígeno, aunque también pueden influir otros factores.

3. No debe usarse una emulsión de antígeno insatisfactoria.

Reacción Cualitativa VDRL en Lámina, con Suero

1. Deposítense 0,05 ml. de suero calentado en un anillo de parafina de la lámina de vidrio.
2. Añádase una gota ($\frac{1}{60}$ de ml.) de emulsión de antígeno sobre cada suero.
3. Háganse rotar las láminas durante 4 minutos. (Si la máquina de rotación mecánica circunscribe un círculo de $\frac{3}{4}$ de pulgada de diámetro, ella se deberá ajustar a 180 r.p.m.. La rotación a mano debe circunscribir un círculo de 2 pulgadas de diámetro, 120 veces por minuto.)
4. Léanse las reacciones inmediatamente después de la rotación.

Nota: Siempre se incluirán sueros de control de reactividad escalonada (Reactivo, Débilmente Reactivo, y No Reactivo) durante un período de análisis, a fin de asegurar la adecuada reactividad de la emulsión de antígeno en el momento de efectuar las reacciones.

Lectura e Informe de los Resultados de las Reacciones Cualitativas en Lámina

1. Las reacciones serán leídas microscópicamente, con objetivo débil, a 100 \times de aumento. En estas condiciones las partículas de antígeno aparecen en forma de bastoncitos cortos.

El conglomerado de estas partículas en grumos grandes o pequeños se interpreta como grados de reactividad.

<i>Lectura</i>	<i>Informe</i>
No hay grumos o sólo hay muy ligera floculación.....	No Reactivo (NR)
Pequeños grumos.....	Débilmente Reactivo (DR)
Grumos medianos y grandes.....	Reactivo (R)

2. Las *reacciones zonales*, debidas a un exceso del componente Reactivo del suero, son reconocidas por grumos irregulares poco compactos. El resultado Reactivo habitual se caracteriza por la presencia de grumos pequeños o grandes de tamaño bastante uniforme. La experiencia permitirá diferenciar entre este tipo de reacciones y el aspecto zonal, en que los grumos grandes y/o pequeños pueden estar entremezclados con partículas libres de antígeno. Una reacción zonal se informa como Reactiva. En algunos casos este efecto zonal puede ser tan pronunciado que llegue a producirse un resultado Débilmente Reactivo con un suero fuertemente Reactivo. *Por lo tanto se recomienda que todos los sueros que produzcan resultados Débilmente Reactivos en la reacción cualitativa sean analizados de nuevo, usando el procedimiento cuantitativo, antes de dar un informe de la reacción VDRL en lámina.* Cuando se obtiene un resultado Reactivo con alguna dilución de un suero que sólo produjo antes resultado Débilmente Reactivo con suero no diluido, se informará como Reactivo (véase "Lectura e Informe de los Resultados de las Reacciones Cuantitativas en Lámina", pág. 94 en "Reacciones Cuantitativas VDRL en Lámina, con Suero").

Reacciones Cuantitativas VDRL en Lámina, con Suero

Todos los sueros que produzcan resultados Reactivo o Débilmente Reactivo en la reacción cualitativa VDRL en lámina deben ser analizados de nuevo cuantitativamente por uno de los dos procedimientos que se designan como reacciones cuantitativas A o B. Como ambos procedimientos, en la mayoría de los casos, requieren mediciones directas del suero y de la solución salina, cualquiera de los dos métodos es satisfactorio en cuanto a sus requisitos de tiempo de personal y cantidad de cristalería empleada. Ya que la reacción cuantitativa A requiere diluciones de suero de 1:2,5, 1:5, 1:10, etc., la reacción B ha sido agregada como alternativa para aquellos laboratorios que descan una suero-dilución de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc.

REACCION A CUANTITATIVA VDRL EN LAMINA

1. Colóquense cuatro láminas de vidrio de 2 x 3 pulgadas, conteniendo 12 anillos de parafina de 14 mm., en un soporte que tenga sitio para 5 láminas (véase fig. 3, pág. 92).

2. Dispóngase una lámina de vidrio con dos tiras paralelas de cinta adhesiva en el espacio central del soporte de láminas.

Los números para identificar los sueros que se van a analizar (cuatro en las dos láminas que van por encima de la lámina numerada, y cuatro en las dos láminas inferiores) se anotan en las tiras adhesivas.

3. Prepárese una dilución al 1:10 de cada suero que se va a examinar cuantitativamente agregando 0,1 ml. del suero calentado a 0,9 ml. de la solución salina al 0,9 por ciento, usando una pipeta de 0,2 ml. graduada en 0,01 ml.

4. Mézclese perfectamente el suero y la solución salina y déjese reposar la pipeta en el tubo de ensayo.

5. Usando esta pipeta de 0,2 ml. pásense cantidades de 0,05 ml., 0,02 ml. y 0,01 ml. de la dilución al 1:10 del primer suero a los anillos cuarto, quinto y sexto, respectivamente.

6. Con la misma pipeta colóquense cantidades de 0,05 ml., 0,02 ml. y 0,01 ml. del primer suero, no diluido, en el primero, segundo y tercer anillos, como se muestra en la figura 3.

7. Repítase este procedimiento con cada suero y su correspondiente dilución al 1:10 hasta que se hayan colocado los ocho sueros sobre las láminas.

8. Añádase verticalmente una gota (0,03 ml.) de solución salina al 0,9 por ciento al segundo y quinto anillos de cada suero, por medio de una aguja hipodérmica de calibre 15² adaptada a una jeringa de vidrio.

9. Agréguese verticalmente una gota (0,04 ml.) de solución salina al 0,9 por ciento al tercero y sexto anillos de cada uno de los ocho sueros, por

² Debe revisarse el tamaño de las gotas entregadas por las agujas.

Anillo No.	Suero No.				Reacción A Cuantitativa			Reacción B Cuantitativa		
	1	2	3	4	Suero (ml.)	Solución salina (ml.)	Diluciones de suero	Suero (ml.)	Solución salina (ml.)	Diluciones de suero
1					0,05	0	1:1 (No diluido)	0,04	0	1:1 (No diluido)
2					,02	,03	1:2,5	,02	,02	1:2
3					,01	,04	1:5	,01	,03	1:4
4					(diluido 1:10) ,05	0	1:10	(diluido 1:8) ,04	0	1:8
5					,02	,03	1:25	,02	,02	1:16
6					,01	,04	1:50	,01	,03	1:32
	1	2	3	4	Números del suero					
	5	6	7	8						
1					,05	0	1:1 (No diluido)	,04	0	1:1 (No diluido)
2					,02	,03	1:2,5	,02	,02	1:2
3					,01	,04	1:5	,01	,03	1:4
4					(diluido 1:10) ,05	0	1:10	(diluido 1:8) ,04	0	1:8
5					,02	,03	1:25	,02	,02	1:16
6					,01	,04	1:50	,01	,03	1:32
	5	6	7	8	Suero No.					

