

PRUEBA V.D.R.L. EN PORTAOBJETOS*

SERORREACCIÓN PARA LA SÍFILIS

(Cualitativa y Cuantitativa)

Antígeno.—Se prepara este antígeno en alcohol absoluto con 0.03% de cardiolipina, aproximadamente 0.27% de lecitina purificada y 0.9% de colesterol. Los dos primeros porcentajes son equivalentes gravimétricos calculados por medio de ensayos químicos, pero cada lote del antígeno debe ser serológicamente estandarizado por comparación adecuada con un antígeno conocido, y envasado en frascos con tapa de rosca recubierta interiormente con papel de estaño o vinilita, conservados a la temperatura ambiente y en la oscuridad. Los componentes de este antígeno permanecen en solución a temperaturas hasta de 0° C, de modo que cualquier precipitación que se observe indica alteraciones debidas a otros factores tales como evaporación o la presencia de sustancias agregadas por las pipetas. En consecuencia debe desecharse todo antígeno que contenga precipitado.

Suero.—El suero debe ser claro, obtenido por centrifugación de sangre total coagulada, y calentado a 56° C durante 30 minutos, antes de la prueba. Todos los sueros se examinan al ser retirados del baño de María, centrifugando nuevamente aquellos que contengan partículas extrañas. Cuando la reacción se verifica después de 4 horas de haber sido inactivados los sueros, es necesario recalentarlos a 56° C durante 10 minutos.

Solución salina.—La solución salina amortiguada conteniendo 1% de cloruro de sodio se prepara en la siguiente forma:

Formaldehido neutro, (pureza de reactivo).....	0.1 ml
Fosfato de sodio, secundario (Na ₂ HPO + H ₂ O).....	0.093 gm
Fosfato de potasio, primario (KH ₂ PO ₄).....	0.170 “
Cloruro de sodio, A.C.S.....	10.0 “
Agua destilada.....	1,000 ml

Esta solución da lecturas en el potenciómetro de pH 6.0 ± 0.1 y debe conservarse en frascos con tapón de rosca o de cristal.

Portaobjetos.—Se emplean portaobjetos de vidrio (de 5 x 7.5 cm) con anillos de parafina de un diámetro interior de 15 mm aproximadamente, según la descripción de Kline.¹ Los portaobjetos nuevos son lavados con jabón Bon-Ami, limpiándolos después de secos con una tela suave. Los portaobjetos previamente usados pueden utilizarse de

* Traducido por la Oficina Sanitaria Panamericana, del Venereal Disease Laboratory, U. S. Marine Hospital, Staten Island 4, New York.

¹ Kline, B. S.: Reacciones de precipitación microscópica en portaobjetos para el Diagnóstico y Exclusión de la Sífilis. Williams y Wilkins, Baltimore, Md.

nuevo quitándoles la parafina, lavándolos con jabón y agua abundante, tratándolos entonces como si fueran portaobjetos nuevos. Debe tenerse la precaución de manejarlos por los bordes, a fin de evitar huellas digitales grasientas en la superficie. El suero debe extenderse con facilidad dentro de los anillos de parafina, y si no se extiende es indicación de que el portaobjetos no está limpio y por consiguiente no debe usarse. Los anillos se hacen transfiriendo parafina fundida a los portaobjetos por medio de moldes metálicos. (La casa A. H. Thomas, de Filadelfia, Pa., fabrica dispositivos especiales para hacer anillos de parafina para uso manual, o automáticos eléctricos.)

Preparación de la emulsión de antígeno.—Con una pipeta se transfieren 0.4 cc. de solución salina amortiguada al fondo de un frasco redondo, con tapón de cristal o de rosca. Se agregan gota a gota (con rapidez, sin intervalos prolongados entre gota y gota), 0.5 ml del antígeno, de la porción inferior de una pipeta de 1.0 cc (graduada hasta la extremidad) directamente sobre la solución salina, mientras se hace girar el frasco suave y continuamente sobre una superficie plana. (El extremo de la pipeta debe mantenerse en el tercio superior del frasco y la rotación no debe ser tan vigorosa como para pringar la punta de la pipeta.) Se sopla la última gota de antígeno de la pipeta, sin tocar la solución salina y se continúa la rotación durante 10 segundos más. Por medio de una pipeta de 5 ml se agregan 4.1 ml de solución salina amortiguada, se tapa bien el frasco y se agita vigorosamente de arriba a abajo durante unos 10 segundos. La emulsión de antígeno queda así lista para usarse, pudiendo emplearse durante todo el día. Esta cantidad (5.0 ml) es suficiente para unas 250 reacciones serológicas. Puede prepararse de una sola vez doble cantidad de emulsión de antígeno, utilizando un frasco de 30 ml y empleando doble cantidad de antígeno y de solución salina. Para agregar los 8.2 ml de solución salina debe usarse una pipeta de 10 ml. De requerirse una cantidad mayor de antígeno deberá prepararse en lotes separados, los que pueden mezclarse y ensayarse después.

Ensayo preliminar de la emulsión de antígeno.—Cada lote de emulsión de antígeno debe ser primero comprobado empleando sueros positivos y negativos conocidos, agregando una gota de emulsión a 0.05 ml de cada suero, completándose la reacción en la forma descrita más adelante bajo Reacción Serológica Cualitativa. Esas reacciones deben dar resultados típicamente positivos y negativos, respectivamente, y el número de partículas de antígeno por campo microscópico debe ser óptimo.

