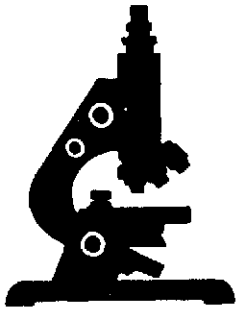


INDEXED



manual de reacciones  
serológicas  
para el diagnóstico de

LA SIFILIS

1964



ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD  
Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la  
ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

1966

INDEXED

# **MANUAL DE REACCIONES SEROLOGICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA SIFILIS—1964**



Publicación Científica No. 144

Noviembre de 1966

**ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD**  
Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la  
**ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD**  
525 Twenty-third Street, N.W.  
Washington, D.C. 20037, E.U.A.

Edición original en inglés

*Serologic Tests for Syphilis, 1964*

Con la colaboración de los serólogos, autores de las reacciones, este Manual fue preparado en el Laboratorio de Investigación sobre Enfermedades Venéreas, Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de América, Atlanta, Georgia, E.U.A.

Esta publicación reemplaza el *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis* (ediciones de 1955 y 1959) y *Laboratory Procedures for Modern Syphilis Serology* (Publicación No. 988 del Servicio de Salud Pública, E.U.A., 1962).

*La Oficina Sanitaria Panamericana tradujo al español el presente manual con autorización del Servicio de Salud Pública, Secretaría de Salud, Educación y Bienestar, de los Estados Unidos de América.*

Las marcas de fábrica se mencionan sólo con fines de identificación, sin que ello constituya aprobación por parte del Servicio de Salud Pública y la Secretaría de Salud, Educación y Bienestar de los Estados Unidos de América, y la Organización Panamericana de la Salud.

# SUMARIO

	<i>Página</i>
Introducción .....	1
Información general .....	3
Equipo general .....	9
Preparación y empleo de los sueros control.....	10
Reacción de anticuerpos treponémicos fluorescentes-200 (ATF-200)...	13
Reacciones de Hinton.....	20
Reacciones estándar de Hinton con suero.....	22
Reacción rápida de Hinton con suero.....	24
Reacciones de Kline.....	25
Reacciones de Kline con antígeno de lecitina natural y cardiolipina (LNC) con suero.....	25
Reacciones de Kline con antígeno de lecitina sintética y cardiolipina (LSC) con suero.....	30
Reacciones de Kolmer.....	33
Reacciones cualitativas de Kolmer con suero y líquido cefalorraquídeo .....	41
Reacciones cuantitativas de Kolmer con suero y líquido cefalorraquídeo .....	44
Reacciones de Kolmer al quinto de volumen.....	48
Reacciones cualitativas de Kolmer al quinto de volumen con suero ..	53
Reacciones cuantitativas de Kolmer al quinto de volumen con suero ..	56
Reacciones de Mazzini.....	58
Reacción del plasmacrito (PPC).....	62
Determinación cuantitativa de proteína del líquido cefalorraquídeo.....	65
Reacción de fijación del complemento con proteína de Reiter (FCPR) (véase Reacción KPR).....	68
Reacción de inmovilización del <i>Treponema pallidum</i> -200 (ITP-200).....	69
Reacción de reagina en suero no calentado (RSNC).....	87
Reacciones VDRL .....	91
Reacciones VDRL en lámina con suero y líquido cefalorraquídeo...	91
Reacciones VDRL en tubo con suero y líquido cefalorraquídeo.....	101
Apéndice .....	107
Reacción Davies-Hinton con líquido cefalorraquídeo.....	107
Reacciones estándares de Kahn con suero y líquido cefalorraquídeo ..	107
Reacción de Kahn con cardiolipina y suero.....	107
Reacciones de Kline con líquido cefalorraquídeo.....	107
Reacciones de Mazzini con líquido cefalorraquídeo.....	107
Reacción rápida de reagina en plasma (RRP) con plasma.....	107

## SUMARIO (cont.)

### Apéndice (cont.)

Reacción de fijación del complemento con <i>Treponema pallidum</i> 50 (fctp 50) con suero .....	108
Reacción VDRL en lámina (Método cuantitativo A) con suero .....	108
Reacción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (ATF-ABS)— Procedimiento de absorción con suero .....	108
Reacción rápida de reagina en plasma (RRP), en tarjeta, con plasma .....	108
Reacción rápida de reagina en plasma (RRP) (círculo), en tarjeta, con suero .....	108

---

## INTRODUCCION

---

En la Asamblea de Directores de Laboratorio y Serólogos que se reunió en Hot Springs, Arkansas, 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) formuló las siguientes recomendaciones.

“Uno de los factores que más contribuyen a que no se sigan las técnicas originales es el hecho de que muchos serólogos y técnicos de serología no se mantienen al corriente de los progresos que se realizan. Es imprescindible que se abandonen los métodos anticuados. Una causa de dificultades ha sido la publicación de nuevas y convenientes modificaciones de la 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 subsanar esta deficiencia, la Comisión recomienda la publicación, en todo detalle, 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 ordinariamente se emplean en este país. Se recomienda que se encargue de esta publicación el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de América, en colaboración con los autores de los métodos adecuados . . .”.

Dichas recomendaciones se han llevado a cabo mediante la publicación de manuales de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis, en forma del Suplemento 9 (1939), Suplemento 11 (1940) y Suplemento 22 (1949) del *Journal of Venereal Disease Information*; de la Gráfica VD 85 (1944); del *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis* (edición de 1955, *Publicación Científica de la OPS* 30, 1957, y edición de 1959, *Publicación Científica de la OPS* 47, 1960); de *Laboratory Procedures for Modern Syphilis Serology*, julio de 1961, y de la Publicación No. 988 (noviembre de 1962) con el mismo título, del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de América.

Para determinar las reacciones que debían incluirse en la edición de 1964 se siguieron las recomendaciones que el Consejo Consultivo Nacional de Serología (National Advisory Serology Council) formuló en su reunión de julio de 1963. De las reacciones no treponémicas se incluyeron solamente las que utilizan cardiolipina como antígeno. En el Apéndice se enumeran las reacciones de uso menos extenso publicadas en el *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis* (*Publicación Científica de la OPS* 47, revisión de 1959), junto con otras que aún no han sido objeto de una evaluación completa y con procedimientos experimentales de interés. Se

aconsejó que no se incluyeran nuevas reacciones en el Manual hasta que hubiesen sido publicadas por sus autores, sometidas a una adecuada evaluación y publicadas en una revista de renombre, por uno o más investigadores que no fueran ni el autor ni sus colaboradores. Se recomendaron marcas de índice de colores diferentes para distinguir las reacciones treponémicas (amarillo), las no treponémicas (verde), las de finalidad especial (rojo) e información diversa (blanco).

Con objeto de continuar estos servicios y proporcionar un documento de consulta para las necesidades actuales de programas de ensayo y control, de acuerdo con lo expresado por los miembros de la Asociación de Directores de Laboratorios de Salud Pública Estatales y Territoriales (Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors), el Laboratorio de Investigación sobre Enfermedades Venéreas, del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de América, ha colaborado con los serólogos, autores de las reacciones, en la recopilación de datos para este nuevo Manual.

La aplicación de estas reacciones serológicas al diagnóstico y tratamiento de la sífilis se define en *La sífilis: Diagnóstico y tratamiento modernos* (Publicación Científica de la OPS 56, 1961).

---

## INFORMACION GENERAL

---

Existen numerosos factores, tales como equipo, reactivos, volúmenes, períodos de tiempo, temperaturas y orden de los procedimientos, que influyen en los resultados de los análisis. Cada uno de estos factores probablemente tiene igual importancia y ninguno de ellos se puede descuidar impunemente. Los técnicos que hacen cambios arbitrarios en los métodos recomendados deben asumir plena responsabilidad de los resultados del análisis.

Además, se recomienda enérgicamente que se hagan comprobaciones dentro del laboratorio y en comparación con otros laboratorios. Esas comprobaciones comprenden el empleo diario de sueros control de títulos conocidos de reactividad, lecturas periódicas de verificación para mantener uniformidad en las lecturas realizadas por el personal del laboratorio, y la comparación de los resultados obtenidos en los especímenes para evaluación con los de un laboratorio de referencia.

Aun cuando las reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis no son completamente específicas, y algunos sueros son Reactivos en una prueba y No Reactivos en otra, el análisis de los resultados serológicos discordantes, ya sea en términos de diagnóstico o de pronóstico, es responsabilidad exclusiva del médico. Los resultados de los análisis serológicos válidos son responsabilidad del técnico, y sólo se obtienen a) cuando se utilizan reactivos estandarizados y controles adecuados; b) cuando se siguen estrictamente las recomendaciones técnicas, y c) cuando se consignan los resultados en la forma especificada para cada procedimiento.

### Equipo

El equipo debe mantenerse limpio y en buen estado de funcionamiento. Es menester comprobar la temperatura de los baños de María cada vez que se usen. De igual modo, debe verificarse diariamente la temperatura del refrigerador por medio de un termómetro colocado en la parte donde están las gradillas para las pruebas. También 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 horas).

Cada vez que se utilicen las máquinas rotatorias y los agitadores, el técnico debe revisar la velocidad de estos y no permitir una variación notable en las velocidades prescritas.



Las centrífugas deben estar provistas de tacómetros a fin de comprobar y controlar la velocidad. El interior de las centrífugas se limpiará de vez en cuando para evitar que caigan partículas de polvo en las muestras.

Se comprobará diariamente el volumen correcto de depósito de las pipetas automáticas. Si fuese necesario hacer algún nuevo ajuste, se debe recoger y medir en un cilindro graduado y certificado un volumen de 25 ó 50 depósitos de la pipeta.

### Preparación y calibración de agujas hipodérmicas para uso en reacciones de floculación en lámina

1. Practíquese una muesca profunda en la aguja justamente por encima del bisel.

2. Rómpase la punta de la aguja con alicates.

3. Utilizando una jeringa de 1 ml ó 2 ml que contenga el material a emplear, revísese la aguja contando el número de gotas en 1 ml de reactivo. Las gotas deben dejarse caer fácilmente del extremo de la aguja. La aguja y la jeringa deben mantenerse en *posición perpendicular* a la superficie de la mesa.

Reacción	Reactivo	Calibre de la aguja	Tamaño de gota requerida, ml	No. de gotas depositadas por ml de reactivo
Kline	Suspensión de antígeno	22 ó 25	0,007 ó 1/140	140 ± 2
Mazzini	Suspensión de antígeno	21	0,010 ó 1/100	100 ± 2
Mazzini	Solución salina al 0,9%	13	0,050 ó 1/20	20 ± 1
PPC	Suspensión de antígeno	23 ó 25	0,010 ó 1/100	100 ± 2
RSNC	Suspensión de antígeno	18	0,022 ó 1/45	45 ± 1
VDRL	Suspensión de antígeno	18	0,017 ó 1/60	60 ± 2
VDRL	Suspensión de antígeno	19	0,014 ó 1/75	75 ± 2
VDRL	Solución salina al 0,9%	23	0,010 ó 1/100	100 ± 2
VDRL	Suspensión de antígeno sensibilizada	21 ó 22	0,010 ó 1/100	100 ± 2

4. Las agujas que *no* satisfagan las especificaciones indicadas deben ser ajustadas antes de usarse, a fin de que rindan los volúmenes correctos.

5. Si la aguja deposita demasiadas gotas por mililitro, la abertura de la extremidad es demasiado pequeña y debe abrirse con un instrumento puntiado, por ejemplo, el extremo afilado de una lima triangular.

6. Si la aguja deposita un número insuficiente de gotas por mililitro, la abertura es demasiado grande y tiene que ajustarse aplastando ligeramente los bordes de la aguja hacia adentro o limándolos.

7. Una vez calibrados, deben protegerse los extremos de las agujas para que no goteen en el piso, en el sumidero o en el fondo de los frascos.

8. Se deben examinar las agujas *todos los días* antes de usarse y, en caso necesario, ajustarlas.

9. Las agujas y jeringas deben limpiarse enjuagándolas con agua, alcohol y acetona. Después de limpiarla, quítese la aguja de la jeringa.

## **Cristalería**

En los laboratorios serológicos debe usarse sólo cristalería que ha sido limpiada químicamente. En los tubos y pipetas de los que no se han eliminado completamente las soluciones de proteína se forma una película de color pardo. Esta película generalmente puede eliminarse mediante inmersión en una mezcla bicrómica durante un mínimo de 4 horas.

Cuando se empleen para el lavado soluciones, ya sean alcalinas o ácidas, se debe hacer un enjuague esmerado a fin de eliminar todo vestigio de las soluciones limpiadoras. Se recomienda que para el enjuague final se use agua destilada. Mediante la inspección diaria de un determinado número de recipientes de cristalería con soluciones indicadoras se evitará que la cristalería contaminada químicamente llegue al laboratorio de análisis.

La cristalería empleada para cada reacción debe satisfacer las especificaciones recomendadas. Para medir reactivos y muestras deben emplearse pipetas y cilindros de tamaño y graduación apropiados. Deberán ser desechados y reemplazados los tubos, láminas o pipetas que se hayan desportillado o rayado en forma tal que dificulten la lectura de los resultados.

## **Reactivos**

### **Antígenos**

1. En todas las reacciones no treponémicas para el diagnóstico de la sífilis descritas en este Manual, se emplean antígenos de cardiolipina-lecitina. La cardiolipina y la lecitina purificada (excepto la lecitina sintética que se emplea en una de las reacciones de Kline, véase pág. 30) a las que se hace referencia en este texto, son productos que se han aislado y purificado por métodos publicados (1) y que satisfacen las normas de análisis químico y serológico establecidas por la Organización Mundial de la Salud.<sup>1</sup> En la mayoría de los casos, se ha visto que resulta más práctico y económico comprar antígenos de cardiolipina que producirlos mezclando sus diversos componentes y haciendo después la comprobación serológica necesaria.

2. Los antígenos empleados en las reacciones treponémicas para el diagnóstico de la sífilis se deben preparar y estandarizar de acuerdo con las instrucciones señaladas para cada reacción en particular.

<sup>1</sup> *Farmacopea Internacional*, Primera Edición, Vol. II. Ginebra, 1955.

3. De cada nuevo lote de antígeno deben realizarse pruebas comparativas con un antígeno estándar en reacciones cualitativas y cuantitativas con suero y líquido cefalorraquídeo, antes de utilizar el nuevo antígeno para trabajo de rutina. Las pruebas deben efectuarse con arreglo a las técnicas descritas en el actual Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis. Es necesario realizar las pruebas comparativas *en distintos días y no en uno solo*, y las diferencias de reactividad entre los dos antígenos sometidos a prueba no deben ser superiores a las obtenidas con suspensiones duplicadas de antígeno estándar.

### **Productos químicos**

Los productos químicos, tales como cloruro de sodio, colesterol, etc., deben ser de calidad analítica y satisfacer las especificaciones de la técnica del procedimiento. Cuando se emplean productos químicos de calidad inferior pueden obtenerse resultados falsos.

### **Agua destilada**

Si no se limpia con la frecuencia necesaria el destilador o el recipiente en que se conserva el agua destilada, esto puede dar lugar a que el agua sea de mala calidad. La clase de agua de grifo y el número de horas que funciona el destilador por día determinarán la frecuencia de la limpieza. El pH y la conductividad, determinados periódicamente, indican con fidelidad la pureza del agua destilada. Para almacenarse, el agua destilada debe colocarse en recipientes de vidrio duro, herméticamente cerrados, para evitar alteraciones debidas al paso de iones del vidrio y a la absorción de gases que se encuentran en el laboratorio. Es preferible emplear agua recientemente destilada.

### **Soluciones salinas**

El cloruro de sodio para soluciones salinas debe desecarse en una estufa de aire durante 30 minutos a 160°-180°C, a fin de eliminar la humedad absorbida. Debe evitarse 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 no tener que pesarlo diariamente. Las sales se disuelven en agua destilada y la solución se agita muy bien para asegurar una mezcla perfecta. Si se almacena, la solución debe colocarse en recipientes de vidrio duro herméticamente cerrados para evitar alteraciones.

### **Temperatura ambiente**

La temperatura a la cual se ejecutan las reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis *afecta en grado diverso* el resultado de las mismas. Algunas reacciones deben practicarse a las temperaturas indicadas de baño

de María o de refrigeración. Para obtener resultados uniformes se recomienda realizar otras reacciones a la temperatura ambiente, entre 23° y 29°C (73° a 85°F).

### **Notificación de los resultados de las reacciones serológicas**

De acuerdo con las recomendaciones del Consejo Consultivo Nacional de Serología (National Advisory Serology Council) en su informe de 1953 al Cirujano General del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de América, los términos *Reactivo*, *Débilmente Reactivo* y *No Reactivo* sustituyen a los términos *Positivo*, *Débilmente Positivo o Dudoso* y *Negativo*, al consignar el resultado de las reacciones.

Al notificar el resultado de las reacciones cuantitativas, se recomienda (2) expresar el título final en términos de la mayor dilución en la cual la muestra que se analiza produce un resultado Reactivo, y utilizar el término *dils*, que es una contracción de la palabra "diluciones", para identificar este punto final de la dilución reactiva. Por este medio, las reacciones de idéntica intensidad se consignarán de igual manera, en términos de *dils*, cuando se empleen distintos métodos de análisis.

### **Uso del mertiolato como bacteriostático**

Los sueros o líquidos cefalorraquídeos excesivamente contaminados no son muestras adecuadas para realizar reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis. No es posible predecir los efectos de la contaminación bacteriana casual de los líquidos orgánicos sobre los resultados serológicos. Aunque el líquido cefalorraquídeo suele extraerse con el debido cuidado de asepsia, muchos líquidos que se envían por correo a los laboratorios centrales, especialmente durante los meses más calurosos del año, llegan en un estado de alta contaminación bacteriana. La centrifugación o la filtración resultan ineficaces para eliminar las bacterias de los líquidos cefalorraquídeos contaminados, porque algunos de los productos del metabolismo bacteriano son solubles y las alteraciones de los componentes del líquido cefalorraquídeo original no se compensan ni se corrigen.

Se ha recomendado el empleo del mertiolato como agente bacteriostático para conservar el líquido cefalorraquídeo (3). Ese compuesto (etilmercuri-tiosalicilato de sodio)<sup>2</sup> inhibe el desarrollo bacteriano sin interferir con los mecanismos de las reacciones serológicas corrientes para el diagnóstico de la sífilis, ni por acción química ni por la introducción de un factor de dilución. Además, su presencia no afecta los resultados obtenidos con los métodos turbidimétricos para determinar la proteína total en los líquidos cefalorraquídeos.

<sup>2</sup> Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana.

Los tubos para la recolección de muestras que contengan mertiolato pueden prepararse en la forma siguiente:

1. Prepárese la cantidad necesaria de solución de mertiolato el mismo día que se vaya a emplear, agregando 1,0 g de polvo de mertiolato a cada 100 ml de agua destilada. No deben utilizarse tinturas o soluciones comerciales ya preparadas.

2. Deposítese con pipeta 0,1 ml de solución acuosa de mertiolato al 1% 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. Con un vacío adecuado, la deshidratación se lleva a cabo en un término de 24 horas o menos.

4. Prepárense corchos parafinados sumergiéndolos en parafina caliente, pero no humeante, durante 1 minuto, y eliminando el exceso de parafina de los corchos haciéndolos rodar sobre papel de embalaje mientras están calientes.

5. Sáquense los tubos del desecador y tápanse herméticamente con los corchos parafinados.

6. Guárdense los tubos en la oscuridad. En esas condiciones podrán utilizarse durante varios meses.

La concentración de mertiolato que se obtiene al añadir a estos tubos de 2,0 a 8,0 ml de líquido cefalorraquídeo es suficiente para inhibir el desarrollo bacteriano.

Los tubos más pequeños (12 x 75 mm) preparados en esta forma y que contienen 1 mg de mertiolato, son apropiados para el envío de 2,0 ml a 4,0 ml de suero. También pueden emplearse frascos ampolla de tamaño adecuado con tapón de rosca.

### Referencias

(1) PANGBORN, M. C.; MALTANER, F.; TOMPKINS, V. N.; BEECHER, T.; THOMPSON, W. R., y FLYNN, M. R.: *Cardiolipin Antigens*. Organización Mundial de la Salud: Serie de Monografías No. 6, Ginebra, 1951, 63 págs.

(2) HARRIS, A.: "Quantitative Serologic Tests for Syphilis. I. A Standard Method of Reporting". *J Vener Dis Inform* 28: 249-252, 1947.

(3) ———, y MAHONEY, J. F.: "Merthiolate as an Effective Bacteriostatic Agent in Spinal Fluid Specimens". *J Vener Dis Inform* 25: 46, 1944.

---

# EQUIPO GENERAL

---

Los siguientes artículos de equipo y cristalería que se emplean habitualmente en el laboratorio serológico se omiten en las listas que aparecen en el texto de cada una de las técnicas de análisis a fin de evitar su repetición.

## Equipo

1. Autoclave, eléctrico o de gas.
2. Mechero Bunsen.
3. Centrífuga con tacómetro.
4. Trompa de agua para vacío.
5. Congelador,  $-20^{\circ}$  a  $-40^{\circ}\text{C}$ .
6. Cronógrafos.
7. Microscopio, monocular o binocular.
8. Lámpara de microscopio.
9. Medidor de pH.
10. Gradillas de madera o de alambre para tubos de muestras.
11. Refrigerador de  $6^{\circ}$  a  $10^{\circ}\text{C}$ , con congelador.
12. Cronómetro de segundos.
13. Termómetros adecuados para los baños de María y el refrigerador.
14. Baños de María para  $37^{\circ}\text{C}$  y  $56^{\circ}\text{C}$ .

## Cristalería

1. Frascos Pyrex con tapón de vidrio con capacidades de 60 ml a 2 litros.
2. Cilindros graduados, con capacidades de 50 ml a 2 litros.
3. Matraces Erlenmeyer, con capacidades de 25 ml a 3 litros.
4. Pipetas serológicas graduadas hasta la punta:
  - de 0,1 ml graduadas en 1/100 ml
  - de 0,2 ml graduadas en 1/100 ml
  - de 0,5 ml graduadas en 5/100 ml
  - de 1,0 ml graduadas en 1/100 ml
  - de 2,0 ml graduadas en 1/10 ml
  - de 5,0 ml graduadas en 1/10 ml
  - de 10,0 ml graduadas en 1/10 ml
5. Tubos para muestras, de tamaño apropiado para obtener sangre y líquido cefalorraquídeo.

---

## PREPARACION Y EMPLEO DE LOS SUEROS CONTROL (1)

---

En cada serie de procedimientos de análisis serológico deben incluirse sueros control. En las reacciones de floculación en lámina, cada preparación de suspensión de antígeno debe examinarse primero con estos sueros control. En otros casos, esos controles deben ser incluidos en la serie de reacciones. Los resultados obtenidos con los controles deben reproducir una pauta establecida de reactividad. En caso de que no sean aceptables esos resultados, no se harán nuevos análisis hasta que se haya establecido de nuevo la reactividad óptima.

El empleo cotidiano de sueros control preparados en todas las reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis es una práctica del Laboratorio de Investigación sobre Enfermedades Venéreas, que ha resultado útil para descubrir variaciones en los grados de reactividad que de otro modo podrían haber pasado inadvertidas.