FIG. 3. Láminas y soportes de láminas para reacciones cuantitativas

medio de una jeringa a la que se haya adaptado una aguja de calibre 13.³ Las seis mezclas de cada suero equivalen entonces a diluciones de 1:1 (no diluida), 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:25, y 1:50.

10. Imprímase a las láminas un movimiento de rotación suave, a mano, durante unos 15 segundos, a fin de mezclar el suero y la solución salina.

11. Agréguese una gota ($\frac{1}{60}$ ml.) de emulsión de antígeno a cada anillo, usando una jeringa con aguja, en la forma que se describe en la técnica para la reacción cualitativa de suero en lámina (pág. 90).

En la figura 3 se presenta esta forma de preparar las diluciones agregando suero y solución salina directamente a las láminas.

12. Complétense las reacciones mediante la rotación de las láminas en la forma indicada para la "Reacción Cualitativa VDRL en Lámina, con Suero" (pág. 90).

13. Léanse los resultados microscópicamente. La dilución más alta de suero que dé resultado Reactivo (no Débilmente Reactivo) se informa como la reactividad final del suero, esto es, Reactivo en dilución al 1:25, o Reactivo en 25 dils.

14. Si todas las diluciones de suero analizadas dan resultados Reactivos, prepárese una dilución al 1:100 de aquel suero, diluyendo 0,1 ml. de la solución de suero al 1:10 con 0,9 ml. de solución salina al 0,9 por ciento.

15. Deposítense cantidades de 0,05 ml., 0,02 ml., y 0,01 ml. de esta dilución de suero al 1:100 en cada anillo y agréguese una cantidad suficiente de solución salina para obtener volúmenes totales de 0,05 ml. En esta forma resultan diluciones de suero al 1:100, 1:250, y 1:500. Examínense esas diluciones en la misma forma en que se analizan aquellas más bajas.

REACCION B CUANTITATIVA VDRL EN LAMINA

1. Colóquense cuatro láminas de vidrio de 2 x 3 pulgadas, con 12 anillos de parafina cada una, en un soporte que tenga lugar para 5 láminas (véase fig. 3), y dispóngase una lámina numerada en el espacio central, exactamente en la forma descrita en "Reacción A Cuantitativa en Lámina" (págs. 91-93).

2. Prepárese una solución al 1:8 de cada suero, agregando 0,1 ml. del suero calentado a 0,7 ml. de la solución salina al 0,9 por ciento mediante una pipeta de 0,2 ml. graduada en 0,01 ml.

3. Mézclese perfectamente el suero y la solución salina y déjese reposar la pipeta en el tubo de ensayo.

4. Usando esta pipeta pásese 0,04 ml., 0,02 ml., y 0,01 ml. del suero diluido al 1:8 a los anillos de parafina cuarto, quinto y sexto, respectivamente.

5. Con la misma pipeta pásese 0,04 ml., 0,02 ml. y 0,01 ml. del suero no diluido a los anillos de parafina primero, segundo y tercero, respectivamente.

6. Repítase este procedimiento con todos los sueros, y sus correspondientes

³ Debe revisarse el tamaño de las gotas entregadas por las agujas,

diluciones al 1:8, hasta que se hayan colocado las ocho muestras en las láminas en sus correspondientes lugares numerados.

7. Añádanse dos gotas (0,01 ml. en cada gota) de solución salina al 0,9 por ciento al segundo y quinto anillos de cada suero por medio de una aguja hipodérmica de calibre 23,⁴ adaptada a una jeringa de vidrio, que esté en posición vertical.

8. Añádanse en la misma forma 3 gotas, de igual tamaño, de solución salina al 0,9 por ciento al tercero y sexto anillos de cada suero.

9. Háganse rotar las láminas suavemente, a mano, durante unos 15 segundos, para mezclar el suero y la solución salina.

10. Agréguese una gota ($\frac{1}{75}$ ml.) de la emulsión de antígeno a cada anillo, usando una jeringa con aguja de tamaño adecuado. (*Advertencia.*—Nótese que la cantidad de emulsión de antígeno usada en este método ha sido reducida a $\frac{1}{75}$ ml. a fin de que corresponda con el volumen reducido de suero 0,04 ml.).

11. Complétense las reacciones en la forma descrita en "Reacción Cualitativa VDRL en Lámina, con Suero" (pág. 90) y léanse los resultados microscópicamente inmediatamente después de la rotación.

Con este método las diluciones de cada suero son: 1:1 (no diluido), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32.

12. Si todas las diluciones de suero analizado producen resultado Reactivo, prepárese una dilución al 1:64 de aquel suero en solución salina. Para ello agréguese siete partes de solución salina a una parte de la dilución de suero al 1:8 y análicese en tres cantidades como se hizo con las diluciones de suero al 1:8. Las diluciones preparadas a base de la dilución al 1:64 serán entonces equivalentes a: 1:64, 1:128, y 1:256.

Lectura e Informe de los Resultados de la Reacción Cuantitativa en Lámina

1. Léanse las reacciones microscópicamente con un aumento de 100 X, en la forma descrita para el procedimiento cualitativo, (pág. 90).

2. Infórmense los resultados en términos de la mayor dilución de suero que produce un resultado Reactivo (no Débilmente Reactivo), de acuerdo con los siguientes ejemplos:

Suero no diluido	Diluciones de suero				Informe
	1:2,5	1:5	1:10	1:25	
R	DR	NR	NR	NR	Reactivo, solamente sin diluir, ó 1 dil.
R	R	DR	NR	NR	Reactivo, en dilución al 1:2,5 ó 2,5 dils.
R	R	R	DR	NR	Reactivo, en dilución al 1:5, ó 5 dils.

⁴ Debe verificarse el tamaño de las gotas entregadas por las agujas. Puede también repartirse la solución salina usando una aguja calibre 19 (0,02 ml. por gota) y una aguja calibre 15 (0,03 ml. por gota).