Calibración de la aguja.—El número de partículas de antígeno por campo microscópico se determina por el tamaño de la gota de antígeno usada, por cuya razón es necesario calibrar diariamente la aguja de la jeringuilla que se emplea para distribuir el antígeno: La emulsión se

distribuye con una aguja hipodérmica calibre 23 de bisel largo, adaptada a una jeringuilla de 1.0 ó 2.0 ml, que se deja reposar dentro del frasco de emulsión cuando no está en uso. Cada ml de emulsión de antígeno da un número aproximado de 60 gotas, lo que se logra sosteniendo la jeringuilla a tal inclinación, que el bisel de la aguja quede para abajo y la superficie a gotear horizontalmente al bisel. Al aumentar el ángulo al cual se sostiene la jeringuilla, el tamaño de las gotas disminuye.

La práctica permitirá hacer la distribución de la emulsión en forma rápida, teniendo cuidado que las gotas sean siempre del mismo tamaño. Cuando la emulsión de antígeno ha estado en reposo por algún tiempo, debe agitarse suavemente antes de usarla, imprimiéndole al frasco un movimiento de rotación y llenando y vaciando la jeringuilla.

Técnica de la reacción cualitativa:

(1) Depositense 0.05 ml de suero calentado dentro de uno de los anillos parafinados del portaobjetos con una pipeta.

(2) Agréguese una gota (aproximadamente 1/60 ml) de emulsión de antígeno a cada suero.

(3) Imprímase al portaobjetos un movimiento de rotación durante cuatro minutos.

(Si se hace a mano sobre una superficie plana, el movimiento debe circunscribirse más o menos a un círculo de 5 cm 120 veces por minuto mecánicamente. Puede utilizarse también para esta prueba el Rotador Boerner fabricado por Arthur H. Thomas, de Filadelfia, Pa., ajustado a 180 revoluciones por minuto.)

(4) Las reacciones se leen inmediatamente después de la rotación.

Nota: Se deben incluir siempre controles conocidos positivos, débilmente positivos y negativos.

Lectura e informe de los resultados.—Las reacciones se leen microscópicamente con un objetivo de bajo poder (100X). A ese aumento las partículas de antígeno aparecen como bastoncillos cortos, y la agrupación de esas partículas en grumos, grandes o pequeños, es interpretada como grados de positividad.

<i>Lectura</i>	<i>Interpretación</i>
No hay grumos	Negativa (N)
Muy leve aspereza	
Grumos pequeños	Débilmente positiva (DP)
Grumos medianos y grandes	Positiva (P)

A fin de obtener la lectura e interpretación correctas de los resultados, es necesario que el técnico tenga experiencia y conozca perfectamente las diferentes técnicas empleadas, pero se pueden usar equivalentes aproximados para describir las semejanzas entre la lectura de esta prueba y otras reacciones similares. La escala débilmente positiva de esta prueba comprende grumos semejantes a los clasificados como \pm y $+$, y la

positiva a ++, +++ o ++++ de otras técnicas microscópicas, recomendándose, sin embargo, que no se empleen esos signos para informar los resultados de esta reacción.

Las reacciones de zona debidas a un exceso de reagina en el suero se reconocen por la irregularidad y poca cohesión de los grumos. La reacción positiva corriente está caracterizada por grumos, grandes o pequeños, de tamaño más o menos uniforme, y la experiencia permitirá al laboratorista diferenciar entre ese tipo de reacción y el aspecto de la reacción de zona en que se encuentran grumos grandes y/o pequeños, mezclados con partículas libres de antígeno.

Cuando se observe o sospeche una reacción de zona, debe diluirse el suero 1-5 y 1-25 y repetirla. La reacción máxima producida por cualquiera de esas diluciones, si es más intensa que la obtenida con el suero sin diluir, es considerada como el resultado de la reacción. Las diluciones pueden prepararse colocando 0.4 ml de solución salina en cada uno de dos tubos de ensayo y agregando 0.1 ml de suero calentado al tubo 1, mezclando bien y transfiriendo 0.1 ml al tubo 2.

Reacción cuantitativa.—Las reacciones cuantitativas se hacen con sueros diluidos en serie en solución salina, tratando cada dilución como si fuera un suero individual, y aplicando la técnica descrita para la reacción cualitativa. Para las diluciones se emplea solución salina al 0.9% fresca, y se colocan 0.5 ml de solución salina en cada uno de seis o más tubos: al tubo 1 se agregan 0.5 ml de suero calentado, se mezcla bien y se transfieren 0.5 ml al tubo 2, continuándose la operación hasta que el sexto tubo contenga 1 ml. Así se obtienen diluciones al 1-2, 1-4, 1-8, 1-16, etc.

Se ensaya cada dilución y aquella en que se produzca una reacción positiva (no débilmente positiva), es interpretada como la reactividad final, de acuerdo con el siguiente ej.:

<i>Diluciones de suero</i>						<i>Informe</i>
1-2	1-4	1-8	1-16	1-32	1-64	
P	P	P	DP	N	N	Positivo—Dilución al 1-8
P	DP	N	N	N	N	Positivo—Dilución al 1-2
DP	N	N	N	N	N	Positivo—Solamente sin diluir*

* Reacción positiva obtenida con suero sin diluir.

Si se desean otros patrones cuantitativos, pueden prepararse diluciones de suero al 1-5, 1-10, 1-20, etc., ensayándolas y rindiendo el informe de la manera indicada anteriormente.

NOTA: Bajo condiciones de temperatura elevada y poca humedad, como sucede a veces durante los meses de verano en ciertas zonas, se conservará el antígeno en el refrigerador.

Para evitar evaporaciones de la superficie en esas condiciones se terminarán y leerán las pruebas tan rápidamente como sea posible.