Pueden prepararse sueros control de títulos conocidos de reactividad de la manera siguiente:

1.
  - a. Obténganse sueros claros, no hemolizados, Reactivos (no Débilmente Reactivos) de las series diarias de reacciones y deposítense en recipientes adecuados para conservarlos en estado de congelación.
  - b. Los sueros No Reactivos se obtienen de la misma manera. *No se utilicen sueros anticomplementarios si se va a emplear un suero control en las reacciones de fijación del complemento.*
2. Almacénense los sueros mezclados en un aparato congelador o en el congelador de un refrigerador.
3. Cuando se vayan a preparar los sueros control, déjense descongelar las muestras a temperatura ambiente o en baño de María a 37°C y mézclense perfectamente.
4. Fíltrense o centrifúguense las mezclas de suero a fin de eliminar las partículas.
5. Médase el suero de cada mezcla y agréguese 1 mg de polvo de mertiolato <sup>1</sup> por cada mililitro de suero.
6. Prepárense diluciones preliminares de suero Reactivo en suero No Reactivo. Pueden emplearse diluciones sucesivas a razón de 2 o elegirse un procedimiento similar al que se describe en el cuadro 1.

<sup>1</sup> Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana.

7. Para todas las reacciones, menos para la Reacción de Reagina en Suero No Calentado (RSNC), caliéntense diluciones de suero durante 30 minutos a 56°C.

8. Practíquense con esas diluciones de suero todas las reacciones ejecutadas regularmente en el laboratorio y anótense los resultados.

a. Para reacciones de floculación en lámina, la suspensión de antígeno debe probarse primero con sueros control de títulos conocidos de reactividad. Deberá desecharse cualquier suspensión de antígeno que no reproduzca la pauta establecida de reactividad de los sueros control, y prepararse una nueva suspensión de antígeno.

b. Para todos los demás procedimientos de ensayo, inclúyanse sueros control de títulos conocidos de reactividad al hacer las pruebas.

**Cuadro 1. Ejemplo de resultados obtenidos con diluciones de suero preparadas para emplearlas como controles diarios**

Diluciones	Suero Reactivo, ml	Suero No Reactivo, ml	Reacción en lámina VDRL	Reacción de Kline	Reacción de Mazzini	Reacción de Kolmer
1 .....	2,0	0,0	R	R	R	R 4+
2 .....	1,0	1,0	R	R	R	R 4+
3 .....	0,75	1,25	R	R	R	R 4+
4 .....	0,5	1,5	R	R	R	R 4+
5 .....	0,25	1,75	R	R	R	R 4+
6 .....	0,2	1,8	R	R	R	R 3+
7 .....	0,15	1,85	D	D	R	R 2+
8 .....	0,1	1,9	D	D	D	D ±
9 .....	0,05	1,95	N	N	N	N
10 .....	0,0	2,0	N	N	N	N

R=Reactivo      D=Débilmente Reactivo      N=No Reactivo

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

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

O bien, si se van a practicar las reacciones VDRL en lámina, de Mazzini y de Kline, puede seleccionarse una serie de diluciones como la siguiente:

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

9. Selecciónese para sueros control una dilución que sea definitivamente Reactiva o 4+ en todas las reacciones, y una o más diluciones que presenten claramente reactividad intermedia. Si se ejecutan varios tipos de reacciones,



pueden necesitarse dos o más diluciones para obtener lecturas intermedias en todas ellas.

**10.** Calcúlese la cantidad de cada dilución de suero que ha de prepararse. Esta se determinará por la cantidad que se requiera para las reacciones de cada día, el período de tiempo en el que se vayan a emplear los controles y los medios de almacenamiento de que se disponga.

Los sueros control debidamente taponados pueden conservarse durante unos 60 días en un congelador, 30 días en el congelador de un refrigerador, y de 7 a 10 días, en estado líquido, en un refrigerador.

**11.** Prepárense los volúmenes calculados de cada dilución de suero.

**12.** Mézclese perfectamente. Puede colocarse una mezcla de sueros en un matraz Erlenmeyer o en un frasco de diámetro amplio de una capacidad 3 a 5 veces mayor que el volumen de la mezcla, y hacerla girar en una máquina rotatoria para láminas a unas 100 rpm durante 30 a 60 minutos.

**13.** Vuélvase a probar cada mezcla de suero en todas las reacciones en que se vaya a emplear como control.

**14.** En caso necesario, ajústense las mezclas a la mayor o menor reactividad añadiendo una pequeña cantidad de suero Reactivo o No Reactivo. Mézclese perfectamente y ejecútese la prueba como en el paso 13.

**15.** Deposítense cantidades de cada dilución, *suficientes para un período de prueba*, en tubos debidamente rotulados y tápanse estos herméticamente con corchos cubiertos de parafina. Combínense en series y sométanse a refrigeración. Después de 24 horas revísense los corchos, vuélvanse a tapar los tubos y colóquense en el congelador.

**16.** Deben prepararse nuevos controles antes de que se agote el lote de controles que se esté empleando. Vuélvase a comprobar la pauta de reactividad de los nuevos sueros control mediante la comparación con los controles que se estén empleando por lo menos en 3 días diferentes.

**17.** Cada día que se realicen pruebas, retírese una serie de los controles del congelador, descongélese, mézclese perfectamente y caliéntese durante 30 minutos a 56°C para todas las reacciones menos para la RSNC. Después que los sueros estén a temperatura ambiente, compruébese la reactividad de la suspensión de antígeno con sueros control.

**18.** Deséchese toda suspensión de antígeno que no reproduzca la pauta establecida de reactividad de los controles,

o

no se considere válida la serie de reacciones que no produzca la reactividad establecida en los sueros control bajo las condiciones en que se lleva a cabo la técnica.

### Referencia

(1) HARRIS, A.; HARDING, V. L., y BOSSAK, H. N.: "Serum Standards for Serologic Tests for Syphilis". *J Vener Dis Inform* 32: 310-318, 1951.

---

# REACCION DE ANTICUERPOS TREPONEMICOS FLUORESCENTES-200 (ATF-200) (1) (2) (3)\*

---

*Antes de ejecutar esta reacción, el técnico debe estar bien enterado del contenido de los capítulos Información general y Equipo general.*

## Equipo

1. Máquina rotatoria, adaptable a 100 rpm, que describa un círculo de  $\frac{3}{4}$  de pulgada de diámetro en un plano horizontal.
2. Incubadora, que se pueda ajustar a 37°C.
3. Microscopio con dispositivos para iluminación fluorescente y campo oscuro.
4. Papel absorbente.
5. Punzón de diamante para rayar vidrio.
6. Gradilla o recipiente para láminas.
7. Cámara húmeda. Cualquier recipiente apropiado para guardar láminas puede convertirse en cámara húmeda colocando en su interior papel mojado.
8. Perillas de goma, con una capacidad indicada de 2 ml aproximadamente.
9. Asa bacteriológica estándar de platino, de 2 mm, calibre 26.<sup>1</sup>
10. Destilagotas pequeño de polietileno.
11. Frasco de polietileno, con espita, con una capacidad de 5 galones.

## Cristalería

1. Láminas para microscopio, de 1 x 3 pulgadas, con extremos deslustrados, de 1 mm de espesor, aproximadamente.
2. Cubreobjetos, No. 1, de 22 mm por cada lado.
3. Pipetas capilares desechables, de  $5\frac{3}{4}$  pulgadas de longitud.<sup>2</sup>
4. Cubeta de coloración con bandeja removible de vidrio. Dimensiones interiores:  $3\frac{5}{8}$  x  $2\frac{3}{4}$  x  $2\frac{1}{2}$  pulgadas de altura. Cuando se trate de pocas láminas pueden emplearse tarros Coplin de coloración.

\* Actualmente el Laboratorio de Investigación sobre Enfermedades Venéreas recomienda la reacción ATF-ABS (prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes), la cual ha reemplazado casi por completo a la reacción ATF-200.

<sup>1</sup> Scientific Products Company, Evanston, Illinois, No. de Catálogo N2070-2.

<sup>2</sup> Clay-Adams, Incorporated, 141 East 25th St., Nueva York, N.Y. 10010. No. de Catálogo A-2880, y Scientific Products Company, Evanston, Illinois, No. de Catálogo P5205-1.

5. Varillas de cristal, de 100 mm x 4 mm, aproximadamente, con ambos extremos pulidos a fuego.

## Reactivos

### 1. Antígeno

a. *Treponema pallidum*, cepa Nichols, extraído de tejido testicular de conejo, en medio básico, según se recomienda para la reacción de inmovilización del *Treponema pallidum* (ITP) (véase Reacción ITP, pág. 72). Esta suspensión debe contener aproximadamente 50 microorganismos por campo microscópico cuando se usa un aumento de 450X.

Este es el antígeno para la Reacción de Anticuerpos Treponémicos Fluorescentes (ATF) y puede guardarse en el refrigerador sin añadirle un agente conservador.

b. Como en a., pero conservado mediante desecación por congelación<sup>3</sup> (liofilización), reconstituido al volumen original con agua destilada esterilizada y guardado en el refrigerador. Para que un antígeno reconstituido sea adecuado debe contener, en estado líquido, un mínimo de 7 a 10 microorganismos por campo seco observado con gran aumento.

2. Globulina antihumana marcada con fluoresceína, de calidad comprobada.<sup>4</sup>

Esta se puede obtener comercialmente o preparar empleando isotiocianato de fluoresceína. El conjugado madre debe guardarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  en cantidades adecuadas. Cuando se descongele para utilizarlo, no se debe volver a congelar, pero puede almacenarse a  $6^{\circ}\text{--}10^{\circ}\text{C}$ .

3. Solución salina amortiguada de fosfato.<sup>5</sup>

Fórmula por litro

NaCl .....	7,65 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,724 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,21 g

Esta solución produce lecturas en el medidor de pH  $7,2 \pm 0,10$ . Puede almacenarse en un frasco grande de polietileno.

4. Tween-80.<sup>6</sup>

Para preparar una solución de Tween-80 al 2% en solución salina amortiguada de fosfato, caliéntense los dos reactivos en baño de María a  $56^{\circ}\text{C}$ . A 98 ml de solución salina agréguese 2 ml de Tween-80 midiendo desde el fondo de la pipeta, y enjuáguese la pipeta. Esta solución se conserva bien a la temperatura del refrigerador, pero debe desecharse cuando contenga precipitados.

<sup>3</sup> Baltimore Biological Laboratory, Baltimore, Maryland 21218, y Difco Laboratories, Detroit, Michigan 48201.

<sup>4</sup> Sylvana Company, Millburn, Nueva Jersey; Baltimore Biological Laboratory, Baltimore, Maryland 21218, y Difco Laboratories, Detroit, Michigan 48201.

<sup>5</sup> Difco Laboratories, Detroit, Michigan 48201 (Bacto Hemagglutination Buffer No. 0512).

<sup>6</sup> Z. D. Gilman, Incorporated, 627 Pennsylvania Ave., N.W., Washington, D.C.

5. Medio de montaje, constituido por 1 parte de solución salina amortiguada y 9 partes de glicerina (de calidad analítica).
6. Acetona A.C.S.\*
7. Aceite de inmersión, de baja fluorescencia, no secante.

### **Prueba preliminar de la suspensión de antígeno**

1. La suspensión de antígeno debe mezclarse bien con una pipeta desechable y una perilla de goma, haciendo penetrar la suspensión en la pipeta y expulsándola 8 ó 10 veces, a fin de deshacer los coágulos de treponemas y lograr una distribución uniforme de treponemas. Antes de preparar las láminas para la reacción ATF determínese, mediante examen en campo oscuro, si los treponemas están suficientemente dispersos.

2. Un nuevo lote de antígeno o, por lo demás, un antígeno de calidad desconocida, debe ser comparado con un antígeno de título conocido de reactividad antes de usarlo para los procedimientos ordinarios de análisis.

3. Para que una preparación de antígeno sea adecuada, no debe tomar coloración directa ni inespecífica con un conjugado de fluoresceína diluida de calidad conocida.

4. El antígeno de calidad desconocida debe reproducir la pauta establecida de reacción para los sueros control que presentan resultados Reactivos, Mínimamente Reactivos (fluorescencia 2+) y No Reactivos con un antígeno aceptado.

### **Prueba preliminar de globulina antihumana marcada con fluoresceína (conjugado)**

1. Antes de usar un nuevo lote de conjugado marcado con fluoresceína para pruebas de rutina, debe determinarse su título mediante un microscopio con dispositivos para iluminación fluorescente y campo oscuro.

2. Prepárense las siguientes diluciones de conjugado desconocido en solución salina amortiguada de fosfato que contenga Tween-80 al 2 por ciento:

1:10, 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160.

De ser necesario, pueden prepararse diluciones más elevadas.

3. Se prueba cada dilución de conjugado con un suero control Reactivo (4+).

4. Se hace un control de coloración inespecífica (CI) con un conjugado no diluido y con cada dilución de conjugado desconocido.

5. Se prepara al mismo tiempo un conjugado conocido, a su título, con el suero control Reactivo (4+), un suero control Mínimamente Reactivo (2+), un suero control No Reactivo y un control de coloración inespecífica (CI).

---

\* A.C.S.: American Chemical Society: Sociedad de Química de los E.U.A.

Ejemplo de titulación de conjugado desconocido				
Conjugados \ Controles	Control de coloración inespecífica (CI)	Control Reactivo (4+)	Control Mínimamente Reactivo (2+)	Control No Reactivo (-)
Conjugado de título conocido al 1:40	—	4+	2+	—
Dilución de conjugado desconocido:				
Sin diluir	—			
1:10	—	4+		
1:20	—	4+		
1:40	—	4+		
1:80	—	4+		
1:160	—	2+		

6. El título del conjugado seleccionado para uso es aquella dilución de un escalón inferior a la mayor dilución que dé un máximo de fluorescencia (4+). En el ejemplo recién dado, la dilución seleccionada para uso es de 1:40.

7. El título seleccionado para un lote determinado de globulina anti-humana marcada con fluoresceína es óptimo cuando se obtiene un máximo de fluorescencia con sueros fuertemente reactivos y no se emplea una proporción excesiva de globulina antihumana.

8. Para que un conjugado sea adecuado en el título seleccionado para uso, no debe tomar coloración directa ni inespecífica con un antígeno de calidad conocida.

### Controles

En cada serie de reacciones deben quedar incluidos los siguientes controles, los cuales deben probarse por duplicado:

1. Control Reactivo:  
Una dilución de suero Reactivo que presente fuerte fluorescencia (3+ a 4+).
2. Control Mínimamente Reactivo:  
Una dilución de suero Reactivo que produzca un resultado moderadamente fluorescente (2+).
3. Control No Reactivo:  
Una dilución de suero al 1:200 que no presente fluorescencia.
4. Control de coloración inespecífica:  
Un frotis de antígeno tratado solamente con globulina antihumana marcada con fluoresceína.

## Preparación de los sueros

1. Prepárese una dilución de suero al 1:10 añadiendo 0,1 ml <sup>7</sup> de suero a 0,9 ml de solución salina amortiguada. Deséchese la pipeta después de hacer la mezcla.

2. Calientese durante 30 minutos en baño de María a 56°C la dilución de suero al 1:10. Si anteriormente se ha calentado el suero no diluido, calientese durante 10 minutos la dilución al 1:10. Déjesela enfriar a temperatura ambiente. Si fuese necesario repetir la prueba, debe prepararse y calentarse una nueva dilución al 1:10.

3. Prepárese una dilución de suero al 1:200 añadiendo a 1,9 ml de solución salina amortiguada 0,1 ml de la dilución de suero al 1:10.

## Reacción de anticuerpos treponémicos fluorescentes-200 (ATF-200) con suero

1. En láminas libres de grasa, descríbanse dos círculos de 1 centímetro de diámetro. Pásese una gasa limpia por las láminas a fin de eliminar partículas de vidrio sueltas.

2. Extiéndanse dentro de cada círculo 0,005 ml o el contenido de antígeno de un asa estándar de alambre de platino de 2 mm, de calibre 26. Déjese secar al aire.

3. Sumérjanse o cúbranse las láminas con acetona durante 10 minutos, retírense y déjense secar al aire.<sup>8</sup>

*Nota: Si se desea, pueden almacenarse a -20°C las láminas tratadas con acetona. Estas láminas fijadas pueden usarse indefinidamente siempre que se obtengan resultados satisfactorios con controles.*

4. Cúbrase cada frotis de antígeno con 0,03 ml de una dilución al 1:200 del suero de ensayo. Cada suero tiene que analizarse por duplicado en una sola lámina.

5. Impídase la evaporación de las diluciones de suero colocando las láminas en una cámara húmeda.

6. Háganse girar las láminas a 100 rpm durante 30 minutos en una incubadora a 37°C. Deben hacerse ajustes para compensar los aumentos de temperatura debidos al calentamiento de la máquina rotatoria.

7. Enjuágense las láminas con solución salina amortiguada y luego remójense en 2 cambios de solución salina amortiguada durante 10 minutos en total. A continuación practíquese un breve enjuague con agua destilada para eliminar los cristales de sal.

<sup>7</sup> Para medir cantidades de 0,1 ml de cualquier reactivo, empléese una pipeta de 0,2 ml.

<sup>8</sup> No se recomienda emplear más de 50 láminas con 200 ml de acetona. Si se sobrepasa este límite se produce una fluorescencia inapropiada de fondo.

8. Séquense las láminas con papel absorbente para eliminar todas las gotas de agua.

9. El día que se vaya a utilizar, dilúyase globulina antihumana marcada con fluoresceína, a su título, en una solución salina amortiguada de fosfato que contenga Tween-80 al 2 por ciento.

10. Colóquense aproximadamente 0,03 ml de conjugado de fluoresceína diluida en cada frotis. Con una varilla de cristal extiéndase el conjugado en forma circular de manera que queden totalmente cubiertos los frotis. Para depositar el conjugado pueden utilizarse pipetas desechables.

11. Impídase la evaporación como se sugiere en el paso 5.

12. Repítanse los pasos 6, 7 y 8.

13. Colóquese una gota muy pequeña de medio de montaje en cada frotis y aplíquese un cubreobjetos.

14. Las láminas deben examinarse inmediatamente o pueden colocarse en una habitación oscura durante 1 ó 2 horas antes de hacer la lectura. La exposición a la luz causará una reducción de la fluorescencia y dificultará las lecturas, sobre todo en la zona moderadamente fluorescente (2+).

15. Los frotis se examinan al microscopio utilizando luz ultravioleta y un objetivo seco de alta potencia. El aumento total debe ser de 450X aproximadamente. Se ha observado que para las operaciones de rutina es adecuada una combinación de BG 12 (filtro primario) y OG 1 (filtro secundario).

16. Los frotis No Reactivos deben examinarse de nuevo con iluminación visible a fin de comprobar la presencia de treponemas.

17. Anótese la intensidad de fluorescencia de los treponemas de acuerdo con la lista que se da a continuación, utilizando láminas control para los puntos finales máximo y mínimo.

	<b>Lectura</b>	<b>Resultado</b>
4+	Muy intensamente fluorescente . . . . .	Reactivo (R)
3+	Intensamente fluorescente . . . . .	Reactivo (R)
2+	Moderadamente fluorescente . . . . .	Reactivo (R)
1+	Débilmente fluorescente . . . . .	No Reactivo (N)
- a ±	Vagamente visible . . . . .	No Reactivo (N)

Las lecturas de 2+ o más se consignan como Reactivos; las inferiores a 2+, como No Reactivos.

*Nota: Cuando se vaya a usar una bombilla nueva, debe comprobarse el rendimiento de la fuente de luz ultravioleta. Una verificación sistemática cada vez que se emplee la lámpara revelará cualquier disminución de la intensidad de la luz. Esto se ha logrado satisfactoriamente empleando un exposímetro fotoeléctrico Weston Master No. 3 o No. 4 para determinar la intensidad ultravioleta a la altura de la platina del microscopio o inmediatamente por debajo de ella, después de colocar el filtro primario en su sitio.*

## Referencias

(1) DEACON, W. E.; FALCONE, V. H., y HARRIS, A.: "A Fluorescent Test for Treponemal Antibodies". *Proc Soc Exp Biol Med* **96**: 477-480, 1957.

(2) ———; FREEMAN, ELIZABETH M., y HARRIS, A.: "Fluorescent Treponemal Antibody Test. A Modification Based on Quantitation (FTA-200)". *Proc Soc Exp Biol Med* **103**: 827-829, 1960.

(3) ——— y HUNTER, ELIZABETH F.: "Treponemal Antigens As Related to Identification and Syphilis Serology". *Proc Soc Exp Biol Med* **110**: 352-356, 1962.



---

## REACCIONES DE HINTON (1) (2)\*

---

*Antes de ejecutar estas reacciones, el técnico debe estar bien enterado del contenido de los capítulos Información general y Equipo general.*

### Equipo

1. Agitador Kahn (de 275 a 285 oscilaciones por minuto, de pulgada y media de amplitud).
2. Lámpara fluorescente cilíndrica de luz diurna.

### Cristalería

1. Tubos de ensayo, de 11 ¼ x 100 mm en sus dimensiones exteriores, en adelante denominados tubos Hinton.
2. Matraces Erlenmeyer, con capacidad de 125 ml o 250 ml, con un reborde en forma de V invertida en el fondo, que produce dos compartimientos semicirculares (matraces Hinton).

### Reactivos

1. Indicador Hinton.

El indicador madre para esta reacción es una solución alcohólica que contiene cardiolipina al 0,0884%, lecitina purificada al 0,6188% y colesterol al 0,24 por ciento. Cada lote de indicador debe ser estandarizado serológicamente mediante la adecuada comparación con un indicador de reactividad conocida.

2. Solución salina al 5 por ciento.

- a. Pésense 5 g de cloruro de sodio (A.C.S.†) previamente desecado.
- b. Disuélvase el cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada y caliéntese la solución en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.
- c. Guárdese la solución salina en frascos tapados con tapón de vidrio a temperatura ambiente (23° a 29°C).

3. Solución salina al 0,85 por ciento.

Añádase al agua destilada la cantidad necesaria (8,5 g por cada litro) de cloruro de sodio desecado. Esta solución debe prepararse el mismo día que se vaya a utilizar.

4. Solución de glicerina al 50 por ciento.

---

\* En julio de 1966 el Laboratorio de Investigación sobre Enfermedades Venéreas discontinuó esta reacción y no mantiene ni ejecuta pruebas con los reactivos y controles que se utilizaban para la misma.

† A.C.S.: American Chemical Society: Sociedad de Química de los E.U.A.

Mézlense volúmenes iguales de glicerina Baker y Adamson <sup>1</sup> (de calidad analítica) y agua destilada. Esta solución se conserva indefinidamente.

### **Preparación de los sueros**

1. Sepárense los sueros de los coágulos por medio de centrifugación y decantación.

2. Caliéntense los sueros en baño de María a 56°C durante 30 minutos. Deben calentarse los sueros el mismo día que se vaya a practicar la reacción. Si hay necesidad de repetir el examen de una muestra, utilícese suero recién separado del coágulo, si lo hay. De lo contrario, caliéntese de nuevo durante 10 minutos a 56°C.