Método B

Suero no diluido	Diluciones de suero				Informe
	1:1	1:2	1:4	1:8	
R	DR	NR	NR	NR	Reactivo, solamente sin diluir, ó 1 dil.
R	R	DR	NR	NR	Reactivo, en dilución al 1:2, ó 2 dils.
R	R	R	DR	NR	Reactivo, en dilución al 1:4, ó 4 dils.

R = Reactivo. DR = Débilmente Reactivo. NR = No Reactivo.

Nota: En condiciones de alta temperatura y baja humedad, que a veces se presentan durante el verano en ciertas áreas, la emulsión de antígeno se puede conservar en el refrigerador, pero se debe volver a la temperatura ambiente antes de usarla. Para evitar que en esas condiciones se seque la superficie, los análisis se deben terminar y leer lo antes posible. Pueden emplearse cubiertas para láminas, que contengan un papel secante húmedo.

REACCIONES DE FLOCULACION VDRL EN TUBO, CON SUERO (3)

Equipo

1. Agitador mecánico de Kahn (debe ser operado entre 275 y 285 oscilaciones por minuto).
2. Una lámpara fluorescente o tipo cuello de ganso para la lectura.

Reactivos

1. Antígeno. (Antígeno para reacción de floculación VDRL en lámina, véase pág. 86)
2. Soluciones salinas
 - a. Solución salina tope al 1 por ciento. (Se prepara del mismo modo que para las reacciones de floculación VDRL en lámina, pág. 86).
 - b. Solución de cloruro de sodio no tamponada, al 1 por ciento. Agréguese 1 gm. de cloruro de sodio seco (A.C.S.) a cada 100 ml. de agua destilada.

Preparación de los Sueros

1. El suero claro, obtenido por centrifugación, de sangre total coagulada se calienta en baño de María a 56°C. durante 30 minutos, antes de ser analizado.
2. Todos los sueros deben ser examinados al ser sacados del baño de María y aquellos que contienen partículas de impurezas serán nuevamente centrifugados.
3. Los sueros que se examinen más de 4 horas después de haber sido calentados serán sometidos de nuevo a 56°C. durante 10 minutos.

Preparación de la Emulsión de Antígeno

1. Prepárese la emulsión de antígeno en la forma descrita para las reacciones de floculación VDRL en lámina (véanse págs. 87-88).
2. Añádase cuatro partes de solución de cloruro de sodio al 1 por ciento a 1 parte de la emulsión para la reacción VDRL en lámina. Mézclase bien y déjese en reposo durante 5 minutos o más (no más de 2 horas) antes del uso. Esta solución se denominará "emulsión diluida de antígeno," y debe estar en suspensión en el momento de usarse.

Reacción Cualitativa VDRL en Tubo, con Suero

1. Colóquese 0,5 ml. de suero calentado en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm. (diámetro exterior).
2. Añádase 0,5 ml. de emulsión diluida de antígeno a cada suero.
3. Agítense los tubos en un agitador de Kahn durante 5 minutos.
4. Centrifúguense todos los tubos durante 10 minutos con fuerza equivalente a 2.000 r.p.m. en una centrífuga I.E.C.⁵ N° 2, con cabeza horizontal.
5. Llévense de nuevo los tubos al agitador de Kahn y agítense exactamente durante 1 minuto.

Nota: Inclúyanse sueros de control Reactivo y No Reactivo en todas las series de análisis.

Lectura e Informe de los Resultados de la Reacción Cualitativa en Tubo

1. Léanse las reacciones *tan pronto como se haya completado el segundo período de agitación*, sosteniendo los tubos cerca de la pantalla de una lámpara de lectura, frente a un fondo negro, y aproximadamente al nivel de los ojos. Una fuente de luz satisfactoria para la lectura la constituye una lámpara fluorescente de escritorio o una lámpara tipo cuello de ganso con foco azul.
2. Anótense los resultados en la siguiente forma:

Reactivo.....	Conglomerados visibles en un medio claro o ligeramente turbio. Todas las reacciones límites, en las que el observador tenga dudas en relación con la visibilidad de la floculación, deberán ser informadas como No Reactivas.
No Reactivo.....	No hay floculación o conglomerado visible de las partículas de antígeno. Apariencia ligeramente turbia o granulosa; aspecto de moaré cuando se hace agitación suave.

Nota: Los sueros turbios o hemolizados pueden producir, una vez completada

⁵ International Equipment Co., Boston, Mass.

la reacción, un aspecto demasiado turbio para la lectura macroscópica, siendo por consiguiente muestras inapropiadas para este análisis.

Las reacciones zonales, debidas a un exceso de componente Reactivo del suero, pueden aparecer como muy débiles y en raros casos como No Reactivas. Cuando se sospeche una reacción zonal deberá hacerse otro análisis usando 0,1 ml. de suero calentado y 0,4 ml. de solución salina, en lugar de los 0,5 ml. de suero. Si se obtiene un resultado Reactivo con la cantidad más pequeña de suero, deberá darse el informe como Reactivo.

Reacción Cuantitativa VDRL en Tubo, con Suero

1. Colóquese 0,5 ml. de solución salina al 0,9 por ciento recientemente preparada en cada uno de 5 ó más tubos de ensayo (12 x 75 mm.), omitiendo el primer tubo.
2. Añádase 0,5 ml. de suero calentado al primero y segundo tubos. (Se puede omitir el primer tubo si se ha efectuado la reacción cualitativa VDRL en tubo y no se dispone de suficiente suero.)
3. Mézclase y pásese 0,5 ml. del segundo tubo al tercero.
4. Continúese mezclando y pasando 0,5 ml. de cada tubo al próximo hasta llegar al último tubo.
5. Mézclase y deséchese 0,5 ml. del último tubo.
6. Añádase 0,5 ml. de emulsión diluida de antígeno a cada tubo y procédase en la forma descrita en "Reacción Cualitativa VDRL en Tubo, con Suero" (pág. 96).

Lectura e Informe de los Resultados de la Reacción Cuantitativa en Tubo

La mayor dilución de suero que produce una reacción claramente Reactiva es informada como el punto final de reactividad, de acuerdo con los siguientes ejemplos:

Suero no diluido	Diluciones de suero				Informe
	1:1	1:2	1:4	1:8	
R	NR	NR	NR	NR	Reactivo, solamente sin diluir, ó 1 dil.
R	R	R	NR	NR	Reactivo, en dilución al 1:4, ó 4 dils.
R	R	R	R	NR	Reactivo, en dilución al 1:8, ó 8 dils.