3. Repítase la centrifugación de toda muestra en la que se hayan formado partículas visibles durante el calentamiento.

### **Preparación del indicador Hinton glicerinado**

*Nota: En el matraz Hinton de 125 ml deben mezclarse no menos de 1,0 ml ni más de 3,0 ml del indicador Hinton; en el matraz Hinton de 250 ml deben mezclarse no menos de 3,0 ni más de 5,0 ml del indicador Hinton.*

1. Deposítense con pipeta dentro de uno de los compartimientos de un matraz Hinton 0,8 partes de la solución salina al 5 por ciento.

2. Deposítense con pipeta dentro del otro compartimiento del matraz Hinton una parte del indicador Hinton. Evítese que se mezclen prematuramente las soluciones.

3. Mézclese el contenido del matraz agitándolo rápidamente de un lado al otro durante 1 minuto exactamente.

4. Déjese reposar la mezcla durante 5 minutos exactamente.

5. Agréguese 13,2 partes de la solución salina al 5% y agítese vigorosamente el matraz.

6. Agréguese 15 partes de la solución de glicerina al 50% y agítese el matraz hasta lograr la homogeneidad de la suspensión.

7. Guárdese en el refrigerador en un frasco tapado con tapón de vidrio. Esta suspensión, llamada indicador Hinton glicerinado, puede usarse hasta 3 semanas después de preparada, siempre que reproduzca la pauta establecida de reactividad de los sueros control.

### **Prueba preliminar del indicador Hinton glicerinado**

Todo nuevo indicador Hinton glicerinado debe probarse en paralelo con un indicador Hinton glicerinado aceptable en sueros control de títulos conocidos de reactividad (véase "Preparación y empleo de los sueros

<sup>1</sup> General Chemical Division, Allied Chemical and Dye Corporation, Nueva York, N.Y.

control", pág. 10) con arreglo al método descrito en "Reacción cualitativa estándar de Hinton con suero".

### Reacción cualitativa estándar de Hinton con suero

1. Colóquense los tubos Hinton en gradillas adecuadas, de manera que haya un tubo para cada suero que se va a analizar y para los sueros control de títulos conocidos de reactividad (véase "Preparación y empleo de los sueros control", pag. 10). Numérense los tubos para que correspondan a los números que identifican a los sueros.

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

*Nota: Algunas veces se encuentran sueros sumamente Reactivos que producen un resultado No Reactivo cuando se emplean 0,5 ml como cantidad destinada al análisis. Si se sospecha una reacción de este tipo deberá analizarse también 0,1 ml de suero además de los 0,5 ml de suero.*

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

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

4. Agítense manualmente las gradillas con los tubos hasta que se compruebe visualmente que están bien mezclados los sueros y el indicador glicerinado.

5. Agítense las gradillas con los tubos durante 5 minutos en el agitador Kahn.

6. Retírense las gradillas del agitador y pónganse en baño de María a 37°C durante 16 horas.

*Nota: El baño de María debe permanecer descubierto durante este período y la temperatura debe mantenerse constantemente a 37°C  $\pm$  1°.*

7. Examínese macroscópicamente sacando cuidadosamente cada tubo de la gradilla y sosteniéndolo en un ángulo de 45° cerca de la pantalla de la lámpara fluorescente.

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

8. Anótense los resultados del modo siguiente:

Reactivo .....	Copos blancos francamente visibles en el menisco y floculación bien marcada cuando se agitan suavemente los tubos.
No Reactivo .....	Ausencia de anillo o banda de flóculos en el menisco y de floculación al agitar suavemente los tubos.

No Satisfactorio . . . . . Muestras hemolizadas, quillosas o contaminadas con bacterias, que no permiten lecturas válidas porque las pruebas terminadas son demasiado turbias.

9. Todos los tubos que no permitan hacer lecturas claramente No Reactivas o Reactivas deben centrifugarse durante 5 minutos a una velocidad equivalente a 2.000 rpm, en una centrífuga I.E.C.<sup>2</sup> de Tamaño 1, con cabezal horizontal.

10. Retírense los tubos de la centrífuga y léanse las reacciones en la forma descrita anteriormente.

11. Anótese los resultados en la forma siguiente:

Débilmente Reactivo . . . . . Las reacciones que presenten granulación gruesa en el menisco y floculación franca cuando se agite suavemente el tubo.

No Reactivo . . . . . Todas las muestras que no reaccionen en la forma descrita para el resultado "Débilmente Reactivo".

### Reacción cuantitativa estándar de Hinton con suero

1. Prepárense las diluciones de suero de la manera siguiente:

- a. Colóquese una hilera de tubos Hinton numerados del 1 al 8.
- b. Añádanse 0,5 ml de una solución salina al 0,85% a los tubos 2 a 8.
- c. Añádanse 0,5 ml de suero calentado a los tubos 1 y 2.
- d. Mézclense y transfíranse 0,5 ml del tubo 2 al tubo 3.
- e. Prosígase este procedimiento hasta terminar con el tubo 8 y deséchense 0,5 ml del tubo 8.

2. Añádanse a cada uno de los 8 tubos 0,5 ml del indicador Hinton glicerinado.

3. Agítense manualmente las gradillas con los tubos hasta que se compruebe visualmente que están bien mezclados los sueros y el indicador glicerinado.

4. Colóquense las gradillas en el agitador Kahn y agítense durante 5 minutos.

5. Pónganse las gradillas con los tubos en un baño de María descubierto a 37°C durante 16 horas.

6. Léanse las reacciones en la forma descrita en el paso 8 de "Reacción cualitativa estándar de Hinton con suero", pág. 22.

7. Anótese los resultados en términos de la mayor dilución que produzca un resultado Reactivo, por ejemplo: Reactivo en una solución al 1:8 u 8 dils.

<sup>2</sup> International Equipment Company, Boston, Massachusetts.

## Reacción rápida de Hinton con suero

1. Numérense y colóquense los tubos Hinton en gradillas adecuadas de modo que haya un tubo para cada suero a ser analizado y para los sueros control de títulos conocidos de reactividad (véase "Preparación y empleo de los sueros control", pág. 10).

2. Deposítense con pipeta, 0,5 ml del suero por analizar dentro de los tubos debidamente numerados.

3. Añádanse 0,5 ml del indicador Hinton glicerinado a cada tubo y, previa agitación manual, agítense mecánicamente durante 10 minutos a fin de mezclar el contenido de los tubos.

4. Retírese la gradilla con los tubos del agitador y colóquesela en el baño de María descubierto a 37°C durante 20 minutos.

5. Sáquense los tubos del baño de María y centrifúguense durante 10 minutos a una velocidad equivalente a 2.000 rpm, en una centrífuga I.E.C.<sup>s</sup> de Tamaño 1, con cabezal horizontal.

6. Retírense los tubos de la centrífuga sin alterar su contenido.

7. Léase cada tubo en la forma descrita en el paso 8 de la "Reacción cualitativa estándar de Hinton con suero", pág. 22.

## Referencias

(1) STUART, G. O.; GRANT, J. F., y HINTON, W. A.: "A Note on the Use of Cardiolipin in the Preparation of Indicator (Antigen) for the Hinton Test". *J Vener Dis Inform* 29: 27, 1948.

(2) HINTON, W. A.; STUART, G. O., y GRANT, J. F.: "The Use of Cardiolipin-Lecithin in the Preparation of Antigen for the Hinton Test". *Am J Syph Gonorr and Vener Dis* 33: 587-592, 1949.

<sup>s</sup> International Equipment Company, Boston, Massachusetts.

---

# REACCIONES DE KLINE CON ANTIGENO DE LECITINA NATURAL Y CARDIOLIPINA (LNC) CON SUERO (1)\*

---

*Antes de ejecutar estas reacciones, el técnico debe estar bien enterado del contenido de los capítulos Información general y Equipo general.*

## Equipo

1. Máquina rotatoria,<sup>1</sup> adaptable a 180 rpm, que describa un círculo de  $\frac{3}{4}$  de pulgada de diámetro en un plano horizontal.
2. Dispositivo para hacer anillos de parafina de 14 mm de diámetro, aproximadamente.<sup>2</sup>
3. Soportes para láminas.
4. Aguja hipodérmica, de calibre 22 ó 25, sin bisel.

## Cristalería<sup>3</sup>

1. Pipetas de 0,2 ml, graduadas en 1/100 ml hasta la punta.
2. Frascos redondos<sup>4</sup> de tapón de vidrio, con capacidad de 30 ml.
3. Láminas, de 2 x 3 pulgadas, con anillos de parafina de unos 14 mm de diámetro.
4. Jeringas de vidrio hipodérmicas, con capacidad de 1,0 ó 2,0 ml.

## Reactivos

### 1. Antígeno.<sup>5</sup>

El antígeno de lecitina natural y cardiolipina<sup>6</sup> (LNC) para reacciones de Kline se compone de cardiolipina (0,2%) y lecitina natural purificada (1,8 a 2%) en alcohol absoluto. Este reactivo debe prepararse con ingredientes estandarizados químicamente y debe normalizarse serológicamente mediante

---

<sup>1</sup> En julio de 1966 el Laboratorio de Investigación sobre Enfermedades Venéreas discontinuó esta reacción y no mantiene ni ejecuta pruebas con los reactivos y controles que se utilizaban para la misma.

<sup>2</sup> A. H. Thomas Company, Filadelfia, Pensilvania, No. de Catálogo 7049-M.

<sup>3</sup> Eberbach & Son Company, Inc., Ann Arbor, Michigan, No. de Catálogo 2600.

<sup>4</sup> El Dr. Kline recomienda que la cristalería destinada a las reacciones de Kline se limpie con cepillo y se enjuague en agua de grifo sin utilizar ningún ácido, jabón ni detergente, y que la pipeta de 0,2 ml se limpie con alcohol etílico y se mantenga luego en el mismo líquido. Este sistema de limpieza no lo recomienda ni lo emplea el Laboratorio de Investigación sobre Enfermedades Venéreas.

<sup>5</sup> Corning Glass Works, Corning, N.Y., No. de Catálogo LG-1, MW-90530.

<sup>6</sup> LaMotte Chemical Products Company, Chestertown, Maryland.

<sup>7</sup> El Dr. Kline emplea este término para diferenciar las lecitinas derivadas de corazón de buey o de huevo de las lecitinas sintéticas.

comparación con un antígeno de reactividad estándar. Consérvese en el refrigerador a una temperatura de 6° a 10°C.

**2. Solución de colesterol al 1 por ciento.**

Disuélvase 1,0 g de colesterol (Pfanstiehl, exento de cenizas, precipitado por alcohol) en 100 ml de alcohol etílico absoluto y guárdese en un frasco con tapón de vidrio a temperatura ambiente.

**3. Agua destilada,<sup>7</sup> de pH 6,0 a 6,8.**

El agua debe contener un mínimo de electrolitos, especialmente iones positivos de ácidos y de sales bivalentes. Si no se emplea agua de un pH adecuado y libre de sales, es posible que los resultados no sean satisfactorios. Si el agua es demasiado ácida o contiene sales, la suspensión de antígeno será demasiado áspera y producirá algunas reacciones inespecíficas. Si el agua es demasiado alcalina, los resultados serán de sensibilidad insuficiente.

**4. Solución salina al 0,85 por ciento.**

Añádase la cantidad necesaria (850 mg) de cloruro de sodio de calidad analítica (A.C.S.\*) a 100 ml de agua destilada. Es preferible preparar esta solución el mismo día que se vaya a emplear. Puede conservarse en estado satisfactorio hasta por una semana, si se guarda en un frasco limpio con tapón de vidrio.

### **Preparación de los sueros**

**1.** Sepárense los sueros de los coágulos por medio de centrifugación y decantación.

**2.** Calientense los sueros en baño de María a 56°C durante 30 minutos. Si es necesario repetir el examen del suero otro día, vuélvase a calentar el suero durante 5 minutos a 56°C.

**3.** Vuélvase a centrifugar todo suero en el que se hayan formado partículas visibles durante el calentamiento.

### **Preparación de la suspensión de antígeno LNC**

**1.** Deposítense con pipeta 0,85 ml de agua destilada en el fondo de un frasco de 30 ml con tapón de vidrio.

**2.** Añádase 1,0 ml de solución de colesterol al 1%, dejando gotear muy despacio desde una pipeta la solución de colesterol (durante 20 segundos) mientras el frasco, sostenido en ángulo, se hace girar continua y vigorosamente sobre una superficie plana.

**3.** Continúese la rotación del frasco durante 20 segundos más.

**4.** Con una pipeta de 0,2 ml añádase 0,1 ml de antígeno, dejándolo escurrir por un lado del cuello del frasco, pero evitando la superficie de vidrio esmerilado.

<sup>7</sup> El Dr. Kline sostiene que es necesario emplear agua procedente de una fuente que se considere satisfactoria y recomienda "Distillata", agua destilada de la Distillata Company, 1542 East 24th Street, Cleveland, Ohio.

\* A.C.S.: American Chemical Society: Sociedad de Química de los E.U.A.

5. Tápese el frasco y agítese vigorosamente durante 1 minuto, lanzando el líquido de abajo hacia arriba y viceversa.

6. Añádanse rápidamente al frasco 2,45 ml de solución salina al 0,85% y agítese con menos energía durante 30 segundos.

7. La suspensión está lista y puede ser utilizada durante 1 día. Puede prepararse el doble de esta cantidad de suspensión de antígeno en frascos de 30 ml.

8. Mézclese suavemente la suspensión de antígeno cada vez que se use. La suspensión no debe mezclarse haciéndola pasar a la fuerza de un lado a otro de la jeringa y la aguja, puesto que esto podría causar la descomposición de partículas y pérdida de reactividad.

### **Verificación de la exactitud de las agujas para depósito de la suspensión**

1. Es de primordial importancia emplear cantidades adecuadas de reactivos; por esta razón, deben examinarse diariamente las agujas que se empleen. Mediante la práctica se logra el depósito rápido de la suspensión de antígeno, pero debe tenerse cuidado de obtener gotas de tamaño uniforme.

2. Para las reacciones cuantitativas y cualitativas en lámina, la suspensión de antígeno se administra con una jeringa a la que va unida una aguja despuntada de calibre 22 ó 25, que rendirá 140 gotas  $\pm$  2 gotas de suspensión de antígeno por mililitro cuando se verifica con una jeringa de 1 ó 2 ml sostenida en posición vertical.

3. Las agujas que no satisfagan las especificaciones indicadas deben ser ajustadas antes de usarse, a fin de que rindan los volúmenes correctos.

### **Prueba preliminar de la suspensión de antígeno**

1. Pruébense sueros control de títulos conocidos de reactividad (véase "Preparación y empleo de los sueros control", pág. 10) en la forma descrita en la "Reacción cualitativa de Kline con suero".

2. Las reacciones con los sueros control deben reproducir la pauta de reactividad. Para que un suero sea No Reactivo, debe presentar completa dispersión de partículas de antígeno y el número óptimo de partículas por campo microscópico.

3. No debe emplearse una suspensión de antígeno que no sea adecuada.

### **Reacción cualitativa de Kline con suero**

1. Deposítense con pipeta 0,05 ml de suero calentado dentro del anillo de parafina en una lámina de vidrio.



2. Añádase una gota (0,007 ml) de la suspensión de antígeno a cada suero.

3. Hágase girar las láminas en una máquina rotatoria a 180 rpm durante 4 minutos.

*Nota: Cuando las reacciones se practiquen en un clima cálido y seco, las láminas pueden cubrirse con la tapa de una caja provista de un papel secante húmedo, a fin de impedir un exceso de evaporación durante la rotación.*

4. Examínense las reacciones al microscopio empleando un aumento de 100X.

5. Anótense los resultados observados conforme al esquema siguiente:

**a. Reacciones típicas**

<b>Lectura</b>	<b>Resultado</b>
Grumos medianos o grandes . . . . .	Reactivo (R)
Grumos pequeños pero definidos . . . . .	Débilmente Reactivo (D)
Sin grumos . . . . .	No Reactivo (N)

**b. Reacciones atípicas**

Las reacciones atípicas se caracterizan por una aglutinación irregular, plumosa, en la que predominan los grumos más pequeños. Los sueros que presenten reacciones atípicas deben volver a examinarse en diluciones desde 1:2 al 1:64, conforme se describe en "Reacción cuantitativa de Kline con suero". Si se obtiene un suero Reactivo en una o más diluciones, el resultado se consignará como Reactivo.

### **Reacción cuantitativa de Kline con suero**

1. Deposítense 0,5 ml de solución salina al 0,85% en cada uno de los 6 o más tubos.

2. Añádanse 0,5 ml del suero calentado al primer tubo y mézclense.

3. Pásense 0,5 ml del primer tubo al segundo y mézclense.

4. Continúense pasando 0,5 ml de cada tubo al siguiente y mezclando hasta que el último tubo contenga 1,0 ml.

5. Deposítense con pipeta 0,05 ml de suero no diluido y de cada dilución de suero en diferentes anillos de parafina en una lámina de vidrio.

6. Añádase una gota de suspensión de antígeno (0,007 ml) a cada dilución de suero.

7. Hágase girar la lámina a 180 rpm durante 4 minutos.

8. Léanse y anótense las reacciones conforme se describe en la "Reacción cualitativa de Kline con suero", paso 5.

9. Anótense los resultados en términos de la mayor dilución que produzca un resultado Reactivo con arreglo al siguiente ejemplo:

Suero no diluido	Diluciones de suero						Resultado
1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
R	R	R	D	—	—	—	Reactivo, en dilución al 1:4, o 4 dils.
R	R	R	R	R	—	—	Reactivo, en dilución al 1:16, o 16 dils.
R	R	R	R	R	R	—	Reactivo, en dilución al 1:32, o 32 dils.

### Referencia

(1) KLINE, B. S.: "Cardiolipin Antigen in the Microscopic Slide Precipitation Test for Syphilis". *Amer J Clin Path* 16: 68-80, 1946.

---

# REACCIONES DE KLINE CON ANTIGENO DE LECITINA SINTETICA Y CARDIOLIPINA (LSC) CON SUERO (1)\*

---

## Equipo

El mismo que para la reacción del antígeno LNC de Kline.

## Cristalería

1. La misma que para la reacción del antígeno LNC de Kline.
2. Tubos de centrifuga de fondo redondo, de 3 x 1 pulgadas.
3. Pipeta con capacidad de 2,0 ml, graduada en 1/100 ml hasta la punta.

## Reactivos

1. Agua destilada, solución de colesterol al 1% y solución salina al 0,85%, en la forma descrita para los reactivos de la suspensión de antígeno LNC. Debe prepararse diariamente la solución salina.
2. Solución de L-a-Dimiristoil-lecitina sintética al 2½ % en etanol (químicamente pura).<sup>1</sup>
3. Cardiolipina al 2½ % en metanol.<sup>1</sup>

## Preparación de los sueros

Se preparan en la misma forma que para la reacción del antígeno LNC de Kline.

## Preparación de la suspensión de antígeno LSC

1. Depósitese con pipeta 1,0 ml de agua destilada en un frasco de 30 ml con tapón de vidrio.
2. Manténgase el frasco en ángulo. Con una pipeta de 2,0 ml, alargada hasta la punta, déjense gotear lentamente (en 30 segundos) 1,25 ml de solución de colesterol sobre el agua mientras que al mismo tiempo se hace girar el frasco sobre una superficie plana a una velocidad de 140 rpm.

---

\* En julio de 1966 el Laboratorio de Investigación sobre Enfermedades Venéreas discontinuó esta reacción y no mantiene ni ejecuta pruebas con los reactivos y controles que se utilizaban para la misma.

<sup>1</sup> LaMotte Chemical Products Company, Chestertown, Maryland.

3. Hágase girar suavemente el frasco sobre una superficie plana durante 20 segundos más.

4. Con una pipeta de 0,2 ml añádanse 0,09 ml de solución de lecitina sintética al 2½ por ciento. Se tapa el frasco y se agita vigorosamente (lanzando el líquido de abajo hacia arriba y viceversa) durante 15 segundos.

5. Con una pipeta de 0,2 ml añádanse 0,10 ml de solución de cardio-lipina al 2½ por ciento. Se tapa el frasco y de nuevo se agita vigorosamente durante 1 minuto.

6. Con una pipeta de 5 ml añádanse 2,5 ml de solución salina al 0,85 por ciento. Tápese el frasco y agítese a base de oscilaciones suaves durante 20 segundos.

7. Deposítense con pipeta 3,0 ml de suspensión en un tubo de ensayo de 3 x 1 pulgadas, de fondo redondo, y centrifúguese durante 8 minutos a una fuerza equivalente a 1.800 rpm, en una centrífuga I.E.C.<sup>2</sup> de Tamaño 1, o a 1.600 rpm en una de Tamaño 2.

8. Decántese el líquido sobrenadante, que debe estar ligeramente turbio.

9. Añádanse al sedimento 1,8 ml de solución salina al 0,85 por ciento. Hágase girar vigorosamente el tubo sobre una superficie plana durante 30 segundos para dispersar las partículas de antígeno.

10. Pásese esta suspensión final a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm. Si se mantiene a temperatura ambiente puede usarse inmediatamente y hasta una hora después de preparada. Si se guarda en el refrigerador a 6°-10°C dará resultados satisfactorios durante 7 horas. Por consiguiente, si los análisis han de ejecutarse durante varias horas después de preparada la suspensión centrifugada, esta debe guardarse en el refrigerador. Para asegurar la debida refrigeración de la suspensión se mantiene un vaso con agua en el refrigerador y el tubo de suspensión se coloca en ella de modo que el nivel del agua sea más alto que el de la suspensión que se guarda en el tubo.

### **Verificación de la exactitud de las agujas para depósito de la suspensión**

Es la misma que la descrita en la pág. 27 para la reacción del antígeno LNC de Kline.

### **Prueba preliminar de la suspensión de antígeno**

Es la misma que la que se describe en la pág. 27 para la reacción del antígeno LNC de Kline.

<sup>2</sup> International Equipment Company, Boston, Massachusetts.

## **Reacciones serológicas cualitativas y cuantitativas de Kline con suspensión de antígeno LSC**

Las reacciones serológicas con suspensión de antígeno LSC se practican, leen y consignan en igual forma que las reacciones con suspensión de antígeno de lecitina natural y cardiopina.

### **Referencia**

(1) KLINE, B. S., y SUESSENGUTH, H.: "Improved Emulsion of Cardiopin, Synthetic Lecithin Antigen for the Kline Test". *Amer J Clin Path* 30: 473-476, 1958.

---

# REACCIONES DE KOLMER (1) (2) (3)

---

*Antes de ejecutar estas reacciones, el técnico debe estar bien enterado del contenido de los capítulos Información general y Equipo general.*

## Equipo

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

## Cristalería

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

## Reactivos

1. Antígeno de cardiolipina.

El antígeno de cardiolipina para las reacciones de Kolmer es una solución alcohólica que contiene cardiolipina al 0,03%, lecitina al 0,05% y colesterol al 0,3 por ciento.

*Nota: Antes de utilizar un nuevo lote de este antígeno para trabajo de rutina debe probarse mediante comparación con un antígeno estándar en pruebas cualitativas y cuantitativas con sueros Reactivo, Débilmente Reactivo y No Reactivo.*

2. Solución salina de Kolmer.

a. Disuélvanse 8,5 g de cloruro de sodio desecado (A.C.S.\*) y 0,1 g de sulfato o cloruro de magnesio en un litro de agua recién destilada. Cada serie de reacciones debe practicarse con solución salina recién preparada.

b. Colóquese en el refrigerador una cantidad de solución salina suficiente para diluir el complemento que vaya a utilizarse en las reacciones.