R = Reactivo. NR = No Reactivo.

REACCIONES VDRL CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (4)

Equipo

1. Agitador mecánico de Kahn (debe ser operado entre 275 y 285 oscilaciones por minuto).

Reactivos

1. Antígeno. (Antígeno para la reacción de floculación VDRL en lámina, véase pág. 86)
2. Soluciones salinas
 - a. Solución salina tope al 1 por ciento. (Prepárese en la misma forma que para las reacciones de floculación VDRL en lámina, pág. 86.)
 - b. Solución de cloruro de sodio al 10 %

Disuélvanse 10 gramos de cloruro de sodio seco (A.C.S.) en 100 ml. de agua destilada.

Preparación del Líquido Céfalorraquídeo

1. Centrifúguese y decántese cada líquido céfalorraquídeo. Las muestras visiblemente contaminadas o que contienen sangre no son satisfactorias para la prueba.
2. Caliéntese el líquido céfalorraquídeo a 56°C. durante 15 minutos. Déjese enfriar a la temperatura ambiente antes de analizarlo.

Preparación de la Emulsión de Antígeno Sensibilizada

1. Prepárese la emulsión de antígeno como se describe para las reacciones de floculación VDRL en lámina (véase "Preparación de la Emulsión de Antígeno" págs. 87-88).
2. Añádase un volumen de solución de cloruro de sodio al 10 % a un volumen de la emulsión para la reacción VDRL en lámina.
3. Mézclese bien y déjese reposar por lo menos durante 5 minutos, pero no más de dos horas, antes de usarse.

Reacción Cualitativa VDRL con Líquido Céfalorraquídeo

1. Depótese 1 ml. de líquido céfalorraquídeo calentado en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm.

Inclúyanse líquidos céfalorraquídeos controles Reactivos y No Reactivos en cada serie de análisis.
2. Añádase 0,2 ml. de emulsión de antígeno sensibilizada a cada líquido céfalorraquídeo.

Vuélvase a suspender la emulsión de antígeno sensibilizada, inmediatamente antes de usarla, invirtiendo el frasco varias veces.
3. Agítense las gradillas con los tubos en un agitador mecánico de Kahn durante 15 minutos.

4. Centrifúguense todos los tubos durante 5 minutos con fuerza equivalente a 1.800 r.p.m. en una centrífuga I.E.C.⁶ N° 1, ó a 1.600 r.p.m. en la No. 2.
5. Llévase nuevamente los tubos al agitador de Kahn y agítense durante 2 minutos exactos.

Lectura e Informe de los Resultados de la Reacción Cualitativa

1. Léanse las reacciones tan pronto como sea posible después del segundo período de agitación, sosteniendo los tubos cerca de la pantalla de una lámpara de escritorio y contra un fondo negro.

Nota: Cada tubo será sostenido inmóvil o agitado ligeramente durante la lectura. Debe evitarse la agitación excesiva.

2. Infórmense los resultados del siguiente modo:

- | | |
|------------------|--|
| Reactivo..... | Conglomerados claramente visibles, suspendidos en un medio acuoso, claro o turbio. |
| No Reactivo..... | No hay conglomerados; dispersión completa de las partículas; aspecto turbio o ligeramente granuloso. |

Reacción Cuantitativa VDRL con Líquido Céfalorraquídeo

Las reacciones cuantitativas se realizan con todo líquido céfalorraquídeo que haya resultado Reactivo en el análisis cualitativo.

1. Prepárense las diluciones del líquido céfalorraquídeo en la siguiente forma:

- a. Colóquese 1 ml. de solución de cloruro de sodio al 0,9 por ciento en cada uno de 5 ó más tubos.
- b. Añádase 1 ml. de líquido céfalorraquídeo calentado al tubo 1, mézclese bien y pásese 1,0 ml. al tubo 2.
- c. Continúese mezclando y pasando de un tubo al siguiente hasta que el último contenga 2,0 ml. Deséchese 1,0 ml. del último tubo. Las proporciones respectivas de las diluciones son 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc.

2. Análcese cada dilución de líquido céfalorraquídeo en la forma descrita en "Reacción Cualitativa VDRL con Líquido Céfalorraquídeo" (pág. 98).

Lectura e Informe de los Resultados de la Reacción Cuantitativa

1. Cada tubo será leído en la forma descrita en "Reacción Cualitativa VDRL con Líquido Céfalorraquídeo."

⁶ International Equipment Company, Boston, Mass.

2. Infórmense los resultados del análisis en términos de la dilución más alta de líquido céfalorraquídeo que dé un resultado Reactivo. El término "dils", que expresa el mismo punto final de reactividad en la dilución, puede ser también aplicado.

Ejemplo:

<i>Dilución del líquido céfalorraquídeo</i>					<i>Informe</i>
<i>1:2</i>	<i>1:4</i>	<i>1:8</i>	<i>1:16</i>	<i>1:32</i>	
NR	NR	NR	NR	NR	Reactivo, ¹ solamente sin diluir, ó 1 dil.
R	R	R	NR	NR	Reactivo, en dilución al 1:8, ó 8 dils.
R	R	R	R	NR	Reactivo, en dilución al 1:16, ó 16 dils.

R = Reactivo. NR = No Reactivo.

¹ Resultado Reactivo en la reacción cualitativa con líquido céfalorraquídeo no diluido.

Referencias Bibliográficas

- (1) HARRIS, A.; ROSENBERG, A. A.; RIEDEL, L. M.: A microfloculation test for syphilis using cardiolipin antigen. Preliminary report. J. Ven. Dis. Inform., 27: 169-174, julio, 1946.
- (2) HARRIS, A.; ROSENBERG, A. A.; DEL VECCHIO, E. R.: The VDRL slide flocculation test for syphilis. II. A supplementary report. J. Ven. Dis. Inform., 29: 72-75, marzo, 1948.
- (3) HARRIS, A.; ROSENBERG, A. A.; DEL VECCHIO, E. R.: A macrofloculation test for syphilis using cardiolipin-lecithin antigen. J. Ven. Dis. Inform., 29: 313-316, octubre, 1948.
- (4) ROSENBERG, A. A.; HARRIS, A.; HARDING, V. L.: A macrofloculation spinal fluid test employing cardiolipin-lecithin antigen. J. Ven. Dis. Inform., 29: 359-361, diciembre, 1948.

Apéndice

Recolección y Preservación de Sangre de Carnero

Los glóbulos rojos de carnero pueden ser demasiado resistentes o demasiado susceptibles a la acción hemolítica del complemento y de la hemolisina. Puesto que el nivel de reactividad de una prueba de fijación del complemento está influida por la calidad de los glóbulos de carnero utilizados, se deberá prestar especial atención a este componente de la prueba. Los efectos de la contaminación bacteriana en la reactividad de los glóbulos de carnero no se pueden predecir y, por tanto, se recomienda usar únicamente sangre recogida en forma aséptica en recipientes estériles, cuando se utilice para la prueba de fijación del complemento.

Puede ocurrir que los corpúsculos rojos de determinado carnero sean excepcionalmente resistentes a la acción hemolítica del complemento y de la hemolisina. Por ello, cuando se recolecte sangre de uno de estos animales que no ha sido sometido a prueba, se deberán efectuar titulaciones comparadas de complemento y amboceptor, empleando para ello glóbulos de calidad aceptable provenientes de otro carnero.

Cuando una suspensión salina de glóbulos lavados, preparada según una técnica determinada, muestra cualquier grado de hemólisis al guardarse toda la noche a una temperatura de 6° a 8°C., es indicación de que los glóbulos rojos son demasiado frágiles para ser utilizados.

La única conducta que se recomienda, en cualquiera de estos casos, es la de rechazar los glóbulos que no sean satisfactorios y obtener una nueva provisión de sangre de carnero.

El método que a continuación se detalla para recolectar y preservar la sangre de carnero (1, 2) ha sido usado en el Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas durante varios años con resultados satisfactorios.

Equipo y Cristalería

1. Matraz Erlenmeyer de 2 litros para la sangría, cerrado con un tapón de goma N° 10 con 2 perforaciones; embudo filtro (1 pulgada de diámetro y con vástago de 2½ pulgadas); tubos de goma y de vidrio, y aguja hipodérmica calibre 13 (fig. 1).
2. Equipo para repartir, consistente en tubos de goma, pinza, frasco-ampolla para el llenado, y tubo filtro para el aire (fig. 2).

Reactivo

I. Solución de citrato de sodio al 3,8 por ciento

Disuélvase 3,8 gm. de citrato de sodio (A.C.S.) para cada 100 ml.

de agua destilada. Sesenta ml. de esta solución son necesarios para cada 50 ml. de sangre de carnero recolectada.

Ajuste del Frasco de Sangría

1. Márquese con un lápiz grueso, en el frasco de 2 litros, una señal en los 880 ml. de volumen. Esto servirá para recoger 400 ml. de sangre en 480 ml. de solución citratada. Pueden ser calculadas de igual modo proporciones más pequeñas.

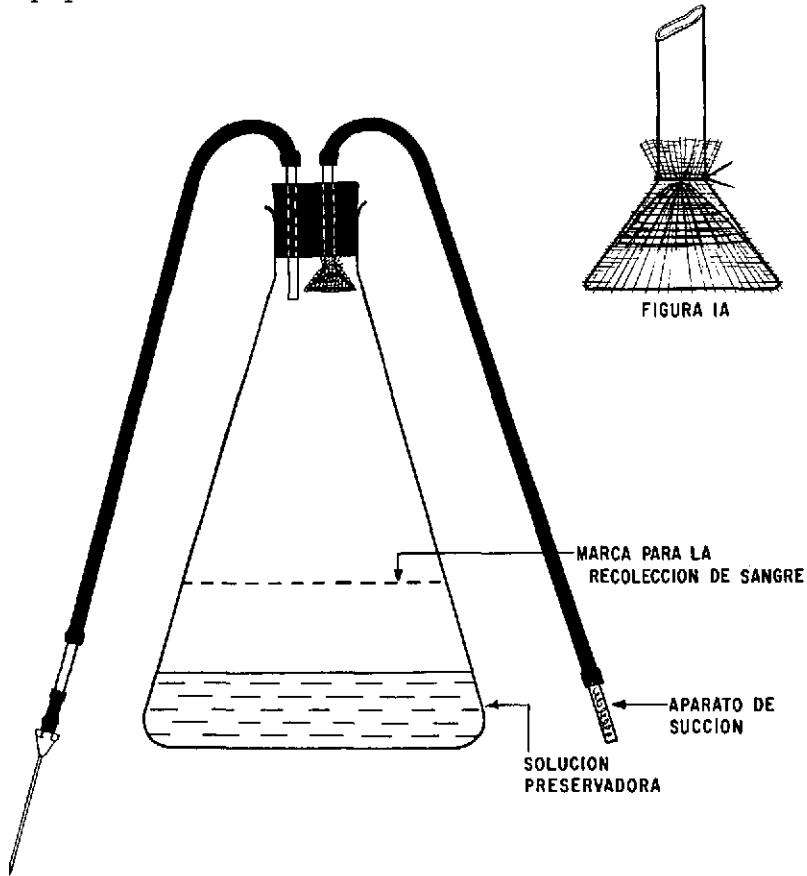


Figura 1. Frasco de sangría

2. Viértase dentro del frasco 480 ml. de solución de citrato de sodio al 3,8 por ciento.
3. Córtese un pedazo pequeño de rejilla de alambre y colóquese en el embudo. Sujétese un trozo de gasa sobre la boca del embudo como se muestra en la figura 1a.
4. Ajústese el matraz de sangría en la forma mostrada en la figura 1, insertando el tapón en el frasco y sujetándolo con cuerdas.
5. Esterilícese todo el conjunto a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Recolección de la Sangre

1. Inmovilícese al carnero en posición de pie.
2. Levántesele la cabeza hasta que la nariz y el centro del cuello formen una línea recta.