3. Glóbulos rojos de carnero (3).

a. Refrigérese durante 48 horas antes de utilizarse sangre de carnero recientemente obtenida.

b. Para determinar si es adecuado un nuevo lote de glóbulos, deben efectuarse titulaciones comparadas de la hemolisina y el complemento con otros glóbulos rojos de carnero de calidad aceptable.

---

\* A.C.S.: American Chemical Society: Sociedad de Química de los E.U.A.

c. Los glóbulos rojos de carnero no pueden emplearse por ser demasiado frágiles si una suspensión al 2% de glóbulos lavados presenta hemólisis después de haberse guardado durante la noche a 6°-10°C.

4. Hemolisina contra glóbulos rojos de carnero (suero de conejo inmune) (3).

La hemolisina glicerizada madre (al 50%) contra glóbulos rojos de carnero puede guardarse a la temperatura del refrigerador por períodos largos con poca pérdida de reactividad.

5. Complemento (suero de cobayo) (3).

a. El suero de cobayo debe poseer actividad de complemento en las diluciones óptimas recomendadas para la reacción.

b. El suero de cobayo deshidratado debe ser de calidad estándar para que pueda ser restituido al volumen original del suero.

c. El complemento que se guarda en estado de congelación debe dividirse en cantidades suficientes para satisfacer los requerimientos de un día a fin de evitar su destrucción como resultado de repetida congelación y descongelación. El complemento congelado debe descongelarse a temperatura ambiente o a la del refrigerador.

d. Mézclese el contenido por inversión y guárdese en el refrigerador.

### **Preparación de la dilución de antígeno**

1. Prepárese el mismo día que se vaya a usar.

2. Colóquese la cantidad necesaria de solución salina en un frasco y añádase el antígeno gota a gota mientras se agita continuamente el frasco. Enjuáguese la pipeta. La cantidad necesaria puede calcularse por el número de tubos con antígeno en la reacción y en las titulaciones. Para la reacción se necesita una cantidad de 0,5 ml de la dilución de antígeno (que suele ser de 1:150).

3. Consérvese la dilución de antígeno a temperatura ambiente en un frasco tapado.

4. El antígeno diluido debe mantenerse a temperatura ambiente por lo menos 1 hora antes de emplearlo.

### **Preparación de la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2 por ciento**

*Nota: Para las reacciones de cada día debe prepararse una suspensión nueva de glóbulos rojos de carnero al 2 por ciento.*

1. Filtrese a través de una gasa una cantidad adecuada de sangre de carnero, conservada, recogiénola en un tubo de centrífuga de 50 ml de fondo redondo.

2. Añádase al tubo 2 ó 3 volúmenes de solución salina.

3. Centrifúguense los tubos a una velocidad suficiente para sedimentar

los glóbulos en 5 minutos (en centrífuga I.E.C.,<sup>1</sup> Tamaño 1 a 2.000 rpm, o a 1.700 rpm en una de Tamaño 2).

4. Sepárese el líquido sobrenadante por succión, quitando la capa superior de glóbulos blancos.

5. Llénese el tubo con una solución salina y vuélvanse a suspender los glóbulos invirtiendo el tubo y agitándolo suavemente.

6. Centrifúguense de nuevo 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 deben utilizarse.

7. Después de separar el líquido sobrenadante del tercer lavado, los glóbulos se vierten o arrastran a un tubo de centrífuga graduado, de 15 ml. Llénese el tubo de solución salina y suspéndanse de nuevo las células por inversión. Centrifúguense a la misma velocidad empleada anteriormente, durante 10 minutos, a fin de sedimentar las células firme y uniformemente.

8. Léase el volumen de glóbulos sedimentados en el tubo de centrífuga y sepárese cuidadosamente el líquido sobrenadante.

9. Prepárese una suspensión de glóbulos de carnero al 2% lavando los glóbulos en un matraz con 49 volúmenes de solución salina. Agítese el matraz para asegurar una suspensión uniforme de los glóbulos.

#### **Ejemplo:**

$$2,1 \text{ ml (glóbulos sedimentados)} \times 49 = 102,9 \text{ ml} \\ \text{(solución salina requerida).}$$

10. Verifíquese la concentración de la suspensión de glóbulos depositando con una pipeta en un tubo de centrífuga graduado 15 ml de la suspensión de glóbulos al 2% y centrifugando durante 10 minutos a la velocidad anterior. Un volumen de 15 ml de suspensión de glóbulos preparada en forma adecuada producirá 0,3 ml de glóbulos sedimentados.

**Advertencia:** Usense solamente tubos de centrífuga con calibración comprobada respecto a las zonas de volumen de 15 ml y de glóbulos sedimentados.

**Nota:** Cuando el volumen de glóbulos sedimentados sea superior o inferior a 0,3 ml, debe corregirse la concentración de la suspensión de glóbulos. La cantidad de solución salina que debe eliminarse de la suspensión de glóbulos o añadirse, para la debida corrección, se determina con arreglo a la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Lectura obtenida en el tubo de centrífuga}}{\text{Lectura correcta en el tubo de centrífuga}} \times \text{Volumen de suspensión de glóbulos} = \left\{ \begin{array}{l} \text{Volumen corregido} \\ \text{de la suspensión} \\ \text{de glóbulos} \end{array} \right.$$

#### **Ejemplo 1:**

Volumen de la suspensión de glóbulos . . . . . 180 ml  
Lectura obtenida en el tubo de centrífuga (15 ml) . . . . . 0,27 ml

$$\frac{0,27 \text{ ml}}{0,3 \text{ ml}} \times 180 \text{ ml} = 162 \text{ ml}$$

<sup>1</sup> International Equipment Company, Boston, Massachusetts.



*Por consiguiente, hay que eliminar 18 ml de solución salina de los 180 ml de suspensión de glóbulos. La solución salina puede eliminarse centrifugando parte de la suspensión de glóbulos y extrayendo con una pipeta el volumen deseado de solución salina que deba descartarse.*

### **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 consiguiente, hay que añadir 10 ml de solución salina a los 100 ml de suspensión de glóbulos. Una suspensión de glóbulos corregida debe revisarse de nuevo centrifugando una porción de 15 ml.*

11. Colóquese el matraz con la suspensión de glóbulos en el refrigerador cuando no se esté usando. Agítese siempre suavemente antes de emplearla, a fin de asegurar una suspensión uniforme, ya que los glóbulos se sedimentan en el fondo del matraz cuando se dejan en reposo.

### **Preparación de la dilución madre de hemolisina**

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

Solución salina de Kolmer .....	94,0 ml
Fenol (en solución salina de Kolmer al 5%) .....	4,0 ml
Hemolisina glicerizada (al 50%) .....	2,0 ml

Antes de añadir la hemolisina glicerizada, mézclase bien la solución de fenol con la solución salina. Esta solución se conserva bien a la temperatura del refrigerador, pero debe desecharse cuando contenga precipitados o cuando se advierte un descenso marcado de titulación.

2. Antes de utilizar un nuevo lote de dilución madre de hemolisina (al 1:100) para trabajo de rutina, debe verificarse su titulación comparándola con la de la dilución madre de hemolisina anterior.

3. Las diluciones de hemolisina al 1:1.000 o mayores se preparan diluyendo aún más la dilución al 1:100.

### **Preparación de los sueros**

1. Centrifúguense las muestras de sangre y sepárese el suero de los coágulos por decantación.

2. Calientese el suero a 56°C durante 30 minutos. Los sueros previamente calentados deberán volverse a calentar durante 10 minutos a 56°C el mismo día del análisis.

3. Vuélvase a centrifugar todo suero en el que se hayan formado partículas visibles durante el calentamiento.

*Nota: Si se desea obtener reacciones de fijación del complemento de sensibilidad máxima en las reacciones cuantitativas de Kolmer, es necesario eliminar de los sueros las hemolisinas anticarnero naturales. Esto puede lograrse en la forma siguiente:*

- a. Deposítense con pipeta 1,0 ml de cada suero en un tubo pequeño ( $12 \times 75$  mm) y colóquese este en el refrigerador durante 15 minutos o más.
- b. Añádase a cada suero una gota de glóbulos rojos de carnero, lavados y sedimentados, y mézclese bien.
- c. Colóquense de nuevo todos los tubos en el refrigerador durante 15 minutos.
- d. Centrifúguense entonces todos los tubos y sepárense los sueros por decantación. Evítese arrastrar el residuo celular de las paredes laterales y del fondo de los tubos.
- e. Estos sueros se calientan luego a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Los sueros absorbidos, que ya habían sido calentados previamente, deberán calentarse de nuevo durante 10 minutos.

### **Preparación del líquido cefalorraquídeo**

1. Centrifúguense y decántense todos los líquidos cefalorraquídeos a fin de eliminar los restos celulares y partículas. Deben desecharse los líquidos cefalorraquídeos cuando se perciba a la simple vista que están contaminados o que contienen sangre.

2. Caliéntense todos los líquidos cefalorraquídeos a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos para destruir las sustancias anticomplementarias termolábiles.

### **Titulaciones de la hemolisina y del complemento**

*Nota: Después de preparados todos los reactivos pueden hacerse conjuntamente las 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 7 tubos (numerados del 1 al 7) en el otro lado para la titulación del complemento. Añádanse tres tubos más a la gradilla, uno para la dilución de hemolisina al 1:1.000, el otro para la dilución del complemento al 1:30, y el tercero para control de glóbulos.

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 la dilución madre de hemolisina al 1:100. Mézclese bien.

4. Deposítense con pipeta 0,5 ml de dilución de hemolisina al 1:1.000 en los primeros cinco tubos de la titulación de hemolisina.

5. Añádanse a los tubos 2 a 10, inclusive, las cantidades indicadas de solución salina y prepárense las diluciones en la siguiente forma:

Tubo No.	Ml de solución salina	Procedimiento	Dilución final de hemolisina
1	—	Ninguno.	1:1.000
2	0,5	Mézclese. Deséchense 0,5 ml.	1:2.000
3	1,0	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 6. Deséchense 0,5 ml.	1:3.000
4	1,5	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 7. Deséchense 1,0 ml.	1:4.000
5	2,0	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 8. Deséchense 1,5 ml.	1:5.000
6	0,5	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 9.	1:6.000
7	0,5	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 10.	1:8.000
8	0,5	Mézclese. Deséchense 0,5 ml.	1:10.000
9	0,5	Mézclese. Deséchense 0,5 ml.	1:12.000
10	0,5	Mézclese. Deséchense 0,5 ml.	1:16.000

6. Prepárese una dilución del complemento al 1:30 añadiendo 0,2 ml de complemento a 5,8 ml de solución salina. Mézclese perfectamente.

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

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

	Tubo No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Complemento al 1:30, ml. .	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5

9. Agréguese 0,5 ml de dilución de antígeno a cada uno de los siete tubos de la titulación del complemento.

10. Añádanse 1,7 ml de solución salina a cada uno de los 10 tubos de la titulación de la hemolisina y 2,5 ml de solución salina al tubo para control de glóbulos.

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

	Tubo No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Solución salina, ml. . . . .	1,3	1,3	1,2	1,2	1,1	1,1	1,0

12. Añádanse 0,5 ml de suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2% a cada tubo de titulación de hemolisina y al tubo para control de glóbulos.

13. 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 baño de María a 37°C durante 1 hora. Agítese la gradilla después de 30 minutos.

14. La titulación completa de la hemolisina es la que indica el cuadro 1.

**Cuadro 1. Titulación de la hemolisina**

Tubo No.	Dilución de hemolisina (0,5 ml)	Complemento al 1:30, ml	Solución salina, ml	Suspensión de glóbulos de carnero (al 2%), ml
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. Retírese la gradilla del baño de María y léase la titulación de la hemolisina.

*La unidad de hemolisina es la mayor dilución que produce una hemólisis completa.*

La hemolisina para la titulación del complemento y las reacciones se diluye de modo que 0,5 ml contengan 2 unidades y que la dilución sea por lo menos al 1:2.000.

16. Prepárese hemolisina diluida que contenga 2 unidades por 0,5 ml, en cantidad suficiente para la titulación del complemento en la forma que indica el cuadro 2.

**Cuadro 2**

Dilución que contiene 1 unidad por 0,5 ml	Dilución que contiene 2 unidades por 0,5 ml	Para preparar una dilución con 2 unidades de hemolisina, mézclase	
		Solución de hemolisina al 1:100, ml	Solución salina, 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	0,2	7,8
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. Añádanse 0,5 ml de hemolisina diluida (que contenga 2 unidades de hemolisina) a cada uno de los siete 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 siete tubos de la titulación del complemento. La adición de hemolisina y de glóbulos a la titulación del complemento debe completarse sin demora, de preferencia *en el curso de los 5 minutos* posteriores al momento en que se retire la gradilla del baño de María.

19. Agítese cada tubo de la titulación del complemento para asegurar una distribución uniforme de los glóbulos y pónganse nuevamente los tubos en el baño de María a 37°C durante 30 minutos.

20. En el cuadro 3 puede verse la titulación completa del complemento.

**Cuadro 3. Titulación del complemento**

Tubo No.	Comple- mento al 1:30, ml	Dilución de antígeno, ml	Solución salina, ml	Baño de María a 37°C durante 1 hora.	Hemolisina, ml	Suspensión de glóbulos de carnero (al 2%), ml	Baño de María a 37°C durante ½ hora.
1	0,20	0,5	1,3		0,5	0,5	
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	

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

*La unidad exacta es la menor cantidad de complemento que produce una hemólisis completa. La unidad completa contiene 0,05 ml más que la unidad exacta.*

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

**Ejemplo:**

Unidad exacta	0,3 ml
Unidad completa	0,35 ml
Dosis (2 unidades completas)	0,7 ml

La dilución del complemento que debe emplearse en las reacciones puede calcularse dividiendo 30 (recíproca de la dilución completa) por la dosis, es decir,  $\frac{30}{0,7} = 43$  o sea, una dilución del suero de cobayo al 1:43.

22. En el cuadro 4 se indican los límites de las diluciones del complemento utilizables y su preparación.

De vez en cuando se encuentran complementos hiperactivos que dan titulaciones que indican 2 unidades completas por mililitro en diluciones

Cuadro 4

Dilución del complemento al 1:30, ml			Dilución que contiene 2 unidades completas por 1 ml	Preparación		
Unidad exacta	Unidad completa	Dos unidades completas		Complemento no diluido, ml		Solución salina, ml
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

superiores al 1:43. Estos complementos deben emplearse a la dilución de 1:43 para obtener reacciones adecuadas.

*Nota: Los tubos de las titulaciones del complemento o de la hemolisina que presenten hemólisis completa pueden retirarse y colocarse en el refrigerador para emplearlos posteriormente como soluciones de hemoglobina para los estándares de lectura (véase pág. 42).*

### Reacciones cualitativas de Kolmer con suero y líquido cefalorraquídeo

1. Colóquense tubos de ensayo de 15×85 mm en gradillas de alambre de modo que haya dos tubos para cada suero y líquido cefalorraquídeo y para sueros control de títulos conocidos de reactividad (véase "Preparación y empleo de los sueros control", pág. 10). Numérese la primera hilera de tubos de modo que estos correspondan a los sueros, al líquido cefalorraquídeo y a los sueros control que se examinan. Se destinarán otros tres tubos para control de reactivos (antígeno, sistema hemolítico y control de glóbulos).

2. Deposítense con pipeta 0,2 ml de cada suero control y de cada suero que se vaya a analizar y 0,5 ml de cada muestra de líquido cefalorraquídeo en los tubos adecuados de las hileras primera (reacción) y segunda (control).

3. Deposítense con pipeta 0,5 ml de solución salina de Kolmer en cada tubo de la segunda hilera (suero individual y/o controles del líquido cefalorraquídeo).

4. Deposítense solución salina en los tres tubos para control de reactivos en la siguiente forma:

Control de antígeno .....	0,5 ml
Control del sistema hemolítico .....	1,0 ml
Control de glóbulos .....	2,5 ml

5. Añádanse 0,5 ml de la dilución de antígeno al primer tubo de cada reacción, ya sea suero, suero control o líquido cefalorraquídeo, y al tubo para control de antígeno.

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

7. Durante este intervalo, prepárese complemento diluido al título con solución salina de Kolmer *fría*. La cantidad de dilución del complemento se calcula determinando el número de tubos de cada serie de reacciones y destinando para cada tubo 1,0 ml más un ligero excedente.

8. Añádase 1,0 ml de complemento diluido (que contenga 2 unidades completas) a todos los tubos, excepto al de los glóbulos, conforme se indica a continuación:

- a. Añádase complemento diluido a una gradilla de tubos.
- b. Mézclese agitando la gradilla y colóquese en el refrigerador.
- c. Repítanse los pasos a. y b. para cada gradilla de tubos.

9. Refrigérense las reacciones (incubación primaria) a 6°-10°C durante 15 horas por lo menos, pero sin exceder de 18 horas.

10. A la mañana siguiente, prepárense estándares de lectura en la forma siguiente:

- a. Calientense en baño de María a 56°C durante 5 minutos los tubos de solución de hemoglobina reservada de la titulación del día anterior.
- b. Prepárese una dilución al 1:6 de suspensión de glóbulos al 2% añadiendo 1,0 ml de la suspensión de glóbulos al 2% a 5,0 ml de solución salina.
- c. Prepárense estándares de lectura mezclando hemoglobina y la suspensión de glóbulos al 1:6 en las proporciones indicadas en el cuadro 5.

**Cuadro 5**

Suspensión de glóbulos al 1:6, ml	Solución de hemoglobina, ml	Complemento fijado %	Resultado
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	±
0,0	3,0	0	—

11. Prepárese hemolisina diluida al título con solución salina. La cantidad de dilución de hemolisina se calcula determinando el número de tubos para cada serie de reacciones y destinando 0,5 ml para cada tubo más un ligero excedente.

**12.** Retírense las gradillas con tubos del refrigerador a intervalos regulares de 5 ó 10 minutos y colóquelas inmediatamente en baño de María a 37°C durante 10 minutos. El intervalo se determinará por el tiempo que se requiere para agregar la hemolisina y la suspensión de glóbulos de carnero a cada gradilla.

**13.** Retírese cada gradilla del baño de María y añádanse a todos los tubos 0,5 ml de hemolisina diluida, excepto al tubo para control de glóbulos. Agítense las gradillas.

**14.** Añádanse a todos los tubos 0,5 ml de suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2% (preparada el día anterior). La suspensión de glóbulos al 2% debe agitarse de cuando en cuando para asegurar la suspensión uniforme de las células durante el período en que se añade este reactivo a las reacciones de fijación del complemento.

**15.** Mézclese perfectamente el contenido de los tubos agitando cada gradilla antes de colocarla de nuevo en el baño de María a 37°C para la incubación secundaria.

**16.** Examínense los controles de antígeno y del sistema hemolítico a *intervalos de 5 minutos* para determinar el "tiempo de clarificación", es decir, el lapso de tiempo necesario para producir hemólisis completa. En ningún momento debe producirse hemólisis en el control de glóbulos.

**17.** Para determinar el "tiempo de lectura", examínense los sueros control de títulos conocidos de reactividad a *intervalos de 5 minutos*. El "tiempo de lectura" es el lapso que se requiere para reproducir la pauta establecida de reactividad de los sueros control.

*Nota: El "tiempo de lectura" debe ser por lo menos 10 minutos más que el "tiempo de clarificación", pero sin exceder, en total, de 60 minutos.*

**18.** En el tiempo de lectura retírese del baño de María cada gradilla con tubos y léanse los resultados comparándolos con los estándares de lectura, pág. 42. Si la lectura cae entre dos tubos de los estándares de lectura, se anota el valor inferior.

**19.** Si alguna muestra presenta hemólisis incompleta en el tubo de control, colóquense de nuevo ambos tubos en el baño de María a 37°C para una incubación que no exceda de 60 minutos. Léanse los tubos de control a intervalos de 5 minutos y regístrense los resultados de la reacción cuando en el tubo de control se observe hemólisis completa.

**20.** Anótense los resultados de las reacciones cualitativas en la forma indicada en el cuadro 6.



**Cuadro 6. Informe de la reacción cualitativa de Kolmer**

Lectura del tubo de ensayo	Lectura del tubo de control	Resultado	Lectura del tubo de ensayo	Lectura del tubo de control	Resultado
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.			

**Esquema de la reacción cualitativa de Kolmer con suero y líquido cefalorraquídeo**

Tubo No.	Solución salina, ml	Antígeno diluido, ml	Agítese bien la gradilla. Déjese reposar a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.	Dos unidades completas de complemento, ml	Agítese bien la gradilla. Incubación primaria, entre 6° y 10° C, durante 15 a 18 horas, seguida de baño de María a 37° C durante 10 minutos.	Dos unidades de hemolisina, ml	Suspensión de glóbulos de carnero (al 2%), ml	Agítese bien la gradilla. Incubación secundaria en baño de María a 37° C.	
<i>Suero, ml</i>									
Reacción . . . . .	0,2	Ninguna		0,5		1,0	0,5		0,5
Control . . . . .	0,2	0,5		Ninguno		1,0	0,5		0,5
<i>Líquido cefalorraquídeo, ml</i>									
Reacción . . . . .	0,5	Ninguna	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5		
Control . . . . .	0,5	0,5	Ninguno	1,0	0,5	0,5	0,5		
<i>Controles de reactivos</i>									
Antígeno . . . . .	0,5	0,5		1,0		0,5	0,5		
Sistema hemolítico . .	1,0	Ninguno		1,0		0,5	0,5		
Glóbulos . . . . .	2,5	Ninguno		Ninguno		Ninguna	0,5		

### Reacciones cuantitativas de Kolmer con suero y líquido cefalorraquídeo

1. Colóquense tubos de ensayo de 15×85 mm en gradillas de alambre, destinando 8 tubos para cada suero y 6 para cada líquido cefalorraquídeo que vaya a analizarse. Inclúyanse controles de reactivos (antígeno, sistema hemolítico y control de glóbulos) y sueros control de títulos conocidos de reactividad.

2. Para cada suero, deposítense con pipeta 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. Para cada líquido cefalorraquídeo, deposítense con pipeta 0,5 ml de solución salina en los tubos 2, 3, 4, 5 y 6.

4. En cada uno de los tubos para control de los reactivos siguientes deposítense con pipeta la cantidad de solución salina indicada:

Control de antígeno .....	0,5 ml
Control hemolítico .....	1,0 ml
Control de glóbulos .....	2,5 ml

5. Para cada suero procédase en la forma siguiente:

Tubo No.	Procedimiento	Dilución de suero
1 .....	Añádanse 0,6 ml de suero calentado. Mézclese y pásense 0,5 ml al tubo 8 (control) y al tubo 2.	No diluido.
2 .....	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 3.	1:2
3 .....	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 4.	1:4
4 .....	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 5.	1:8
5 .....	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 6.	1:16
6 .....	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 7.	1:32
7 .....	Mézclese. Deséchense 0,5 ml.	1:64
8 .....	.....	No diluido (control).

6. Para cada líquido cefalorraquídeo procédase en la forma siguiente:

Tubo No.	Procedimiento	Dilución del líquido cefalorraquídeo
1 .....	Añádanse 0,5 ml de líquido cefalorraquídeo.	No diluido.
2 .....	Añádanse 0,5 ml de líquido cefalorraquídeo. Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 3.	1:2
3 .....	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 4.	1:4
4 .....	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 5.	1:8
5 .....	Mézclese. Deséchense 0,5 ml.	1:16
6 .....	Añádanse 0,5 ml de líquido cefalorraquídeo.	No diluido (control).