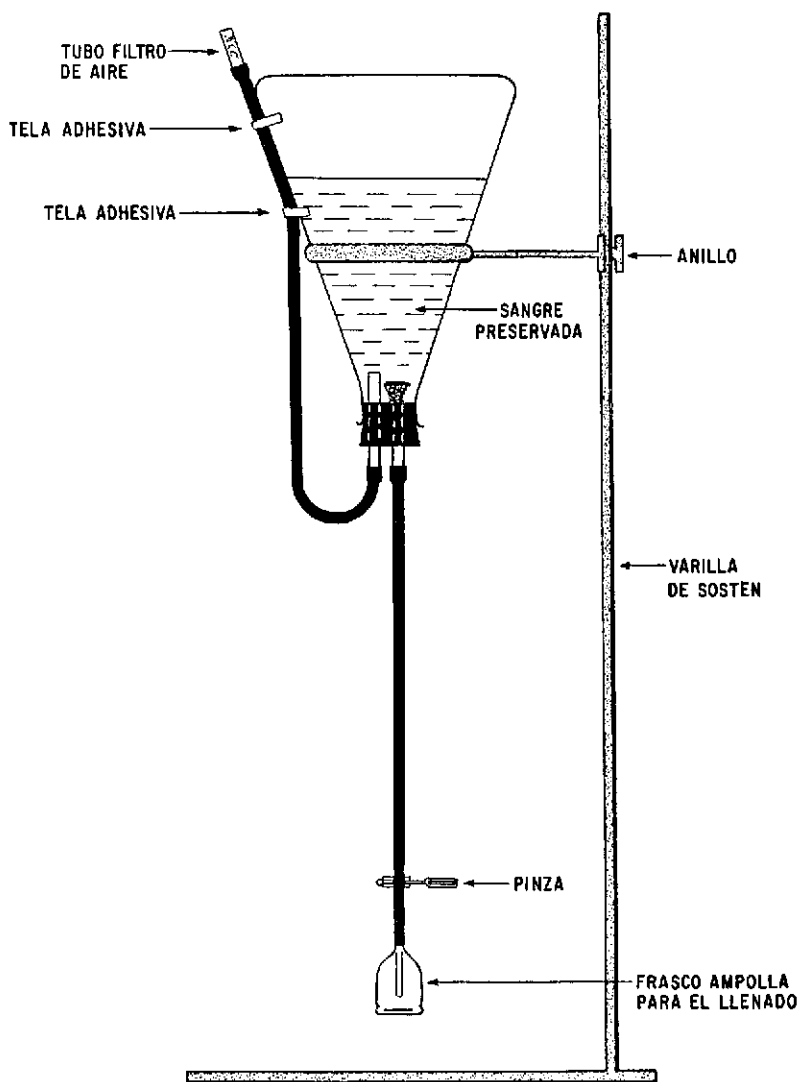


Figura 2. Aparato de distribución

3. Vuélvase la cabeza del carnero ligeramente y córtese la lana en el área de la punción.
4. Hágase presión con el dedo sobre las vértebras cervicales para causar la dilatación de la vena yugular externa.

5. Esterilícese el área directamente colocada sobre la vena con solución débil de yodo o con alcohol al 70 por ciento.
6. Hágase presión con el dedo inmediatamente debajo del punto en el que se va a hacer la punción, e insértese la aguja estéril en la piel y después en la vena.
7. Muévase el frasco continuamente durante la recolección de la sangre y después durante 5 minutos para evitar la coagulación.
8. Déjese enfriar la sangre a la temperatura ambiente (23° a 29°C.)
9. Reemplácese el aparato de vidrio para la succión por el frasco-ampolla previamente esterilizado, en la forma que se muestra en la fig. 2. Reemplácese igualmente la aguja hipodérmica por un pedazo de tubo de vidrio estéril, que se llena de algodón también estéril colocado sin apretar (tubo-filtro de aire, fig. 2).
10. Inviértase y suspéndase el frasco en la forma mostrada en la figura 2.
11. Repártase asépticamente la sangre en botellas estériles con tapón de goma y guárdese las en el refrigerador.
12. Sáquese la mezcla de sangre de esos frascos con jeringa y aguja estériles a medida que se requiera.

Nota: La sangre de carnero de buena calidad, recolectada y guardada en la forma descrita, es satisfactoria para el uso por un período de más de tres meses.

Preparación de la Hemolisina (Glóbulos Rojos de Carnero)

El siguiente método (3) ha dado resultados constantemente satisfactorios en la producción de hemolisina anticarnero de alto título. La sangre total de carnero se inyecta intracutáneamente a conejos, seguida de inoculación intravenosa de células de carnero lavadas. En el curso de las inyecciones se usa sangre de varios carneros.

1. Elijanse seis u ocho conejos jóvenes de tamaño mediano, que pesen unos 2 kg. cada uno.
2. Procédase a desfibrinar con cuentas de vidrio una pequeña cantidad de sangre de carnero.
3. Adminístrese a cada conejo una serie de cinco inyecciones intracutáneas de sangre total de carnero, día por medio, comenzando con una dosis de 0,5 ml. y aumentando cada vez 0,5 ml. Véase cuadro I.
4. Prepárese una suspensión de células de carnero al 20% lavando perfectamente los glóbulos rojos con una solución salina al 0,85 por ciento, a la que se agrega sulfato de magnesio al 0,01 por ciento (véase "Reactivos, solución salina," *Reacciones de Kolmer*, pág. 55).
5. Adminístrense dos inyecciones intravenosas de 1 ml. de suspensión de

Cuadro I. Plan de Inyecciones

Día	Dosis	Vía de inoculación	Material inyectado
	<i>(ml.)</i>		
1	0,5	Intracutánea	Sangre total
3	1,0	Intracutánea	Sangre total
5	1,5	Intracutánea	Sangre total
7	2,0	Intracutánea	Sangre total
9	2,5	Intracutánea	Sangre total
12	1,0	Intravenosa	Células lavadas al 20%
15	1,0	Intravenosa	Células lavadas al 20%
18	sangrado de prueba		

glóbulos de carnero al 20 por ciento tres días después de haberse aplicado la última inyección de sangre total de carnero. Véase cuadro 1.

6. Las sangrías de prueba se hacen, comenzando 3 días después de la segunda inyección intravenosa, por punción de la vena marginal de la oreja con un estilete y recolectando en un tubo pequeño aproximadamente 1,0 ml. de sangre.

7. El suero se separa por centrifugación después que la coagulación se ha completado.

8. Cada suero de conejo se titula, en cuanto a su contenido de hemolisina, por el método descrito en la técnica de fijación de complemento de Kolmer (págs. 59-63).

9. Desángrense los conejos que tengan una unidad de titulación de hemolisina en la dilución al 1:5.000 ó mayor.

10. Sepárense los sueros de los coágulos, mézclense y presérvense por medio de la adición de un volumen igual de glicerina.