7. Añádanse 0,5 ml de antígeno diluido a los primeros 7 tubos de cada reacción de suero, a los primeros 5 tubos de cada reacción de líquido cefalorraquídeo, a los tubos de *ensayo* de los sueros control y al tubo para control de antígeno. Agítense las gradillas para mezclar perfectamente.

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

9. Termínense las reacciones en la forma indicada en los pasos 7 a 18 de la técnica para ejecutar las "Reacciones cualitativas de Kolmer con suero y líquido cefalorraquídeo", págs. 42-43.

10. Las reacciones cuantitativas que presenten hemólisis completa en el tubo de control se anotan en términos de la mayor dilución que produzca un resultado Reactivo (1+, 2+, 3+, ó 4+) con arreglo al cuadro 7.

**Cuadro 7**

Sueros o líquido cefalorraquídeo							Resultado
Sin diluir	Diluciones						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
4	3	1	—	—	—	—	Reactivo, en dilución al 1:4, o 4 dils.
4	—	—	—	—	—	—	Reactivo (4+), sin diluir, o 1 dil.
4	4	3	2	—	—	—	Reactivo, en dilución al 1:8, u 8 dils.
4	4	4	4	4	1	—	Reactivo, en dilución al 1:32, o 32 dils.
3	1	—	—	—	—	—	Reactivo, en dilución al 1:2, o 2 dils.
1	—	—	—	—	—	—	Reactivo, (1+), sin diluir, o 1 dil.
2	1	±	—	—	—	—	Reactivo, en dilución al 1:2, o 2 dils.
±	—	—	—	—	—	—	Débilmente Reactivo.
—	—	—	—	—	—	—	No Reactivo.
4	4	4	4	4	4	4	Véase <i>Nota</i> a continuación.

*Nota: Si se obtiene un resultado Reactivo con la mayor dilución de la reacción cuantitativa ordinaria (1:64), pueden prepararse y analizarse diluciones más altas.*

**11.** Si se da el caso de hemólisis incompleta en cualquier muestra en el tubo de control, colóquense de nuevo todos los tubos en el baño de María a 37°C durante un período de incubación que no exceda de 60 minutos. Léanse los tubos de control a intervalos de 5 minutos y regístrense los resultados de la reacción cuando se observe hemólisis completa en el tubo de control.

**12.** Notifíquense los resultados conforme al cuadro 8.

**Cuadro 8. Informe de la reacción cuantitativa**  
(Después de una incubación secundaria a 37°C durante una hora)

Lectura de los tubos de ensayo	Lectura del tubo de control	Resultado <sup>1</sup>
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.

<sup>1</sup> Se han omitido las designaciones cuantitativas de los puntos finales de dilución o dils.

## Esquema de la reacción cuantitativa de Kolmer con suero y líquido cefalorraquídeo

Tubo No.		Antígeno diluido, ml		Dos unidades completas de complemento, ml		Dos unidades de hemolisina, ml	Suspensión de glóbulos de carnero (al 2%), ml
	<i>Suero (en 0,5 ml)</i>						
1 .....	0,2 (no diluido)	0,5		1,0		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 (control no diluido)	Ninguno		1,0		0,5	0,5
	<i>Líquido cefalorraquídeo (en 0,5 ml)</i>						
1 .....	0,5 (no diluido)	0,5		1,0		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 (control no diluido)	Ninguno		1,0		0,5	0,5
<i>Controles de reactivos</i>							
Antígeno, 0,5 ml de solución salina		0,5	Agítese bien la gradilla. Déjesela reposar a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.	1,0	Agítese bien la gradilla. Incubación primaria, entre 6° y 10°C, durante 15 a 18 horas, seguida de baño de María a 37°C durante 10 minutos.	0,5	0,5
Control hemolítico, 1,0 ml de solución salina		Ninguno		1,0		0,5	0,5
Control de glóbulos, 2,5 ml de solución salina		Ninguno		Ninguno		Ninguno	0,5

Agítese bien la gradilla. Incubación secundaria en baño de María a 37°C.

### Segunda reacción de los sueros anticomplementarios

Puede practicarse una segunda reacción en los sueros anticomplementarios preparando diluciones a razón de 2 en solución salina. Cada dilución de suero se analiza en dos tubos, como reacción y control, tal como se indica para la reacción cualitativa. Los resultados de estas reacciones pueden interpretarse como "Reactivos", sin referirse al título, si la primera dilución de suero que presenta hemólisis completa en el tubo de control tiene una reacción de 3+ o 4+ en el tubo que contiene antígeno. Todas las demás reacciones se registran como "Anticomplementarias".

### Referencias

- (1) KOLMER, J. A., y LYNCH, E. R.: "Cardiolipin Antigens in the Kolmer Complement Fixation Test for Syphilis". *J Vener Dis Inform* 29: 166-172, 1948.
- (2) ———; SPAULDING, E. H., y ROBINSON, H. W.: *Approved Laboratory Technic*. 5ª edición. Appleton-Century-Crofts, Inc., 1951.
- (3) Organización Panamericana de la Salud: *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis* (Revisión de 1959). Publicación Científica 47. Washington, D.C., 1960.

---

## REACCIONES DE KOLMER AL QUINTO DE VOLUMEN (1) (2) (3) (4) (5)

---

*Antes de ejecutar estas reacciones el técnico debe estar bien enterado del contenido de los capítulos Información general y Equipo general.*

**Esta reacción de Kolmer con pequeños volúmenes puede efectuarse con antígeno de cardiolipina (no treponémico) y también con antígeno (treponémico) de proteína de Reiter (KPR).**

### Equipo

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

### Cristalería

1. Tubos de ensayo Pyrex, de 12×75 mm.
2. Tubos de ensayo Pyrex, de 15×85 mm o 13×100 mm.
3. Tubos Pyrex para centrifuga, graduados, con capacidad de 15 ml.
4. Tubos para centrífuga de fondo redondo, con capacidad de 50 ml.

### Reactivos

1. Antígenos.
  - a. Antígeno de proteína de Reiter.

Este antígeno se prepara con un cultivo de treponemas de Reiter por criólisis y precipitación con sulfato amónico.

- b. Antígeno de cardiolipina.

El mismo que se utiliza para las reacciones de Kolmer, pág. 33.

*Nota: Antes de utilizar un nuevo lote de antígeno para trabajo de rutina, debe probarse mediante comparación con un antígeno estándar tanto en pruebas cualitativas como cuantitativas con sueros Reactivo, Débilmente Reactivo y No Reactivo.*

2. Solución salina, glóbulos rojos de carnero, hemolisina y complemento.

Igual que para las reacciones de Kolmer, págs. 33-34.

## **Preparación de la dilución de antígeno**

### **1. Antígeno de proteína de Reiter.**

a. La dilución del antígeno de proteína de Reiter debe prepararse inmediatamente antes de emplearla para la reacción. La dosis para la reacción es 0,1 ml de antígeno diluido al título.

b. Deposítense la cantidad necesaria de solución salina en un matraz o en un tubo.

c. Aspírense 0,05 ml o más de antígeno de proteína de Reiter en la mitad inferior de una pipeta de 0,1 ml o 0,2 ml, graduada hasta la punta, y añádase a la solución salina.

d. Mézclese bien llenando y vaciando la pipeta unas cuantas veces en el antígeno diluido.

### **2. Antígeno de cardiolipina.**

a. La dilución del antígeno de cardiolipina debe prepararse el mismo día que se vaya a emplear. (Véase Reacción de Kolmer, pág. 34.)

b. La dosis para la reacción es de 0,1 ml de antígeno diluido (habitualmente una dilución al 1:150).

## **Preparación de la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2 por ciento**

Igual que para la reacción de Kolmer, págs. 34–36.

## **Preparación de la dilución madre de hemolisina**

Igual que para la reacción de Kolmer, pág. 36.

## **Preparación de los sueros**

Igual que para la reacción de Kolmer, pág. 36.

## **Titulaciones de la hemolisina y del complemento**

*Nota: Una vez preparados todos los reactivos pueden hacerse conjuntamente las titulaciones del complemento y de la hemolisina.*

1. Colóquense en una gradilla 10 tubos (numerados del 1 al 10).

2. 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 la dilución madre de hemolisina al 1:100. Mézclese bien.

3. Deposítense con pipeta 0,5 ml de la dilución de hemolisina al 1:1.000 en los tubos 2 a 5.

4. Añádase solución salina a los tubos 2 a 10 inclusive, y prepárense diluciones en la forma siguiente:

Tubo No.	Solución salina, ml	Procedimiento	Dilución final de hemolisina
1	—	Ninguno.	1:1.000
2	0,5	Mézclese.	1:2.000
3	1,0	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 6.	1:3.000
4	1,5	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 7.	1:4.000
5	2,0	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 8.	1:5.000
6	0,5	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 9.	1:6.000
7	0,5	Mézclese. Pásense 0,5 ml al tubo 10.	1:8.000
8	0,5	Mézclese.	1:10.000
9	0,5	Mézclese.	1:12.000
10	0,5	Mézclese.	1:16.000

5. Practíquense simultáneamente en la misma gradilla las titulaciones de hemolisina y del complemento.

6. Utilícense tubos de 12×75 mm. Colóquense, para titulación de la hemolisina, 10 tubos (numerados del 1 al 10) en un lado de la gradilla y, para la titulación del complemento, 6 tubos (numerados del 1 al 6) en el otro lado de la gradilla. Agréguese a la gradilla otro tubo para control de glóbulos.

7. Deposítese con pipeta 0,1 ml de cada una de las diluciones de hemolisina (1:1.000 a 1:16.000) en cada uno de los 10 tubos correspondientes de la titulación de hemolisina.

8. Prepárese una dilución de complemento al 1:50 añadiendo 0,1 ml de complemento a 4,9 ml de solución salina. Mézclese perfectamente.

9. Deposítese con pipeta 0,1 ml de complemento al 1:50 en cada uno de los 10 tubos de la titulación de hemolisina.

10. Añádanse las cantidades siguientes de complemento al 1:50 y de solución salina a los tubos de titulación del complemento, cerciorándose de arrastrar todo el suero adherido a la pared del tubo:

	Tubo No.					
	1	2	3	4	5	6
Complemento al 1:50 (ml) <sup>1</sup>	0,25	0,20	0,15	0,13	0,12	0,10
Solución salina (ml)	0,25	0,30	0,35	0,37	0,38	0,40

<sup>1</sup>La cantidad de complemento al 1:50 de los primeros dos tubos se puede medir con pipeta de 0,5 ml o de 0,25 ml y la de los últimos cuatro tubos con pipeta de 0,2 ml.

11. Añádase 0,1 ml de la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2% a cada uno de los tubos de la titulación de hemolisina y al tubo para control de glóbulos.

12. Añádanse 0,4 ml de solución salina a los tubos de titulación de hemolisina y 0,6 ml de solución salina al tubo para control de glóbulos.

13. Agítese cada uno de los tubos de la titulación de hemolisina para asegurar una distribución uniforme de los glóbulos y colóquese la gradilla que contiene las dos titulaciones en baño de María a 37°C durante 1 hora. Pasados 30 minutos agítese la gradilla.

14. La titulación completa de la hemolisina se indica en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Titulación de la hemolisina**

Tubo No.	Hemolisina, 0,1 ml	Complemento al 1:50, ml	Suspensión de glóbulos de carnero (al 2%), ml	Solución salina, ml
1 .....	1:1.000	0,1	0,1	0,4
2 .....	1:2.000	0,1	0,1	0,4
3 .....	1:3.000	0,1	0,1	0,4
4 .....	1:4.000	0,1	0,1	0,4
5 .....	1:5.000	0,1	0,1	0,4
6 .....	1:6.000	0,1	0,1	0,4
7 .....	1:8.000	0,1	0,1	0,4
8 .....	1:10.000	0,1	0,1	0,4
9 .....	1:12.000	0,1	0,1	0,4
10 .....	1:16.000	0,1	0,1	0,4

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

*La unidad de hemolisina es la mayor dilución que presente hemólisis completa.*

La hemolisina para la titulación del complemento y para la reacción se diluye de modo que 0,1 ml contenga 2 unidades, y la dilución sea por lo menos al 1:2.000.

16. Prepárese hemolisina diluida, con 2 unidades por 0,1 ml, en cantidad suficiente para la titulación del complemento como aparece en el cuadro 2.

**Cuadro 2**

Dilución que contiene 1 unidad por 0,1 ml	Dilución que contiene 2 unidades por 0,1 ml	Para preparar una dilución con 2 unidades de hemolisina, mézclese	
		Hemolisina al 1:100, ml	Solución salina, ml
1:4.000 .....	1:2.000	0,1	1,9
1:5.000 .....	1:2.500	0,1	2,4
1:6.000 .....	1:3.000	0,1	2,9
1:8.000 .....	1:4.000	0,1	3,9
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 0,1 ml de hemolisina diluida (que contenga 2 unidades de hemolisina) a cada uno de los seis tubos de la titulación del complemento.

18. Añádase 0,1 ml de la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2% a cada uno de los tubos de la titulación del complemento. La hemolisina y los glóbulos deben añadirse sin demora a la titulación del complemento, de preferencia *dentro de 5 minutos* después de haber retirado la gradilla del baño de María.

19. Agítese cada uno de los tubos de la titulación del complemento para asegurar la distribución uniforme de los glóbulos y vuélvase a poner la gradilla en baño de María a 37°C durante media hora.

En el cuadro 3 aparece la titulación completa del complemento.

**Cuadro 3. Titulación del complemento**

Tubo No.	Comple- mento al 1:50, ml	Solución salina, ml	Baño de María a 37°C durante 1 hora	2 unidades de hemolisina, ml	Suspensión de glóbulos de carnero (al 2%), ml	Baño de María, incubación secundaria a 37°C durante ½ hora
1 .....	0,25	0,25		0,1	0,1	
2 .....	0,20	0,30		0,1	0,1	
3 .....	0,15	0,35		0,1	0,1	
4 .....	0,13	0,37		0,1	0,1	
5 .....	0,12	0,38		0,1	0,1	
6 .....	0,10	0,40		0,1	0,1	

20. Retírese la gradilla del baño de María y léase la titulación del complemento. *La unidad exacta es la cantidad más pequeña de complemento al 1:50 que presente hemólisis completa.* Para emplearlo en la reacción, el complemento se diluye de manera que 0,2 ml contengan 2 unidades exactas.

**Ejemplo:**

Unidad exacta ..... 0,5 ml  
 Dos unidades exactas (dosis) ..... 0,30 ml  
 Dilución del complemento utilizada en la titulación .... 1:50

La dilución del complemento que vaya a emplearse en la reacción en sí puede calcularse dividiendo 50 (recíproca de la dilución del complemento) por la dosis y multiplicando el resultado por el volumen en el cual va a estar contenida la dilución, es decir:  $\frac{50}{0,3} \times 0,2 = 33$  o sea, una dilución de suero de cobayo al 1:33.

21. El cuadro 4 presenta los límites de las diluciones del complemento utilizables y su preparación.

**Cuadro 4**

Dilución de complemento al 1:50, ml		Dilución que contiene 2 unidades exactas en 0,2 ml	Preparación	
Unidad exacta	2 unidades exactas		Complemento no diluido, ml	Solución salina, ml
0,25	0,5	1:20	1,0	19,0
0,20	0,4	1:25	1,0	24,0
0,15	0,3	1:33	1,0	32,0
0,13	0,26	1:38	1,0	37,0
0,12	0,24	1:42	1,0	41,0
0,10	0,2	1:50	1,0	49,0

*Nota: Los tubos de las titulaciones del complemento o de la hemolisina que presenten hemólisis completa pueden retirarse y colocarse en el refrigerador para emplearlos posteriormente como soluciones de hemoglobina para los estándares de lectura, págs. 54-55.*

### **Reacciones cualitativas de Kolmer al quinto de volumen con suero**

1. Dispónganse tubos de ensayo de 12 x 75 mm en gradillas de alambre de modo que haya 2 tubos para cada suero y para los sueros control de títulos conocidos de reactividad (véase "Preparación y empleo de los sueros control", pág. 10). Numérese la primera hilera de tubos en tal forma que estos correspondan a los sueros y a los sueros control que se examinan. Se destinarán otros tres tubos para control de reactivos (antígeno, sistema hemolítico y glóbulos).

2. Prepárese una dilución al 1:5 de cada suero de las reacciones, añadiendo 0,2 ml de suero a 0,8 ml de solución salina de Kolmer. Mézclese bien.

3. Deposítense con pipeta 0,2 ml de cada uno de los sueros control diluidos en los correspondientes tubos de las hileras primera (reacción) y segunda (control).

4. Deposítense con pipeta 0,2 ml de la dilución al 1:5 de cada suero por analizar, en los correspondientes tubos de las hileras primera y segunda.

5. Deposítense con pipeta 0,1 ml de la solución salina de Kolmer en cada uno de los tubos de la segunda hilera (sueros control individuales).

6. Deposítense con pipeta solución salina en los tres tubos para control de reactivos en la siguiente forma:

Control de antígeno .....	0,2 ml
Control del sistema hemolítico .....	0,3 ml
Control de glóbulos .....	0,6 ml

7. Añádase 0,1 ml de la dilución de antígeno a cada uno de los tubos de la primera hilera (reacciones serológicas individuales) y al tubo para control de antígeno.

8. Déjense las gradillas en reposo a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos.

9. Durante este intervalo, prepárese complemento diluido al título con solución salina de Kolmer *fría*. La cantidad de dilución del complemento se calcula determinando el número de tubos de cada serie de reacciones y dejando para cada uno de ellos 0,2 ml más un ligero excedente.

10. Con una pipeta de 2 ml añádanse 0,2 ml de complemento diluido (que contenga 2 unidades exactas) a todos los tubos de la serie de reacciones, excepto al tubo para control de glóbulos, en la forma siguiente:

- a. Añádase complemento diluido a una gradilla de tubos.
- b. Mézclese agitando la gradilla y colóquese en el refrigerador.
- c. Repítanse los pasos a. y b. para cada gradilla de tubos.

11. Refrigérense las reacciones (incubación primaria) a 6°-10°C durante 15 horas por lo menos, pero sin exceder de 18 horas.

12. A la mañana siguiente prepárense estándares de lectura como se indica a continuación:

- a. Calientese en baño de María a 56°C durante 5 minutos la solución de hemoglobina reservada de la titulación del día anterior.
- b. Prepárese una dilución al 1:7 de suspensión de glóbulos al 2% añadiendo 0,5 ml de la suspensión de glóbulos al 2% a 3,0 ml de solución salina.
- c. Prepárense estándares de lectura mezclando hemoglobina y la suspensión de glóbulos al 1:7 en las proporciones indicadas en el cuadro 5.

**Cuadro 5**

Suspensión de glóbulos al 1:7, ml	Solución de hemoglobina, ml	Complemento fijado %	Resultado
0,7	Ninguna	100	4+
0,35	0,35	50	3+
0,35 <sup>1</sup>	1,05 <sup>1</sup>	25	2+
0,07	0,63	10	1+
0,07 <sup>1</sup>	1,33 <sup>1</sup>	5	±
Nada	0,7	0	—

<sup>1</sup> Retírense con pipeta cantidades dobles y extráiganse 0,7 ml de cada tubo después de haberlas mezclado debidamente.

13. Prepárese hemolisina diluida al título con solución salina. La cantidad de dilución de hemolisina se calcula determinando el número de

tubos para cada serie de reacciones y destinando 0,1 ml para cada tubo más un ligero excedente.

**14.** Retírense las gradillas con tubos del refrigerador a intervalos regulares de 5 a 10 minutos y colóqueselas inmediatamente en baño de María a 37°C durante 10 minutos. El intervalo se determinará por el tiempo que se requiere para agregar la hemolisina y la suspensión de glóbulos de carnero a cada gradilla.

**15.** Retírese cada gradilla del baño de María y añádase a todos los tubos 0,1 ml de hemolisina diluida, excepto al tubo para control de glóbulos. Agítense las gradillas.

**16.** Añádase a todos los tubos 0,1 ml de la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2% (preparada el día anterior). La suspensión de glóbulos al 2% debe agitarse de cuando en cuando para asegurar la suspensión uniforme de las células durante el período en que se añade este reactivo a las reacciones de fijación del complemento.

**17.** Mézclese perfectamente el contenido de los tubos agitando cada gradilla antes de colocarla de nuevo en el baño de María a 37°C para la incubación secundaria.

**18.** Examínense los controles de antígeno y del sistema hemolítico a *intervalos de 5 minutos* para determinar el “tiempo de clarificación”, es decir, el lapso de tiempo necesario para producir hemólisis completa. En ningún momento debe producirse hemólisis en el control de glóbulos.

**19.** Para determinar el “tiempo de lectura”, examínense los sueros control de títulos conocidos de reactividad a *intervalos de 5 minutos*. El “tiempo de lectura” es el tiempo que se requiere para reproducir la pauta establecida de reactividad de los sueros control.

*Nota: El “tiempo de lectura” debe ser por lo menos 10 minutos más que el “tiempo de clarificación”, pero sin exceder, en total, de 60 minutos.*

**20.** En el tiempo de lectura retírese del baño de María cada gradilla con tubos y léanse los resultados comparándolos con los estándares de lectura, pág. 54. Si la lectura cae entre dos tubos de los estándares de lectura, se anota el valor inferior.

**21.** Si alguna muestra presenta hemólisis incompleta en el tubo de control, colóquense de nuevo ambos tubos en el baño de María a 37°C para una incubación que no exceda de 60 minutos. Léanse los tubos de control a intervalos de 5 minutos y regístrense los resultados de la reacción cuando en el tubo de control se observe hemólisis completa.

**22.** Anótense los resultados de las reacciones cualitativas en la forma indicada en el cuadro 6.

**Cuadro 6. Informe de la reacción cualitativa de Kolmer**

Lectura del tubo de ensayo	Lectura del tubo de control	Resultado	Lectura del tubo de ensayo	Lectura del tubo de control	Resultado
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.			

**Esquema de la reacción de Kolmer al quinto de volumen con suero**

Tubo	Solución salina, ml	Antígeno diluido, ml	Dos unidades exactas de complemento, ml	Dos unidades de hemolisina, ml	Suspensión de glóbulos de carnero (al 2%), ml	Resultado
<i>Suero (al 1:5), ml</i>						
Reacción ..... 0,2	Ninguna	0,1	0,2	0,1	0,1	
Control ..... 0,2	0,1	Ninguno	0,2	0,1	0,1	
<i>Controles de los reactivos</i>						
Antígeno .....	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	
Sistema hemolítico .....	0,3	Ninguno	0,2	0,1	0,1	
Glóbulos .....	0,6	Ninguno	Ninguna	Ninguna	0,1	

### Reacciones cuantitativas de Kolmer al quinto de volumen con suero

1. Colóquense tubos de ensayo de 12 x 75 mm en gradillas, destinando 8 tubos para cada suero por analizar. Inclúyanse controles de reactivos (antígeno, sistema hemolítico y glóbulos) y sueros control de títulos conocidos de reactividad.