En el Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas se conserva la hemolisina por liofilización. Se deshidratan partes alícuotas de 4 ml. que se sellan en una atmósfera de nitrógeno y se guardan en el refrigerador. Para usarla, se abre una ampolleta y la hemolisina desecada se disuelve en 4 ml. de agua destilada. El material reconstituido se disuelve aún más con un volumen igual de glicerina y se guarda en el refrigerador.

11. Repítanse las inyecciones intravenosas de células lavadas al 20% en los conejos que muestren título bajo de hemolisina, como se describe en el párrafo 5, y continúese después en la forma indicada en los párrafos 6, 7, 8, 9 y 10.

La solución madre de hemolisina glicerinada (50 por ciento) se puede conservar a la temperatura del refrigerador por largos períodos de tiempo con poca pérdida de reactividad. Se observará una disminución más rápida del título en las soluciones de hemolisina diluida. Cuando la disminución de título es considerable o se observa precipitado en la hemolisina diluida, se

debe desechar este reactivo y prepararlo de nuevo a partir de la hemolisina madre.

Pueden también causar una rápida disminución del título de la hemolisina, el complemento, las células de carnero o las soluciones salinas que se usan. En estos casos se deben hacer pruebas comparativas para determinar cuál es el reactivo deficiente.

Preparación y Preservación del Complemento

La sangre de cobayo puede poseer actividad de complemento inferior al mínimo o superior al máximo prescrito. Los bajos títulos de complemento pueden ser producidos por inadecuada alimentación o alojamiento de los animales o, más comúnmente, debido a la pérdida de reactividad durante la conservación del suero de cobayo. El suero-complemento, conservado en forma líquida (con la adición de preservativo) a temperatura de refrigeración o en estado congelado, debe estar debidamente protegido contra la desecación parcial como resultado de la evaporación. Las cantidades alícuotas suficientes para un día de uso se deben colocar en recipientes apropiados, a fin de evitar la destrucción del complemento debido a los deshielos y congelaciones repetidas.

Algunos técnicos se engañan al restituir el suero-complemento deshidratado a sólo la mitad o a las dos terceras partes del volumen original, y omitiendo luego el factor de concentración del suero al calcular la dilución del complemento. En esta forma, el suero subestándar puede aparecer adecuadamente reactivo. Dicha práctica, que se usa para evadir las restricciones técnicas, no es aconsejable.

Los sueros de cobayos individuales pueden poseer complemento en título más alto que el óptimo para algunas técnicas. La mezcla de suero de varios cobayos evita de ordinario esta condición.

Los antígenos de cardioplipina-lecitina están libres de la fracción causante de la fijación no específica del complemento a baja temperatura. El ensayo previo de los sueros de cobayo y el uso de la clara de huevo se omiten, por lo tanto, cuando se emplea esta clase de antígeno.

Preparación

1. Escójanse tres o más cobayos grandes y sanos, machos.
2. Con jeringa y aguja extráiganse 5 ml. de sangre del corazón y colóquense en tubos individuales numerados.
3. Después que la sangre ha coagulado a la temperatura ambiente, despréndase del tubo con un aplicador de madera y manténgase en refrigeración por lo menos durante una hora.
4. Centrifúguese y sepárese del coágulo el suero claro.

5. Mézclense los sueros de todos los tubos, centrifúguense de nuevo y guárdense.

O,

6. Si hay que desangrar a los animales, se deben atontar primero para anestesiarlos, luego se cortan las venas yugulares externas y se recoge la sangre en placas de Petri o en tubos de centrífuga de 50 ml.

7. Déjese coagular durante 1 hora a temperatura ambiente.

8. Despréndase el coágulo de la pared del recipiente y sométase a refrigeración durante una o dos horas.

9. Decántese el suero y fíltrese por gasa; luego centrifúguese, mézclese el suero claro, y almacénese.

Conservación

Método 1.—Se deshidrata el suero-complemento congelado, al vacío, por los métodos de liofilización o “cryochem”.¹

Método 2.—Se agrega una parte igual de la siguiente solución al suero-complemento:

Acetato de sodio.....	12 gm.
Acido bórico.....	4 gm.
Agua destilada esterilizada.....	100 ml.

Para el uso, dilúyase 1 ml. de suero-complemento conservado con 14 ml. de solución salina para preparar una dilución al 1:30. Consérvese en el refrigerador.

Método 3.—Agréguese 1,0 gm. de cloruro de sodio por cada 10 ml. de suero de cobayo. Consérvese bajo refrigeración.

Método 4.—Congélese el suero-complemento y manténgase en estado congelado hasta que vaya a usarse.¹

Uso del Mertiolato como Bacteriostático

Las muestras de suero o de líquido céfallo-raquídeo muy contaminadas no son satisfactorias para los análisis serológicos destinados a investigar sífilis. Los efectos sobre los resultados serológicos de la contaminación bacteriana de los líquidos orgánicos no son previsibles.

Aun cuando el líquido céfallo-raquídeo es obtenido de ordinario con un cuidado razonable, por lo que se refiere a su esterilidad, muchos líquidos remitidos por correo a los laboratorios centrales, especialmente durante los meses calurosos del año, muestran a su llegada evidencia de gran con-

¹ En el laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas se agregan 2 gm. por ciento de acetato de sodio (A.C.S.) al suero-complemento antes de la deshidratación o almacenaje en estado congelado.

taminación bacteriana. La eliminación de las bacterias en los líquidos céfalorraquídeos contaminados mediante la centrifugación o la filtración es infectiva, ya que algunos de los productos del metabolismo bacteriano son solubles y los cambios producidos en los componentes del líquido céfalorraquídeo original no pueden ser corregidos o compensados.

El uso del mertiolato como agente bacteriostático para la preservación del líquido céfalorraquídeo ha sido dado a conocer (4). Este compuesto (etil-mercuritio-salicilato de sodio)² inhibe el crecimiento bacteriano sin intervenir en el mecanismo de los análisis serológicos usuales para investigar sífilis, ya sea a través de acción química o por la introducción de un factor de dilución. Además, su presencia no afecta a los resultados obtenidos con los métodos turbidimétricos para determinar la proteína total en los líquidos céfalorraquídeos. Sin embargo, la prueba de inmovilización del *Treponema pallidum* (TPI) y algunos de los procedimientos de análisis químico, como el micro-Kjeldahl y el equivalente de tirosina, no se pueden realizar satisfactoriamente cuando este compuesto se halla presente en el líquido céfalorraquídeo o en el suero. También la reacción del oro coloidal puede sufrir alteración por el mertiolato.