2. En cada uno de los tubos para control de reactivos siguientes deposítense con pipeta la cantidad de solución salina que se indica a continuación:

Control de antígeno ..... 0,2 ml  
Control del sistema hemolítico ..... 0,3 ml  
Control de glóbulos ..... 0,6 ml

3. Para cada suero, deposítense con pipeta 0,2 ml de solución salina en los tubos 2 a 7 inclusive, y 0,1 ml en el tubo 8.

4. Deposítense con pipeta 0,2 ml de suero (diluido al 1:5) en los tubos 1, 2 y 8.

5. Mézclese el contenido del tubo 2, transfíranse 0,2 ml al tubo 3,

y así sucesivamente hasta el tubo 7. Mézclase el contenido del tubo 7 y deséchense 0,2 ml.

6. Añádase 0,1 ml de antígeno diluido a los primeros siete tubos de cada reacción de suero, a los tubos de *ensayo* de los sueros control y al tubo para control de antígeno. Agítese la gradilla para obtener una mezcla perfecta.

7. Déjense las gradillas en reposo a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos.

8. Termínense las reacciones en la forma indicada en los pasos 9 a 20 de la técnica para ejecutar la "Reacción cualitativa de Kolmer al quinto de volumen con suero", págs. 54-55.

9. Las reacciones cuantitativas que presenten hemólisis completa en el tubo de control se anotan en términos de la mayor dilución que produzca un resultado Reactivo (1+, 2+, 3+ o 4+). El primer tubo se considera no diluido o de 1 dil. Véase "Reacción de Kolmer, cuadro 7", pág. 46. Pueden prepararse y analizarse otras diluciones si no se obtiene un punto final.

10. Si alguna muestra presenta hemólisis incompleta en el tubo de control, colóquense de nuevo todos los tubos en el baño de María a 37°C para una incubación que no exceda de 60 minutos. Léanse los tubos de control a intervalos de 5 minutos y regístrense los resultados de la reacción cuando en el tubo de control se observe hemólisis completa. Para la notificación de los resultados de la reacción, véase "Reacción de Kolmer, cuadro 8", pág. 46.

### Segunda reacción de los sueros anticomplementarios

Puede practicarse una segunda reacción en los sueros anticomplementarios preparando diluciones a razón de 2 en solución salina. Cada dilución de suero se analiza en dos tubos, el de reacción y el de control, como se indica para la reacción cualitativa. Los resultados de estas reacciones pueden interpretarse como "Reactivos", sin referirse al título, si la primera dilución de suero que presenta hemólisis completa en el tubo de control tiene una reacción de 3+ o 4+ en el tubo que contiene antígeno. Todas las demás reacciones se consignarán como "Anticomplementarias".

### Referencias

(1) KOLMER, J. A.: "The Technic of the Kolmer Complement Fixation Tests for Syphilis Employing One-Fifth Amount of Reagents". *Amer J Clin Path* 12: 109-115, 1942.

(2) D'ALESSANDRO, G., y DARDANONI, L.: "Isolation and Purification of the Protein Antigen of the Reiter Treponeme". *Am J Syph Gonorr and Vener Dis* 37: 137-150, 1953.

(3) CANNEFAX, G. R., y GARSON, W.: "Reiter Protein Complement Fixation Test for Syphilis". *Public Health Rep* 72: 335-340, 1957.

(4) BOSSAK, HILFRED N.; FALCONE, VIRGINIA H.; DUNCAN, WILLIAM P., y HARRIS, A.: "Kolmer Test with Reiter Protein Antigen". *Public Health Lab* 16: 39-48, 1958.

(5) WALLACE, A. L., y HARRIS, A.: "Preparation of Reiter Protein Antigen". *Public Health Lab* 16: 27-38, 1958.

# REACCIONES DE MAZZINI (1)\*

*Antes de ejecutar estas reacciones, el técnico debe estar bien enterado del contenido de los capítulos Información general y Equipo general.*

## Equipo

1. Máquina rotatoria, adaptable a 100-180 rpm, que describa un círculo de  $\frac{3}{4}$  de pulgada de diámetro en un plano horizontal.
2. Soporte para láminas.
3. Aguja hipodérmicas de calibre 13 y 21, con biseles recortados.

## Cristalería

1. Láminas de vidrio, de 2 x 3 pulgadas y 6 mm de ancho, con 10 concavidades de 16 mm de diámetro por 1,75 mm de profundidad.<sup>1</sup>
2. Frascos redondos con tapón de vidrio,<sup>2</sup> con capacidad para 30 ml.
3. Jeringa, tipo Luer, con capacidad de 1 ó 2 ml, o un "tubo de observación" No. 420 LST.<sup>3</sup>

## Reactivos

### 1. Antígeno.<sup>4</sup>

El antígeno para esta reacción es una solución alcohólica que contiene cardiolipina al 0,025%, lecitina al 0,2%, aproximadamente, y colesterol de 0,75 al 0,9%, y que haya sido estandarizado serológicamente mediante comparación con un antígeno de reactividad conocida. Almacénese a temperatura ambiente.

### 2. Solución salina amortiguada al 1% de pH 6,3 a 6,4.

a. Prepárese la solución conforme a la fórmula siguiente:

	g
Cloruro de sodio (químicamente puro) .....	8,1
Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) .....	0,2
Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$ ) .....	1,7
	ml
Agua destilada .....	1.000,0
Acido clorhídrico normal .....	3,2
Formaldehído (Reactivo Merck) .....	1,0

\* En julio de 1966 el Laboratorio de Investigación sobre Enfermedades Venéreas discontinuó esta reacción y no mantiene ni ejecuta pruebas con los reactivos y controles que se utilizaban para la misma.

<sup>1</sup> Clay-Adams, Incorporated, Nueva York, N. Y. 10010. No. de Catálogo A-1466; y Serological Reagents Company, Indianapolis, Indiana.

<sup>2</sup> Corning Glass Works, Corning, N. Y., No. de Catálogo LG-1, MW-90530.

<sup>3</sup> Serological Reagents Company, Indianapolis, Indiana.

<sup>4</sup> Serological Reagents Company, Indianapolis, Indiana; The Sylvana Company, Millburn, Nueva Jersey.

- b. Fíltrese y compruébese el pH de la solución.

### **Preparación de los sueros**

1. Sepárense los sueros de los coágulos por medio de centrifugación y decantación.
2. Caliéntense los sueros en baño de María a 56°C durante 30 minutos. Deben recalentarse los sueros durante 10 minutos si se repite la reacción pasadas más de 4 horas desde el primer período de calentamiento.
3. Repítase la centrifugación de toda muestra en la que se hayan formado partículas visibles durante el calentamiento.

### **Preparación de la suspensión de antígeno**

1. Deposítense con pipeta 0,4 ml de solución salina amortiguada en el fondo de un frasco de 30 ml.
2. Con una pipeta de 1 ml graduada hasta la punta, médanse 0,4 ml de antígeno colestrolizado (leyendo desde la parte inferior de la pipeta).
3. Hágase girar rápidamente el frasco y expúlsese el antígeno de la pipeta directa e inmediatamente sobre la solución salina.
4. Mézclese en seguida la suspensión aspirando y soplando rápidamente seis veces justas, restituyendo al frasco toda la suspensión que haya quedado en la pipeta.
5. Añádanse 2,6 ml de la solución salina amortiguada, tápese el frasco y agítese de abajo hacia arriba y viceversa *50 veces en 15 segundos*.
6. La suspensión está lista para uso inmediato y puede utilizarse durante todo el día.
7. Mézclese suavemente la suspensión de antígeno cada vez que se use. La suspensión no debe mezclarse haciéndola pasar a la fuerza de un lado a otro de la jeringa y la aguja, puesto que eso podría ocasionar la descomposición de partículas y pérdida de reactividad.

### **Verificación de la exactitud de las agujas para depósito de la suspensión**

1. Es de primordial importancia emplear las cantidades adecuadas de reactivos; por esta razón, deben examinarse diariamente las agujas que se empleen. Mediante la práctica se logra el depósito rápido de la suspensión de antígeno y solución salina, pero debe tenerse cuidado de obtener gotas de tamaño uniforme.
2. Para las reacciones cuantitativa y cualitativa en lámina, la suspensión de antígeno se administra de una jeringa (o "tubo de observación"), a la que va unida una aguja despuntada de calibre 21, que rendirá 100 gotas  $\pm$  2 gotas de suspensión de antígeno por mililitro cuando se verifica con una jeringa de 1 ó 2 ml sostenida en posición vertical.



3. Para la reacción cualitativa en lámina, se reparte solución salina al 0,9% de una jeringa a la que va unida una aguja despuntada de calibre 13, la que rendirá 20 gotas  $\pm$  1 gota de solución salina por mililitro al sostener verticalmente la jeringa y la aguja.

4. Las agujas que no satisfagan las especificaciones indicadas deben ser ajustadas, a fin de que rindan los volúmenes correctos.

### **Prueba preliminar de la suspensión de antígeno**

1. Pruébense sueros control de títulos conocidos de reactividad (véase "Preparación y empleo de los sueros control", pág. 10) y la solución salina amortiguada como se describe en la "Reacción cualitativa de Mazzini con suero".

2. Los resultados obtenidos deben reproducir la pauta establecida de reactividad para esos sueros y presentar completa dispersión de partículas de antígeno tanto en el suero No Reactivo como en la solución salina amortiguada.

3. No debe utilizarse una suspensión de antígeno que no sea adecuada.

### **Reacción cualitativa de Mazzini con suero**

1. Deposítense con pipeta 0,03 ml de cada suero en una concavidad separada.

2. Añádase una gota de suspensión de antígeno (0,01 ml) a cada suero.

3. Háganse girar las láminas en la máquina rotatoria a 160–180 rpm durante 4 minutos.

*Nota: Cuando las reacciones se ejecuten en un clima cálido y seco, las láminas pueden cubrirse con la tapa de una caja provista de un papel secante húmedo a fin de impedir exceso de evaporación durante la rotación.*

4. Añádase a cada reacción una gota (aproximadamente 0,05 ml) de solución salina al 0,9 por ciento.

5. Háganse girar las láminas durante un segundo período de 4 minutos en una máquina rotatoria regulada a 100–120 rpm.

6. Léase cada reacción al microscopio con objetivo débil (10X) y un ocular de 6X. Anótense los resultados en la forma siguiente:

#### **a. Reacciones típicas**

<b>Lectura</b>	<b>Resultado</b>
Grumos medianos o grandes.....	Reactivo (R)
Grumos pequeños .....	Débilmente Reactivo (D)
Sin grumos o con muy ligera floculación..	No Reactivo (N)

#### **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 libres de antígeno. Los sueros que presenten reacción atípica deben volverse a analizar, conforme se describe 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 fuese necesario, en la forma siguiente:
  - a. Depositense con pipeta 0,5 ml de solución salina amortiguada en cada uno de 6 (o más) tubos.
  - b. Añádanse 0,5 ml de suero calentado al primer tubo y mézclese.
  - c. Pásense 0,5 ml de suero diluido del primer tubo al segundo y mézclese.
  - d. Continúese pasando y mezclando de un tubo al siguiente hasta que se hayan preparado todas las diluciones. Déjese en el último tubo la pipeta con que se hizo la mezcla.
2. Depositense con pipeta 0,05 ml de cada dilución de suero en distintas concavidades de una lámina de vidrio.
3. Añádase una gota (0,01 ml) de suspensión de antígeno a cada suero diluido en la lámina.
4. Hágase girar la lámina en una máquina rotatoria a 180 rpm durante 4 minutos.
5. Léanse y anótense los resultados en la forma descrita para las reacciones cualitativas (pág. 60).
6. Anótense los resultados en términos de la mayor dilución de suero que presente un resultado Reactivo de acuerdo con los ejemplos siguientes:

Diluciones de suero						Resultado
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
R	R	R	D	—	—	Reactivo, en dilución al 1:8, u 8 dils.
R	R	D	—	—	—	Reactivo, en dilución al 1:4, o 4 dils.
R	R	R	R	D	—	Reactivo, en dilución al 1:16, o 16 dils.

### Referencia

(1) MAZZINI, L. Y.: "Mazzini Cardiolipin Microflocculation Test for Syphilis". *J Immun* 66: 261-275, 1951.

---

# REACCION DEL PLASMACRITO

## (PPC) (1) (2) (3) (4)

---

*Antes de ejecutar esta prueba, el técnico debe estar bien enterado del contenido de los capítulos Información general y Equipo general.*

**Nota:** La reacción PPC es un procedimiento de selección o exclusión para descubrir aquella sangre que necesite un estudio serológico más completo. Esta reacción no debe utilizarse para el diagnóstico final ni para el control del tratamiento de la sífilis (1).

### Equipo

1. Centrífuga microhematócrita, Modelo MB, capaz de alcanzar una velocidad de 12.300 rpm.<sup>1</sup>
2. Máquina rotatoria, adaptable a 180 rpm, que describa un círculo de  $\frac{3}{4}$  de pulgada de diámetro en un plano horizontal.
3. Máquina para rellenar ampollas.
4. Regla de plástico en milímetros.
5. Agujas hipodérmicas de calibre 23 ó 25, sin bisel.
6. Plastilina (vinilita u otro material semejante) para sellar tubos capilares <sup>2</sup> o Critocaps.<sup>2</sup>
7. Perillas pequeñas de goma para vacuna.

### Cristalería

1. Láminas de vidrio, de 2 x 3 pulgadas, con anillos de cerámica de 11 mm.<sup>3</sup>
2. Jeringa tipo tuberculina con capacidad para 1 ml, graduada en centésimas.
3. Tubos capilares microhematócrito-plasmacrito, de 75 mm de largo, heparinizados, y tubos de vidrio no corrosivo, de baja solubilidad, con control estricto de agujeros (1,2 mm D.I.).<sup>4</sup>

### Reactivos

1. Suspensión de antígeno PPC.

<sup>1</sup> International Equipment Company, Boston, Massachusetts.

<sup>2</sup> Scientific Products Company, Evanston, Illinois, No. de Catálogo B4425 (Critoseal), o B4422 (Critocaps).

<sup>3</sup> Scientific Products Company, Evanston, Illinois, No. de Catálogo M-6233.

<sup>4</sup> Scientific Products Company, Evanston, Illinois, No. de Catálogo B6770.

La suspensión de antígeno para la reacción PPC es la misma que la que se emplea en la reacción de reagina en suero no calentado (RSNC). Se prepara utilizando el mismo equipo, cristalería, reactivos y procedimiento que los descritos en las págs. 87-89.

## **2. Controles de plasma o suero.**

Se prefiere plasma, que puede obtenerse de sangre vieja en un banco de sangre cercano (control No Reactivo) o de un banco de sangre que vaya a ser desechado debido a la reactividad en las pruebas serológicas para el diagnóstico de la sífilis. Las diluciones de plasma Reactivo en plasma No Reactivo que produzcan resultados Reactivos y Débilmente Reactivos apropiados, se escogen por medio de pruebas de ensayo y se mantienen para uso cotidiano junto con el control de plasma No Reactivo. Para fines de control puede emplearse también suero diluido apropiado. Las mezclas de control de plasma o suero pueden guardarse en el refrigerador. Para uso diario, deben colocarse a temperatura ambiente durante 30 minutos por lo menos.

## **Preparación del plasma**

1. Lléñese un tubo PPC con sangre capilar (del dedo de la mano, del pie o de la oreja) hasta llegar a 5 ó 10 mm del borde superior.
2. Hágase girar suavemente o inclínese con precaución el tubo a fin de mezclar la sangre con el heparinato de amonio que se encuentra en el tubo.
3. Séllese el extremo vacío (seco) del tubo con plastilina o Critocap.
4. Centrifúguese 2 ó 3 minutos en la centrífuga microhematócrita.

## **Verificación de la exactitud de las agujas para depósito de la suspensión**

1. Es de primordial importancia emplear las cantidades debidas de reactivos; por esta razón, todos los días deben examinarse las agujas que se empleen. Con la práctica se logrará un depósito rápido de suspensión de antígeno, pero debe tenerse cuidado de obtener gotas de tamaño uniforme.

2. Para la reacción PPC, la suspensión de antígeno se administra con una jeringa a la que va unida una aguja despuntada, de calibre 23 ó 25, que rendirá  $100 \text{ gotas} \pm 2 \text{ gotas}$  de suspensión de antígeno por mililitro cuando se verifica con una jeringa de tuberculina de 1 ml sostenida en posición vertical.

3. Las agujas que no satisfagan las especificaciones indicadas, deben ser ajustadas antes de usarse, a fin de que rindan los volúmenes correctos.

## **Prueba preliminar de la suspensión de antígeno**

1. La suspensión de antígeno debe examinarse primero con controles de plasma o suero de títulos conocidos de reactividad, mediante el método descrito en la "Prueba del plasmacrito (PPC) con plasma".

2. Sólo se emplearán las suspensiones que hayan producido las reacciones indicadas con los controles.

### Prueba del plasmacrito (PPC) con plasma

1. Mídase una columna de plasma de 22 mm desde arriba hacia la costra grisácea.<sup>5</sup> Hágase una muesca en el tubo con una lima y rómpase la columna de plasma que contiene 0,025 ml. La longitud máxima permisible de plasma es 26 mm (0,03 ml); la mínima, 20 mm (0,023 ml).

2. Conéctesele una perilla pequeña para vacuna y viértase el plasma en un anillo (11 mm) de la lámina.

3. Añádase una gota (0,01 ml) de suspensión de antígeno PPC.

4. Hágase girar la lámina en una máquina rotatoria durante 4 minutos a 180 rpm.

*Nota: Si el laboratorio está excesivamente cálido y seco, la evaporación puede constituir un problema. Para conservar la humedad puede colocarse la lámina en una caja de Petri en la que haya una torunda de algodón húmeda.*

5. Inmediatamente después de la rotación, léanse las reacciones con un aumento de 100X. Los niveles de lectura son similares a los empleados en la reacción VDRL en lámina, y los resultados se informan del modo siguiente:

<b>Lecturas</b>	<b>Resultados</b>
Grumos medianos y grandes . . . . .	Reactivo (R)
Grumos pequeños . . . . .	Débilmente Reactivo (D)
Sin grumos o de escasa floculación . . . . .	No Reactivo (N)

### Referencias

- (1) ANDUJAR, J. J., y MAZUREK, E. E.: "The PlasmaCritt (PCT) Test on Capillary Blood". *Amer J Clin Path* 31: 197-204, 1959.
- (2) HARRIS, A.; SUNKES, E. J.; BUNCH, W. L., Jr., y BOSSAK, H. N.: "An Evaluation of the PlasmaCritt (PCT) Screening Test for Syphilis". *Public Health Lab* 17: 83-86, 1959.
- (3) BALOWS, A.; McCLELLAN, J. T., y ALLEN, S.: "An Evaluation of the PlasmaCritt (PCT) Test for Syphilis in a Clinical Laboratory". *Transfusion* 1: 171-174, 1961.
- (4) ANDUJAR, J. J., y MAZUREK, E. E.: "Rapid and Small-Volume Reagin Tests". *Bull WHO* 24: 288-291, 1961.

<sup>5</sup>Capa de glóbulos blancos entre los glóbulos rojos y el plasma, que generalmente se produce por centrifugación de las muestras sanguíneas.

---

# DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINA DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (1) (2)

---

## Equipo

1. Colorímetro fotoeléctrico.
2. Papel cuadriculado semilogarítmico.

## Cristalería

1. Tubos de ensayo, de 13 x 100 mm en sus dimensiones exteriores.
2. Cubetas de colorímetro fotoeléctrico.

## Reactivos

1. Solución de ácido tricloracético al 10 por ciento.

Disuélvanse 10 g de ácido tricloracético (químicamente puro) en 100 ml de agua destilada. Guárdese a temperatura ambiente en un frasco con tapón de vidrio.

2. Solución salina al 0,9 por ciento.

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

3. Suero estándar.

Selecciónese suero humano claro, fresco y exento de contaminación bacteriana y de hemólisis. Filtrese el suero a través de un filtro Seitz con un disco esterilizador. Médase el suero y añádase 1 mg de mertiolato en polvo<sup>1</sup> por cada mililitro de suero. Determínese el contenido de proteína total mediante el método de Kjeldahl. Guárdese en el refrigerador.

## Curva de calibración y tabla de conversión

1. Prepárese por triplicado una solución estándar de proteína de 60 mg por ciento diluyendo suero estándar con solución salina al 0,9 por ciento.

### *Ejemplo:*

Si el contenido de proteína del suero (Kjeldahl) es de 7325 mg por ciento, se divide 7325 por 60 para encontrar el factor de dilución para el estándar de 60 mg por ciento.

$$\frac{7325}{60} = 122, \text{ o sea el factor de dilución.}$$

---

<sup>1</sup> Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana.

*En consecuencia, se diluye una parte de suero en 121 partes de solución salina al 0,9% para hacer una solución estándar de 60 mg por ciento.*

2. A partir de las soluciones de proteína de 60 mg por ciento, prepárense soluciones de proteína de 10, 20, 30, 40 y 50 mg por ciento en la forma siguiente:

Concentración de mg por ciento	Solución de 60 mg por ciento, ml	Solución salina al 0,9%, ml
10	0,5	2,5
20	1,0	2,0
30	1,5	1,5
40	2,0	1,0
50	2,5	0,5

3. Analícese la solución estándar de proteína triplicada en la misma forma que la descrita para el líquido cefalorraquídeo (véase a continuación "Ejecución de la reacción").

4. Obténganse de cada concentración de proteína los promedios triplicados de la transmisión por ciento y trácense en papel semilogarítmico.

5. Unanse con una línea los puntos de la gráfica.

6. Prepárese mediante la gráfica una tabla de conversión enumerando cada porcentaje posible del valor de la transmisión con su correspondiente concentración de proteína en miligramos por ciento.

7. Periódicamente deben ensayarse nuevas soluciones de proteína de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg por ciento a fin de verificar la exactitud del colorímetro y de los reactivos.

### **Preparación del líquido cefalorraquídeo**

Centrifúguese y decántese el líquido cefalorraquídeo. No son adecuados para el análisis los líquidos cefalorraquídeos que a la simple vista se ve que están contaminados o contienen sangre, ni los xantocrómicos.

### **Ejecución de la reacción**

1. Deposítense con pipeta 2,0 ml de líquido cefalorraquídeo <sup>2</sup> en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm.

*Nota: Cada vez que se practiquen las reacciones deben incluirse, como controles, soluciones de proteína de concentración conocida (de 20, 40 y 60 mg por ciento).*

2. Añádanse a cada líquido cefalorraquídeo y control 2,0 ml de solución de ácido tricloracético al 10 por ciento.

<sup>2</sup> Pueden analizarse cantidades menores de líquido cefalorraquídeo y ácido cloracético en las mismas proporciones siempre que el colorímetro fotoeléctrico empleado pueda adaptarse para que se puedan usar cubetas más pequeñas.

3. Inviértase el tubo dos veces para mezclar el contenido. Evítese la formación de espuma.

4. Colóquense los tubos en baño de María a 37°C durante 10 minutos.

5. Ajústese el colorímetro fotoeléctrico fijando la longitud de onda en 420 mμ.

6. Ajústese el colorímetro a una transmisión de 100% (% T) utilizando un testigo de agua.

7. Inmediatamente antes de hacer la lectura, inviertanse los tubos que contienen controles y lo desconocido y viértanse en la cubeta.

8. Léase el porcentaje de transmisión de los controles y de los desconocidos.

9. Conviértase el porcentaje de transmisión de los desconocidos y de los controles a miligramos por ciento de proteína total, conforme a la gráfica de calibración.

*Nota: Si los líquidos cefalorraquídeos contienen concentraciones de proteína superiores de 60 mg por ciento, deben diluirse adecuadamente con una solución salina al 0,9% y volverse a analizar. Los valores obtenidos de la gráfica de calibración se multiplican luego por el factor de dilución.*

### Referencias

(1) BOSSAK, H. N.; ROSENBERG, A. A., y HARRIS, A.: "A Quantitative Turbidimetric Method for the Determination of Spinal Fluid Protein". *J Vener Dis Inform* 30: 100-103, 1949.

(2) HARDING, V. L., y HARRIS, A.: "The Effect of Temperature Variants on Quantitative Turbidimetric Determinations of Spinal Fluid Protein, Using Trichloroacetic Acid". *J Vener Dis Inform* 30: 325-327, 1949.



---

## **REACCION DE FIJACION DEL COMPLEMENTO CON PROTEINA DE REITER (FCPR)**

---

Véase Reacciones de Kolmer al quinto de volumen con antígeno de proteína de Reiter (KPR), pág. 48.

---

# REACCION DE INMOVILIZACION DEL TREPONEMA PALLIDUM-200 (ITP-200) (1) (2) (3) (4)

---

*Antes de ejecutar esta reacción, el técnico debe estar bien enterado del contenido de los capítulos Información general y Equipo general.*

Esta modificación de la Reacción de Inmovilización del *Treponema pallidum* (ITP-200) fue elegida por el Laboratorio de Investigación sobre Enfermedades Venéreas (E.U.A.), para practicar reacciones en escala nacional y para estudios de investigación.

## Equipo

1. Baño de María, a 34°C.
2. Agitador Burrell, de movimiento rotatorio, adaptado a 250 oscilaciones por minuto.
3. Manómetro de mercurio.
4. Bomba de succión.
5. Gas, comprimido, con nitrógeno 95%, bióxido de carbono 5% y contenido de oxígeno no superior al 0,2 por ciento.
6. Filtro Millipore,<sup>1</sup> con discos de filtración tipo HA, blancos, de 47 ó 142 mm de diámetro.
7. Filtro Millipore,<sup>1</sup> con adaptador hipodérmico Swinney, con discos de filtración tipo HA, blancos, reticulados, de ½ pulgada de diámetro.
8. Condensador de microscopio para campo oscuro.
9. Agujas hipodérmicas de calibre 19 y 23.
10. Arcilla para modelado.
11. Instrumentos: pinzas (hemostáticas y de disección), bisturí, tijeras quirúrgicas.
12. Papel cuadrulado semilogarítmico.
13. Tapas de acero inoxidable, para cerrar tubos de 13 x 100 mm.<sup>2</sup>
14. Pipeta Propipette.<sup>3</sup>
15. Esterilizador para instrumental.
16. Contador manual Veedor.

---

<sup>1</sup> Millipore Filter Corporation, Bedford, Massachusetts.

<sup>2</sup> Bellco Glass, Inc., Vineland, Nueva Jersey, No. de Catálogo B-13.

<sup>3</sup> Will Corporation, 890 Chattahoochee Ave., Atlanta, Georgia, No. de Catálogo 2204.

17. Cubículo de seguridad (campana bacteriológica).<sup>4</sup>

18. Incubadora, adaptable a 35°C.

## Cristalería

1. Vasos de precipitación con capacidad de 250 ml, 500 ml, y 2.000 ml.

2. Matraz para ebullición, Pyrex, de fondo plano y cuello corto, impermeable a los rayos ultravioleta, con capacidad de 125 ml, con unión en  $\text{F}$ , 24/40, con conexión, 90°, con llave en  $\text{F}$ , Pyrex, con unión interior en  $\text{F}$ , 24/40° (matraz de extracción).

3. Matraz de succión con salida para tubos.<sup>5</sup>

4. Tubos Pyrex para centrífuga, graduados, con capacidad de 15 ml; y tubos Pyrex con fondo redondo, con pico, lisos, con capacidad de 50 ml.

5. Tubos Pyrex, de 13 x 100 mm, y de 15 x 85 mm.

6. Tubos de cultivo, diSPo,<sup>7</sup> estériles, de 12 x 85 mm.

7. Frascos pequeños con tapón de rosca, con capacidad de 15 ml.

8. Jeringas hipodérmicas, de vidrio o plástico, con capacidades de 2 ml y 10 ml.

9. Láminas de 3 x 1 pulgadas, con 1,1 a 1,3 mm de espesor.

10. Cubreobjetos, de 22 x 22 mm de espesor, No. 1.

11. Campanas para anaerobiosis.

12. Desecador.

13. Botellas de cuello angosto, con tapón de rosca, con capacidad de 60 ml.

*Nota: Toda la cristalería, excepto las láminas y los cubreobjetos, se limpia en mezcla bicrómica, se enjuaga después en solución de bicarbonato de sodio (al 0,4%, aproximadamente) con suficiente agua de grifo, y finalmente se enjuaga con agua destilada. Mediante la inspección diaria de un determinado número de recipientes de cristalería con una solución indicadora adecuada se evitará que la cristalería contaminada químicamente llegue al laboratorio de análisis.*

## Reactivos

1. Aceite de inmersión.

2. Grasa para llave de cierre.

3. Agua destilada.

Para preparar todas las soluciones se emplea agua bidestilada. La segunda destilación se efectúa en un destilador que sea totalmente de cristal.

<sup>4</sup> Fisher Scientific Company, 717 Forbes Ave., Pittsburgh, Pensilvania, No. de Catálogo 17-110.

<sup>5</sup> Corning Glass Works, Corning, Nueva York, No. de Catálogo LG-1, 54100 y 9120.

<sup>6</sup> Corning Glass Works, Corning, Nueva York, No. de Catálogo 1220.

<sup>7</sup> Scientific Products Company, 1210 Leon Place, Evanston, Illinois.

4. Soluciones salinas.

a. Al 8,5 por ciento. Disuélvanse 8,5 g de NaCl en 100 ml de agua destilada.

b. Al 0,85 por ciento. Disuélvanse 8,5 g de NaCl en 1.000 ml de agua destilada. Se esteriliza una cierta cantidad en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

c. Solución salina de Kolmer: solución salina al 0,85% con 0,1 g de sulfato de magnesio o cristales de cloruro por litro. Se emplea para las titulaciones y las suspensiones de glóbulos rojos.

5. Penicilinas.<sup>8</sup>

Diluida en forma que contenga 100 unidades por mililitro.

6. Medio básico.

7. Suspensión de *Treponema pallidum*, cepa Nichols.

8. Complemento (suero de cobayo).

9. Hemolisina contra glóbulos rojos de carnero (suero de conejo inmune).

10. Glóbulos rojos de carnero.

### Preparación del medio básico

1. Solución I.

a. Pónganse 25,0 g de albúmina bovina, Fracción V,<sup>9</sup> en un vaso de precipitación de 2 litros.

b. Añádanse lentamente 525,0 ml de solución salina al 0,85%, agitando suavemente con una varilla de cristal.

c. Déjese en reposo, agitando de vez en cuando, hasta completar la solución.

2. Solución II.

a. Colóquense las siguientes sustancias químicas en un matraz Erlenmeyer de 2.000 ml:

Tioglicolato de sodio <sup>10</sup>	2,19 g
Glutación <sup>11</sup>	0,387 g
Clorhidrato de cisteína <sup>11</sup>	0,198 g
Piruvato de sodio <sup>11</sup>	0,155 g
Bicarbonato de sodio (de calidad analítica)	0,712 g

*Nota: Al recibirse, el tioglicolato de sodio debe presentar 90% o más del grupo SH (5,6), y 70% o más en el momento de usarse. En el Laboratorio de Investigación sobre Enfermedades Venéreas, el tioglicolato de sodio se guarda, en las cantidades deseadas, en tubos de vidrio cerrados herméticamente.*

b. Disuélvanse los ingredientes en 202,5 ml de agua destilada.

<sup>8</sup> Riker Laboratories, Inc., Northridge, California.

<sup>9</sup> The Armour Laboratories, Armour and Company, Chicago, Illinois.

<sup>10</sup> Baltimore Biological Laboratory, Baltimore, Maryland 21218.

<sup>11</sup> Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio.

c. Añádanse 156,5 ml de solución amortiguadora de fosfato, con pH de  $7,0 \pm 0,1$  (preparada por disolución de 21,48 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 8,16 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en un litro de agua destilada y esterilizada en autoclave; se emplean sustancias químicas de calidad analítica).

d. Añádanse 62,5 ml de ultrafiltrado de suero de buey Simms,<sup>12</sup> sin indicador.

3. En un matraz Erlenmeyer de 2.000 ml añádanse 525,0 ml de Solución I a la Solución II.

4. Añádase hidróxido de sodio 1,0 N en cantidad suficiente para alcanzar un pH de 7,3 a 7,5. Esto generalmente requiere de 9,0 a 10,0 ml de solución de hidróxido de sodio por litro de medio.

5. Compruébese el pH.

6. Pásese el medio a un cilindro o matraz volumétrico de 1 litro y añádase solución salina al 0,85% hasta llegar a la marca de un litro.

7. Filtrese la solución usando un filtro Millipore esterilizado y sus accesorios.

8. Distribúyase asépticamente la solución filtrada en frascos estériles de 60 ml con tapón de rosca, en cantidades suficientes para las reacciones de un día. *Almacenado a  $-20^\circ\text{C}$ , el medio básico puede utilizarse durante un mes después de preparado (7).*

*Nota: Todas las sustancias químicas desecadas que se emplean para preparar el medio básico se mantienen en un desecador sobre  $\text{CaCl}_2$  al vacío y se conservan en el refrigerador. La solución madre amortiguadora de fosfato se mantiene en el refrigerador. Después de extraer el ultrafiltrado de las ampollas selladas, se guarda en un matraz de vidrio de 125 ml, impermeable a los rayos ultravioleta, bajo una mezcla gaseosa de  $\text{CO}_2$  al 5%— $\text{N}_2$  al 95% y se conserva en el refrigerador; puede utilizarse por un periodo de dos meses. Cada vez que se utilice, se vuelve a equilibrar la mezcla gaseosa del frasco con  $\text{CO}_2$  al 5%— $\text{N}_2$  al 95 por ciento.*

### **Preparación de la suspensión de antígeno de *Treponema pallidum***

DURANTE TODO EL PROCEDIMIENTO OBSÉRVENSE PRECAUCIONES DE RIGUROSA ESTERILIDAD.

#### **1. Técnica de inoculación.**

a. Se utilizan conejos machos, adultos jóvenes, con testículos bien desarrollados. *Los conejos comprados deben tenerse durante 30 días o más antes de ser utilizados, a fin de permitir la eliminación de antibióticos que pudieran haber recibido con su alimentación. El alimento en forma de comprimido que se dé a los conejos debe estar exento de antibióticos.*

<sup>12</sup> Microbiological Associates, Bethesda, Maryland.

**b.** Practíquese la reacción ITP en la sangre de todos los conejos. Para la inoculación, selecciónense sólo los que hayan mostrado ser No Reactivos.

**c.** Con una jeringa y una aguja de calibre 23, inocúlense 0,5 ml de suspensión de *Treponema pallidum* que contenga no menos de  $2,5 \times 10^7$  treponemas por mililitro (50 treponemas por campo microscópico en seco con gran aumento) en el cuerpo de cada testículo, evitando la inyección de los tejidos circunvecinos. *Si el extracto testicular no contiene el número estipulado de treponemas, se concentra por centrifugación en frío y se vuelven a suspender los treponemas en una cantidad menor de medio básico.*

**2. Período de incubación.**

**a.** Pónganse los conejos inoculados en jaulas dentro de una habitación con aire acondicionado, a 19°-20°C.

**b.** Examínense diariamente los conejos para ver si aparece orquitis. Los testículos orquíticos se extirpan a más tardar 10 días después de la inoculación y dentro del período de 48 horas posterior a la aparición de la orquitis cuando se utilizan para la reacción de inmovilización del *T. pallidum*. Las suspensiones de treponemas utilizadas únicamente para la inoculación de conejos pueden obtenerse de testículos de conejos que hayan sido inoculados hasta con 11 días de anterioridad. La sangre obtenida del conejo en el momento de extirparle los testículos se utiliza como control de la reacción (véase "Preparación de los sueros control", pág. 80).

**3. Preparación de la suspensión de antígeno.**

**a.** Descongélase medio básico poniéndolo en baño de María a 34°C e incúbase durante dos horas por lo menos antes de usarlo.

**b.** Mézclense bien y pásense asépticamente 30 ml de medio básico a un matraz de extracción estéril con uniones de llave de cierre selladas con grasa. Extráigase el aire del matraz y sustitúyase con una mezcla gaseosa de CO<sub>2</sub> al 5%—N<sub>2</sub> al 95 por ciento. Déjese el matraz en baño de María a 34°C hasta el momento de utilizarlo.

**c.** Desángrese el conejo y extirpensele asépticamente los testículos.

*Nota: A fin de proteger al técnico y mantener las condiciones de asepsia, los pasos d. y e. deben ejecutarse, de ser posible, en un cubículo de seguridad.*

**d.** Elimínense los tejidos adiposo y conjuntivo.

**e.** Divídanse los testículos en fragmentos finos usando tijeras. Lávese el tejido con solución salina estéril y deposítense las secciones de testículos en un matraz de extracción preparado previamente.

**f.** Manténgase el equilibrio del matraz extrayendo el aire y sustituyendo

yéndolo tres veces con una mezcla gaseosa de CO<sub>2</sub> al 5%—N<sub>2</sub> al 95 por ciento.

g. Extráiganse los treponemas del tejido colocando el matraz en un brazo oscilante del agitador Burrell mientras el matraz está sumergido parcialmente en un baño de María a 34°C, y agítese durante 30 minutos.

h. Transfírase el líquido sobrenadante del matraz a un tubo estéril de centrifuga de 50 ml, de boca ancha, y centrifuguese a 2.000 rpm (centrífuga I.E.C.<sup>13</sup> de Tamaño 1) durante 10 minutos a fin de separar las partículas de tejido testicular.

i. Pásese el líquido sobrenadante que contiene treponemas a un matraz Erlenmeyer estéril de 50 ml.

j. Prepárese una dilución al 1:10 añadiendo 0,1 ml de suspensión de treponemas a 0,9 ml de medio básico.

k. Colóquense 0,01 ml y 0,005 ml de la dilución al 1:10 en los extremos opuestos de una lámina de 3×1 pulgadas y cúbranse con cubreobjetos de 22×22 mm.

l. Cuéntese al microscopio en seco con gran aumento (aproximadamente 450X) el número de treponemas en un total de 10 campos de la porción de 0,01 ml.

m. Cuéntese el número de treponemas en un total de 10 campos de la porción de 0,005 ml y multiplíquese este número por 2.

n. Súmense los resultados de los pasos l. y m. y divídase por 2. Esta cifra representa el número de treponemas por campo microscópico en seco con gran aumento que se encuentran en 0,01 ml de la suspensión de antígeno.

*Nota: Cuando la concentración de treponemas es inferior a 15 por campo microscópico en seco observado con gran aumento, no se usa el extracto para la reacción de inmovilización del T. pallidum.*

o. Para emplearse en la reacción, la suspensión de antígeno debe ajustarse con medio básico hasta que contenga 15 treponemas por campo microscópico en seco con gran aumento.<sup>14</sup> Esto equivale aproximadamente a 7.500.000 treponemas por mililitro.

p. La concentración de treponemas en la suspensión de antígeno ajustada se verifica colocando 0,01 ml de la suspensión de antígeno ajustada en una lámina y calculando el promedio de treponemas contado en 10 campos microscópicos en seco observados con gran aumento.

<sup>13</sup> International Equipment Company, Boston, Massachusetts.

<sup>14</sup> Para medir la suspensión de treponemas puede usarse una pipeta Propipette.

## **Preparación del complemento**

DURANTE TODO EL PROCEDIMIENTO OBSÉRVENSE PRECAUCIONES DE RIGUROSA ESTERILIDAD.

1. Tomando las precauciones necesarias para mantener la esterilidad, extraíga-se sangre del corazón de seis o más cobayos, para lo cual se emplea agujas de calibre 19. (El alimento que se dé a los animales debe estar exento de antibióticos. Los cobayos comprados deben tenerse durante 30 días, a fin de permitir la eliminación de antibióticos que pudieran haber recibido con su alimento en forma de comprimido.)

2. Sepárese el suero por centrifugación y mézclese.

3. Consérvense cantidades adecuadas en frascos estériles de 15 ml, con tapón de rosca, a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

4. El complemento congelado se convierte al estado líquido dejándolo descongelar en el refrigerador. Mézclese por inversión y vuélvase a colocar en el refrigerador.

## **Preparación de la hemolisina**

1. Prepárese una dilución madre de hemolisina al 1:100 (véase "Reacción de Kolmer", pág. 36).

2. Todo nuevo lote de hemolisina debe comprobarse mediante titulación paralela con la hemolisina anterior de referencia antes de incorporarse al uso corriente.

## **Preparación de la suspensión de glóbulos rojos de carnero**

1. Refrigérese durante 48 horas antes de emplear la sangre de carnero recién extraída.

2. Lávese y concéntrese un volumen adecuado de glóbulos rojos de carnero. (Véase "Reacción de Kolmer", págs. 34-36.)

3. Prepárese una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 5% lavando la sangre en un matraz con 19 volúmenes de solución salina de Kolmer.

4. Compruébese la suspensión al 5% centrifugando 5,0 ml en un tubo de centrifuga graduado de 15 ml. Este volumen de una suspensión debidamente preparada debe contener 0,25 ml de glóbulos sedimentados.

5. Sepárese el líquido sobrenadante de los glóbulos sedimentados y guárdense estos para preparar los estándares de lectura.

## **Preparación de los estándares de lectura**

1. Prepárese una solución isotónica de hemoglobina en la forma siguiente:

a. Utilícense los glóbulos sedimentados que se obtengan después de



centrifugar 5,0 ml de suspensión de glóbulos de carnero al 5 por ciento.

b. Añádase agua destilada hasta llegar a la marca de 9,0 ml.

c. Mézclese bien para obtener una separación completa de los glóbulos.

d. Añádase 1,0 ml de solución salina al **8,5 por ciento**.

e. Inviértase el tubo a fin de mezclar bien el contenido.

2. Prepárese una suspensión de glóbulos de carnero al 2,5% diluyendo 4,0 ml de suspensión de glóbulos de carnero al 5% con 4,0 ml de solución salina de Kolmer.

3. Rotúlese una serie de tubos de ensayo de 15×85 mm de manera que correspondan a los diversos grados de hemólisis.

4. Agréguese solución de hemoglobina, suspensión de glóbulos rojos al 2,5% y solución salina de Kolmer en la forma siguiente:

Porcentaje de hemólisis	Solución de hemoglobina, ml	Suspensión de glóbulos rojos al 2,5%, ml	Solución salina de Kolmer, ml
0	0,0	1,0	2,0
10	0,1	0,9	2,0
20	0,2	0,8	2,0
30	0,3	0,7	2,0
40	0,4	0,6	2,0
50	0,5	0,5	2,0
60	0,6	0,4	2,0
70	0,7	0,3	2,0
80	0,8	0,2	2,0
90	0,9	0,1	2,0

5. Centrifúguense los estándares de lectura para que correspondan a una hemólisis de 60% o menos.

6. Estos estándares de lectura se utilizan para leer las titulaciones de hemolisina y complemento.

7. Los estándares de lectura para las *determinaciones de complemento residual* se preparan en tubos de ensayo de 13×100 mm, *empleando una quinta parte de las cantidades de los reactivos* enumerados anteriormente.

*Para la determinación de los grados de hemólisis, compárese visualmente lo desconocido con los estándares. Si el grado de hemólisis parece ser inferior al 70%, centrifúguese y compárese con los estándares centrifugados.*

### **Ejecución de la titulación de hemolisina**

1. Prepárense diluciones de hemolisina a partir de la hemolisina madre al 1:100 en tubos de ensayo de 15×85 mm en la forma siguiente:

Dilución	Hemolisina (al 1:100), ml	Solución salina de Kolmer, ml
1:500	0,6	2,4
1:1.000	0,3	2,7
1:1.500	0,2	2,8
1:2.000	0,2	3,8
1:4.000	0,1	3,9
1:8.000	0,05	3,95

2. Mézclense perfectamente las diluciones.
3. Mídanse 2,0 ml de cada dilución de hemolisina en tubos de ensayo de 15 × 85 mm debidamente rotulados.
4. Mídanse 2,0 ml de suspensión de glóbulos de carnero al 5% y colóquense en seis tubos de ensayo distintos de 15 × 85 mm.
5. Sensibilícense glóbulos con las diluciones adecuadas de hemolisina vertiendo dilución de hemolisina sobre los glóbulos, pasando luego el contenido de un recipiente a otro y viceversa hasta alcanzar un total de 8 veces.
6. Antes de concluir la titulación de la hemolisina déjense en reposo y a temperatura ambiente las mezclas de glóbulos sensibilizados durante 10 minutos como mínimo y sin exceder de 2 horas.
7. Prepárese una dilución de complemento al 1:500 en la forma siguiente:
  - a. Añádase 0,1 ml de complemento con una pipeta de 0,2 ml a 4,9 ml de solución salina de Kolmer para obtener una dilución de 1:50. Mézclese bien.
  - b. Añádanse 2 ml de la dilución al 1:50 a 18 ml de solución salina de Kolmer. Mézclese bien.
8. Complétese la titulación en la forma siguiente:

Tubo No.	Complemento en dilución al 1:500, ml	Glóbulos de carnero sensibilizados, ml	Dilución de hemolisina utilizada para la sensibilización
1 .....	2,0	1,0	1:500
2 .....	2,0	1,0	1:1.000
3 .....	2,0	1,0	1:1.500
4 .....	2,0	1,0	1:2.000
5 .....	2,0	1,0	1:4.000
6 .....	2,0	1,0	1:8.000

9. Agítase la gradilla con los tubos indicados y colóquese en baño de María a 37°C durante 15 minutos.
10. Retírense los tubos del baño de María y procédase a interpretar el porcentaje de hemólisis comparándolo con los estándares de lectura.

**11.** Selecciónese como dilución óptima de hemolisina la mayor dilución que presente un máximo de hemólisis.

**Ejemplo:**

Dilución de hemolisina probada:	1:	500	1.000	1.500	2.000	4.000	8.000
Grado de hemólisis obtenido:		70%	70%	70%	30%	5%	0

En este ejemplo, la dilución óptima (la que da el máximo de hemólisis) es la de 1:1.500.

**12.** Cerciórese de que no se ha presentado aglutinación de los glóbulos de carnero con la dilución de hemolisina seleccionada como óptima, incubando 1,0 ml de glóbulos sensibilizados con la dilución óptima de hemolisina y 2,0 ml de solución salina de Kolmer en baño de María a 37°C durante 15 minutos. Luego déjese la mezcla en refrigeración durante toda la noche.