Los tubos con mertiolato para la recolección de muestras pueden prepararse en la siguiente forma:

1. Prepárese la cantidad necesaria de solución de mertiolato el día en que vaya a ser usada, por adición de 1 gm. de polvo de mertiolato para cada 100 ml. de agua destilada. No deben usarse las tinturas o soluciones comerciales ya preparadas.
2. Deposítense 0,1 ml. de solución acuosa de mertiolato al 1 por ciento en el fondo de tubos de 13 x 100 mm.
3. Colóquense los tubos en un desecador al vacío sobre cloruro de calcio, a temperatura ambiente y protegidos de la luz. La deshidratación termina habitualmente en 24 horas o menos, si se obtiene un vacío adecuado.
4. Prepárense corchos parafinados sumergiéndolos en parafina caliente, pero no humeante, durante un minuto, y elimínese el exceso de parafina de los corchos haciéndolos rodar sobre una tela mientras están calientes.
5. Sáquense los tubos del desecador y tápselos herméticamente con los corchos parafinados.
6. Guárdense los tubos en la obscuridad. En esas condiciones podrán ser usados durante varios meses.

La concentración de mertiolato que se obtiene cuando se añade a estos tubos de 2,0 ml. a 8,0 ml. de líquido céfalorraquídeo es suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano.

Los tubos más pequeños (12 x 75 mm.), preparados en esta forma y que

² Ely Lily and Co., Indianapolis, Inc.

contienen 1 mg. de mertiolato, son adecuadas para el envío de 2,0 ml. a 4,0 ml. de suero.

Determinación Cuantitativa de la Proteína del Líquido Céfalorraquídeo (5, 6)

Equipo

1. Colorímetro fotoeléctrico.
2. Cubetas para colorímetro fotoeléctrico, capaces de contener volúmenes de 5 ml. o menos.

Cristalería

1. Tubos de ensayo, 13 x 100 mm. (dimensiones exteriores).

Reactivos

1. Solución de ácido tricloroacético al 10 por ciento

Disuélvase 10 gm. de ácido tricloroacético (C.P.) en 100 ml. de agua destilada. Filtrese en frascos con tapón de cristal y consérvese a la temperatura ambiente.

2. Suero estándar

Escójase suero que esté libre de marcada contaminación bacteriana o hemólisis, y determínese la concentración total de proteína por medio del análisis Kjeldahl.

Preparación del Líquido Céfalorraquídeo

Centrifúguese y decántese el líquido céfalorraquídeo. Los líquidos que presentan contaminación visible o considerable cantidad de sangre no resultan satisfactorios para el análisis.

Ejecución de la Prueba

1. Colóquense con pipeta 2,5 ml. de líquido céfalorraquídeo³ en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm.

Cada vez que se ejecuta la prueba debe incluirse una solución de proteína de concentración conocida.

2. Agréguese 2,5 ml. de solución de ácido tricloroacético al 10%.

3. Inviértase el tubo dos veces para mezclar el contenido. Evítese hacer espuma.

³ Las cantidades menores de líquido céfalorraquídeo se pueden analizar en la misma proporción, siempre que el colorímetro fotoeléctrico empleado sea adaptable al uso de cubetas más pequeñas.

4. Déjese el tubo en reposo durante 10 minutos en baño de María a 37°C.
5. Inviértase de nuevo el tubo y váciase el líquido en la cubeta del colorímetro fotoeléctrico.
6. Determínese el porcentaje de trasmisión de la luz en una longitud de onda de 420 mu. con la muestra en estudio, usando un tubo de control con agua a una trasmisión de 100 por ciento.
7. Conviértase el porcentaje de trasmisión de la muestra en estudio a miligramos por ciento de proteína total, usando una gráfica de calibración.

Nota: Si los líquidos céfalorraquídeos contienen concentraciones de proteína mayores de 60 mg. por ciento, se deben diluir adecuadamente con solución de cloruro de sodio al 0,9 por ciento y analizarlos de nuevo. Los valores obtenidos de la gráfica de calibración se multiplican entonces por el factor de dilución.

Preparación de la Gráfica de Calibración

1. Prepárense soluciones de proteína al 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg. por ciento, a partir del suero estándar.

Ejemplo:

Si el contenido de proteína del suero (Kjeldahl) es de 7325 mg. por ciento, para encontrar el factor de dilución para el estándar de 60 mg. por ciento se divide 7325 por 60.

$$\frac{7325}{60} = 122 \text{ ó sea el factor de dilución.}$$

Por lo tanto, una parte de suero se diluye en 121 partes de solución de cloruro de sodio al 0,9 por ciento para hacer una solución estándar de 60 mg. por ciento.

2. Analícese cada solución estándar en la misma forma descrita para el líquido céfalorraquídeo (véase *Ejecución de la Prueba*, pág. 109).
3. Trasládense los valores de trasmisión de la luz así obtenidos a papel semilogarítmico.
4. Trácese una línea a través de los puntos de la gráfica.
5. Se puede también preparar una tabla de conversión que contenga los valores totales de proteína para cada posible lectura de trasmisión de luz.

Referencias Bibliográficas

- (1) PORTNOY, J.; BOSSAK, H. N.; HARRIS, A.: Preservation of sheep red cells for complement-fixation tests. I. An improved method. *J. Ven. Dis. Inform.*, 28: 137-141, julio, 1947.
- (2) BOSSAK, H. N.: An apparatus for the aseptic collection and dispensing of sheep blood. *Am. J. Clin. Path.*, 19: 496-498, mayo, 1949.
- (3) DARTER, L. A.: Procedure for production of anti-sheep hemolysin. *J. Lab. and Clin. Med.*, 41: 653-654, abril, 1953.

- (4) HARRIS, A.; MAHONEY, J. F.: Merthiolate as an effective bacteriostatic agent in spinal fluid specimens. Ven. Dis. Inform., 25: 46, febrero, 1944.
- (5) BOSSAK, H. N.; ROSENBERG, A. A.; HARRIS, A.: A quantitative turbidimetric method for the determination of spinal fluid protein. J. Ven. Dis. Inform., 30: 100-103, abril, 1949.
- (6) HARDING, V. L.; HARRIS, A.: The effect of temperature variants on quantitative turbidimetric determinations of spinal fluid protein using trichloroacetic acid. J. Ven. Dis. Inform., 30: 325-327, noviembre, 1949.