**Ejecución de la titulación del complemento**

*Debe practicarse únicamente cuando se emplee un nuevo lote de complemento.*

**1.** Sensibilícense 20,0 ml de suspensión de glóbulos rojos de carnero al 5% con 20,0 ml de hemolisina diluida para dar la hemólisis máxima, vertiendo dilución de hemolisina sobre los glóbulos, y pasando luego el contenido de un recipiente a otro y viceversa hasta llegar a un total de 8 veces. Déjese en reposo a temperatura ambiente durante no menos de 10 minutos ni más de 2 horas.

**2.** Prepárese una dilución de complemento al 1:50 midiendo 0,1 ml de suero de cobayo con una pipeta de 0,2 ml en un tubo de ensayo adecuado. Añádanse 4,9 ml de solución salina de Kolmer. Mézclese perfectamente.

**3.** Establézcase la titulación por duplicado. Rotúlense dos series de tubos de ensayo de 15 × 85 mm con los números 1 a 7 y deposítense en cada serie de tubos numerados los reactivos en este orden: complemento, solución salina y glóbulos sensibilizados.

Tubo No.	Dilución del complemento al 1:50, ml	Solución salina de Kolmer, ml	Glóbulos rojos sensibilizados, ml
1 .....	0,35	1,65	1,0
2 .....	0,30	1,70	1,0
3 .....	0,25	1,75	1,0
4 .....	0,20	1,80	1,0
5 .....	0,15	1,85	1,0
6 .....	0,10	1,90	1,0
7 .....	0,00	2,0	1,0

4. Agítase la gradilla que contiene los tubos indicados y póngase en baño de María a 37°C durante 15 minutos.

5. Retírese la gradilla del baño de María y léanse los porcentajes de hemólisis en cada tubo comparándolos con los estándares de lectura.

6. El complemento es adecuado si se obtiene por lo menos un 50% de hemólisis con 0,25 ml de dilución de complemento al 1:50.

Trácense los porcentajes de hemólisis en papel cuadrículado semilogarítmico, en relación con mililitros de suero total de cobayo, y determínese la cantidad exacta de suero que se requiere para lograr un 50% de hemólisis. Esto representa 5 unidades de complemento, puesto que 1 unidad de complemento se define como la cantidad que se necesita para producir 50% de hemólisis de 0,2 ml de suspensión de glóbulos rojos sensibilizados al 2,5 por ciento. Multiplíquese por 40 la cantidad dada de suero total de cobayo que contiene 200 unidades y se obtendrán mililitros.

### Ejemplo:

Tubo No.	Dilución del complemento al 1:50, ml	Suero total de cobayo, ml	Porcentaje de hemólisis	
1 .....	0,35	0,007	96	96
2 .....	0,30	0,006	92	90
3 .....	0,25	0,005	80	80
4 .....	0,20	0,004	55	55
5 .....	0,15	0,003	23	25
6 .....	0,10	0,002	0	0
7 .....	0	0	0	0

Cuando se hace el trazado en papel cuadrículado semilogarítmico, se calcula que 0,0039 ml de suero de cobayo (entre los tubos 4 y 5) es la cantidad de suero que se necesita para dar un 50% de hemólisis, y representa 5 unidades hemolíticas al 50 por ciento.

$0,0039 \times 40 = 0,156$  ml, cantidad de suero total de cobayo que contiene 200 unidades hemolíticas.

Para la reacción, el complemento se diluye, en caso necesario, en un medio básico que contenga 200 unidades hemolíticas por 0,2 ml, o sea,  $0,2 - 0,156 = 0,044$  ml de medio básico a añadir por cada dosis de prueba.

### Revisión de la titulación del complemento

1. Prepárese una cantidad de 1,0 ml de suero de cobayo, diluido en medio básico en caso necesario, de manera que cada volumen de 0,2 ml contenga 200 unidades de complemento.

2. Prepárese una dilución al 1:50 del complemento ajustado (200 unidades por 0,2 ml) midiendo 0,1 ml con una pipeta de 0,2 ml en un tubo adecuado de ensayo, y añadiendo 4,9 ml de solución salina. Mézclase perfectamente.

3. Repítase la titulación del complemento por duplicado utilizando solamente 0,2, 0,25 y 0,3 ml del complemento diluido y ajustado. El tubo que contenga 0,25 ml de la dilución al 1:50 del complemento ajustado debe dar un 50% de hemólisis.

### Preparación de los sueros control

#### 1. Suero control cuantitativo Reactivo (8,9).

- a. Prepárese una mezcla estéril de suero Reactivo a la inmovilización del *T. pallidum*, de la reactividad que se desee, y consérvese en cantidades de 1,0 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se ha observado que estos sueros se pueden usar satisfactoriamente por períodos hasta de 2 años.
- b. Retírese del congelador 1,0 ml de suero, descongélese, mézclase perfectamente y prepárese una solución madre al 1:10 por dilución con 9,0 ml de solución salina estéril al 0,85 por ciento.
- c. Guárdense soluciones madre estériles en cantidades de 1,0 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- d. Cada semana retírese del congelador un tubo de la solución madre al 1:10 de suero Reactivo. Descongélese, mézclase perfectamente y caliéntese a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.
- e. Prepárense diluciones sucesivas de este suero en solución salina estéril al 0,85%, desde 1:10 hasta 1:320, en volúmenes suficientes para las reacciones de una semana. Estas soluciones pueden utilizarse durante una semana, sin necesidad de calentarlas de nuevo, si se tapan debidamente y se mantienen en el refrigerador.
- f. El título de inmovilización del 50% de este suero control se establece mediante interpolación de las curvas obtenidas en coordenadas semilogarítmicas trazando el porcentaje de inmovilización (eje aritmético) contra la recíproca de la dilución del suero (eje logarítmico). El título medio es la recíproca de la dilución media que dé un 50% de inmovilización.

#### 2. Suero control No Reactivo.

- a. Prepárese una mezcla estéril de un suero No Reactivo a la inmovilización del *T. pallidum*. Guárdese en volúmenes de 0,2 ml en el refrigerador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
  - b. Retírense del refrigerador 0,2 ml de suero todos los días, descongélese, mézclense bien y caliéntense a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.
3. Suero de conejo (véase el paso 2.b., pág. 73).
- a. Sepárese asépticamente el suero del coágulo.
  - b. Caliéntese el suero a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.

### Preparación de los sueros

*Nota: Las muestras contaminadas por bacterias resultan inadecuadas para las reacciones.*

1. Obténganse asépticamente muestras de sangre.<sup>15</sup>

*Los sueros no deben contener un agente conservador.*

2. Extráiganse asépticamente los sueros de coágulos de sangre mediante centrifugación y decantación. No es preciso centrifugar las muestras de suero claras y estériles que se reciban para análisis.

3. Trasládense a un tubo de cristal estéril con corcho parafinado o a un tubo de plástico con tapón y guárdense en el refrigerador. Congélense si se han de almacenar durante más de una semana. Antes de ejecutar la reacción, descongélnse y mézclense perfectamente.

4. Caliéntense los sueros a 56°C durante 30 minutos el mismo día que se vayan a hacer las reacciones. Las muestras que hayan sido calentadas previamente deben ser calentadas de nuevo durante 10 minutos el día de la reacción.

5. Las muestras turbias pueden aclararse haciéndolas pasar por un disco de filtro Millipore en un adaptador Swinney. Las muestras excesivamente turbias no son adecuadas para el análisis.

### **Reacción cualitativa de inmovilización del *Treponema pallidum*-200 (ITP-200)**

*Nota: Tómense precauciones para asegurar la esterilidad durante las operaciones ya que la contaminación bacteriana anula la validez de esta reacción.*

1. Prepárese el complemento para la reacción ITP en la forma siguiente:

a. Retírese el complemento del congelador y descongélese poniéndolo en el refrigerador. Destínense 0,2 ml de complemento para cada tubo, más un ligero excedente. Se necesitará menos complemento si la actividad hemolítica, según fue determinada por titulación, es superior al título mínimo. (Véase "Ejecución de la titulación del complemento", paso 6, pág. 79.)

b. Mézclese bien y divídase el complemento para las reacciones en 2 partes iguales. Rotúlese una parte como ACTIVO y consérvese a 6°-10°C hasta que se utilice. Rotúlese la otra parte como INACTIVO y caliéntese a 56°C durante 30 minutos.

2. Colóquense en gradillas tubos de ensayo estériles de 13×100 mm con tapones de acero inoxidable. Se necesitan 2 tubos para cada muestra.

3. Identifíquese cada par de tubos con el número de la muestra. Rotúlese un tubo con la letra R (de reacción) y el otro con la letra C (de control).

<sup>15</sup> Si se emplean tubos al vacío para obtener muestras de sangre, el tapón de goma debe ser reemplazado inmediatamente por un corcho parafinado antes de enviar la muestra al laboratorio, excepto si se emplean tapones de goma no tóxicos (10). Pueden adquirirse tubos Vacutainer no tóxicos de Becton-Dickinson and Company, Rutherford, Nueva Jersey, No. de Catálogo 3204NT.

**4.** Utilizando pipetas de 0,2 ml, deposítense controles en la forma siguiente:

**a.** Suero control Reactivo.

Deposítense con pipeta 0,05 ml de la dilución al 1:10 en 2 tubos de ensayo que lleven las marcas R-10 y C-10; deposítense con pipeta 0,05 ml de cada una de las otras diluciones en tubos rotulados con R, más el número de la dilución.

**b.** Suero control No Reactivo.

Deposítense con pipeta 0,05 ml de suero control No Reactivo en cada uno de los dos tubos rotulados con las letras R-N y C-N.

**c.** Control de suero de conejo.

Deposítense con pipeta 0,05 ml de suero de conejo en cada uno de los 2 tubos rotulados con R-C y C-C.

**d.** Control de complemento.

Deposítense con pipeta 0,05 ml de solución salina al 0,85% en cada uno de los 2 tubos rotulados con R y C.

**e.** Controles de supervivencia.

Deposítense con pipeta 0,25 ml de solución salina al 0,85% en algunos tubos de ensayo, dejando 2 de esos tubos para cada campana de anaerobiosis utilizada en una serie diaria de reacciones.

**f.** Control de penicilinas (cuando se utilice en la reacción, véase "Nuevo examen de sueros no concluyentes", pág. 85). Deposítense con pipeta 0,01 ml de solución de penicilinas, diluida a 100 unidades por mililitro, y 0,05 ml de solución salina en cada uno de los 2 tubos rotulados con R-P y C-P.

**5.** Deposítense con pipeta hasta el fondo 0,05 ml de cada suero en los tubos R y C, debidamente numerados, utilizando una pipeta de 0,2 ml.

**6.** Añádanse a los tubos designados como controles de supervivencia 0,3 ml de suspensión de antígeno ajustada.

**7.** Prepárese la mezcla de antígeno-complemento.<sup>16</sup>

**a.** La dosis analítica de la suspensión de treponemas ajustada es 0,3 ml. Para calcular el volumen requerido de la suspensión ajustada de antígeno, multiplíquese el número total de tubos de la reacción por 0,3 ml, más un pequeño excedente.

**b.** La dosis analítica de complemento es 0,2 ml de suero de cobayo diluido en medio básico en caso necesario, que contenga 200 unidades de complemento. Las diluciones de complemento ACTIVO e INACTIVO deben prepararse inmediatamente antes de que se utilicen.

**c.** A un volumen de complemento (ACTIVO) añádanse 1,5 volúmenes de suspensión ajustada de antígeno<sup>16</sup> (que contenga 15 treponemas por campo en seco con gran aumento).

<sup>16</sup> Puede utilizarse una pipeta Propipette.

d. A un volumen de complemento (INACTIVO) añádanse 1,5 volúmenes de suspensión ajustada de antígeno <sup>17</sup> (que contenga 15 treponemas por campo en seco con gran aumento).

8. Con una pipeta de 5,0 ml <sup>17</sup> añádanse 0,5 ml de la mezcla de complemento ACTIVO y suspensión de treponemas a todos los tubos rotulados con R.

9. Con una pipeta de 5,0 ml <sup>17</sup> añádanse 0,5 ml de la mezcla de complemento INACTIVO y suspensión de treponemas a todos los tubos rotulados con C.

10. Mézclese el contenido de los tubos agitando las gradillas.

11. Colóquense los tubos en campanas de anaerobiosis. Séllese las campanas con arcilla de modelado, que se pondrá en la unión entre el tapón metálico y el cristal. No se introduzcan en una campana más tubos de los que puedan leerse en 30 minutos.

12. Extrágase el aire de las campanas e introdúzcase una mezcla gaseosa de CO<sub>2</sub> al 5%—N<sub>2</sub> al 95% por un total de 3 veces.

*El vacío en las campanas debe ser suficiente para permitir la desgasificación del líquido en los tubos.*

13. Colóquense las campanas en un incubador de aire a 35°C durante 16–18 horas.

14. Abrase cada campana por separado, extráiganse los tubos y colóquense estos en gradillas de manera que estén juntos la reacción y el control correspondientes a cada muestra.

15. Léase y regístrese la movilidad de los treponemas en la forma siguiente:

a. Pásese 1 gota del contenido de cada par de tubos a los extremos opuestos de una lámina de microscopio de 3 × 1 pulgadas. Márquense las zonas de muestra con las palabras REACCIÓN y CONTROL. Cúbrase con cubreobjetos.

b. Examínense las preparaciones al microscopio de campo oscuro utilizando gran aumento en seco (450X aproximadamente) y cuéntense 25 treponemas. Anótese el número de treponemas móviles.

c. Multiplíquese el número de treponemas móviles por 4 para obtener el porcentaje de movilidad. Por consiguiente, si se encontraran 21 treponemas móviles entre los 25 contados, la movilidad sería de 84% ( $21 \times 4 = 84$ ).

d. Si, en la inspección, se observa que la diferencia de movilidad entre la reacción y el control para una muestra dada resulta en una interpretación de Débilmente Reactiva, se contarán otros 25 treponemas. Si se confirma la reacción débil, se hace otra preparación y, de ser posible, otra persona leerá esta preparación.

16. Selecciónense todos los tubos rotulados con R para aquellas muestras en las cuales la diferencia de movilidad entre la reacción y el control sea

<sup>17</sup> Puede utilizarse una pipeta Propipette.



inferior al 50% y en los que la movilidad del tubo de control sea superior al 70%, y practíquese una reacción para determinar el complemento residual, en la forma siguiente:

- a. Sensibilícense glóbulos de carnero al 5% con un volumen igual de la dilución óptima de hemolisina. (Véase "Ejecución de la titulación de hemolisina", paso 6, pág. 77.)
- b. Añádase a todos los tubos rotulados con R, 0,2 ml de glóbulos sensibilizados.
- c. Agítese la gradilla y colóquese en baño de María a 37°C durante 15 minutos.
- d. Anótense los porcentajes de hemólisis empleando los estándares de lectura. (Véase "Preparación de los estándares de lectura", paso 7, pág. 76.)

**17. Anotación de los resultados de la reacción.**

a. Antes de considerar la anotación de cada una de las muestras es necesario evaluar los controles de la reacción. Deben cumplirse los requisitos siguientes:

1. Se observará por lo menos un 80% de movilidad en los tubos de reacción y de control de todos los controles excepto el suero control Reactivo.
2. El título de inmovilización de 50% del suero control Reactivo debe estar, más o menos, dentro de una dilución al doble del título medio de inmovilización establecido del 50 por ciento.
3. En el control de suero de conejo debe obtenerse un resultado **NO REACTIVO**.

*Nota: Si se observa que la sangre obtenida del conejo que proporciona los treponemas para la reacción es Reactiva a la reacción de inmovilización del T. pallidum, existe la posibilidad de que los treponemas hayan sido parcialmente sensibilizados por anticuerpos mientras estaban dentro del huésped, y en este caso la reacción ITP carece de valor y debe repetirse.*

b. Notifíquense los resultados como **NO REACTIVOS** si:

1. La movilidad en el tubo de control es de 70% o mayor,

y

2. La diferencia de movilidad entre el tubo de reacción y el tubo de control es inferior al 20 por ciento,

y

3. Se observa por lo menos un 25% de hemólisis en el tubo rotulado con R cuando se analiza el complemento residual.

c. Notifíquense los resultados como **REACTIVOS** si:

1. La movilidad del tubo de control es de 70% o mayor,

y

2. La diferencia de movilidad entre el tubo de reacción y el de control es de 50% o más.

d. Notifíquense los resultados como **DEBILMENTE REACTIVOS** si:

1. La movilidad del tubo de control es de 70% o mayor,

y

2. La diferencia de movilidad entre el tubo de reacción y el de control es de 20% o más pero inferior al 50 por ciento,

y

3. Se observa por lo menos un 25% de hemólisis en el tubo rotulado con R cuando se analiza para determinar el complemento residual. *Las muestras en las que se obtengan resultados DEBILMENTE REACTIVOS deben volver a analizarse.*

e. Notifíquense los resultados como **NO CONCLUYENTES** si se observa menos del 70% de movilidad en el tubo de control.

f. Notifíquense los resultados como **ANTICOMPLEMENTARIOS** si se observa menos del 25% de hemólisis en el análisis para determinar el complemento residual.

*Si se observa menos del 70% de movilidad en el tubo de control y más de 70% en el de reacción, debe volver a analizarse la muestra. Si se confirman los resultados, debe notificarse la reacción como NO REACTIVA, siempre que se observe por lo menos un 25% de hemólisis en el análisis para determinar el complemento residual.*

g. Notifíquense las muestras como **INADECUADAS PARA LA REACCION** cuando estén:

1. Contaminadas con bacterias.

2. Demasiado turbias y no puedan aclararse mediante filtración en Millipore.

18. Nuevo examen de sueros no concluyentes.

a. Prepárese una solución de penicilinasas con agua destilada estéril, de modo que contenga 100 unidades por mililitro.

b. Añádanse 0,05 ml de la solución de penicilinasas a 0,25 ml del suero en estudio.

c. Agítense los tubos para mezclar adecuadamente la penicilinasas y el suero.

d. Colóquense los tubos en baño de María a 37°C durante 1 hora.

e. Deposítense con pipeta 0,06 ml de la mezcla suero-penicilinasas en cada uno de los tubos rotulados R y C con el número del suero.

f. Termínense la reacción, la lectura y la anotación en la forma descrita en "Reacción cualitativa de inmovilización del *Treponema pallidum*-200 (ITP-200)", paso 8, pág. 83, hasta el paso 17, pág. 84.

## Referencias

- (1) NELSON, R. A., JR., y MAYER, MANFRED, M.: "Immobilization of *Treponema pallidum* in Vitro by Antibody Produced in Syphilitic Infection". *J Exp Med* 89: 369-393, 1949.
- (2) HARRIS, A.; BOSSAK, H. N., y OLANSKY, S.: "Laboratory Aspects of the *Treponema pallidum* Immobilization (TPI) Test". *Public Health Lab* 13: 63-66, 1955.
- (3) Secretaría de Salud, Educación y Bienestar de los Estados Unidos de América: *Serology Evaluation and Research Assembly (SERA Study)*, 1956-1957. Publicación No. 650 del Servicio de Salud Pública. Washington, D. C.: U.S. Government Printing Office, 1959.
- (4) Organización Panamericana de la Salud: *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis* (Revisión de 1959). Publicación Científica 47. Washington, D.C., 1960.
- (5) Agencia de Seguridad Federal, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland: *Culture Media for the Sterility Test*. Circular de los Institutos Nacionales de Salud, segunda revisión, 5 de febrero de 1946.
- (6) PORTNOY, J.; HARRIS, A., y OLANSKY, S.: "Studies of the *Treponema pallidum* Immobilization (TPI) Test. I. The Effect of Increased Sodium Thioglycollate and Complement". *Am J Syph Gonorr and Vener Dis* 37: 101-105, 1953.
- (7) AJELLO, G.; PORTNOY, J.; LOGAN, L., y OLANSKY, S.: "Studies of the *Treponema pallidum* Immobilization (TPI) Test. IV. A Simplified Method of Preparing the Modified Basal Medium". *Am J Syph Gonorr and Vener Dis* 38: 288-294, 1954.
- (8) HARRIS, A.; PORTNOY, J.; FALCONE, V. H., y OLANSKY, S.: "Studies of the *Treponema pallidum* Immobilization (TPI) Test. II. Evaluation of quantitative control serums". *Am J Syph Gonorr and Vener Dis* 37: 106-111, 1953.
- (9) HARRIS, A., y BROWN, W. J.: "Control Serum for the TPI Test". *Public Health Rep* 77: 34-38, 1962.
- (10) BOSSAK, H. N.; HARRIS, A., y OLANSKY, S.: "Studies of the *Treponema pallidum* Immobilization (TPI) Test. V. The Effect of Blood-Collecting Tubes". *Public Health Lab* 12: 153-157, 1954.

---

# REACCION DE REAGINA EN SUERO NO CALENTADO (RSNC) (1) (2)

---

*Antes de ejecutar esta reacción, el técnico debe estar bien enterado del contenido de los capítulos Información general y Equipo general.*

**Nota:** Para emplear la reacción RSNC como prueba de selección, se recomienda el análisis de todas las muestras que presenten algún grado de aglutinación, por ligera que esta sea, a fin de examinarlas mediante otros procedimientos serológicos.

## Equipo

1. Centrífuga,<sup>1</sup> de cabezal angular, Servall SS-1, Tipo "XL", u otro modelo equivalente, con tacómetro.
2. Tubos <sup>1</sup> sin reborde de acero inoxidable, con capacidad para 50 ml.
3. Gasa de algodón.
4. Máquina rotatoria, adaptable a 180 rpm, que describa un círculo de  $\frac{3}{4}$  de pulgada de diámetro en un plano horizontal.
5. Dispositivo para hacer anillos de parafina de 14 mm de diámetro, aproximadamente.
6. Soporte para láminas de microscopio de 2 x 3 pulgadas.
7. Agujas hipodérmicas de calibre 18, sin bisel.

## Cristalería

1. Láminas,<sup>2</sup> de 2 x 3 pulgadas, con anillos de parafina de 14 mm de diámetro, aproximadamente.
2. Jeringa de 1 ó 2 ml, tipo Luer.
3. Frascos redondos de boca angosta y tapón de vidrio, con capacidad de 30 ml.

## Reactivos

1. Antígeno VDRL.
2. Solución salina amortiguada VDRL.

---

<sup>1</sup> Ivan Sorvall Company, Nueva York, N.Y.

<sup>2</sup> También se pueden usar láminas de vidrio con anillos de cerámica para la reacción RSNC, si se siguen las precauciones siguientes. Los anillos deben ser suficientemente altos para impedir el derrame cuando las láminas giran a las velocidades indicadas. Deben limpiarse las láminas cada vez que se usen, de modo que el suero pueda extenderse por la superficie interior de los anillos de cerámica. Este tipo de lámina debe desecharse tan pronto como el anillo comience a desportillarse, pues en los sueros de prueba, esas partículas pueden tomarse por grumos de partículas de antígeno y ocasionar así un resultado Reactivo falso.

3. Solución de fosfato (0,02M) y mertiolato <sup>3</sup> (al 0,2 por ciento).  
Disuélvase 1,42 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,36 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1 g de mertiolato en agua destilada hasta obtener un volumen final de 500 ml. El pH de esta solución debe ser 6,9. Guárdese en la oscuridad a temperatura ambiente. Puede usarse por un período de tres meses.

4. Solución de cloruro de colina (al 40 por ciento).

a. Disuélvase 40 g de cloruro de colina en agua destilada hasta obtener un volumen final de 100 ml.

b. Filtrese y consérvese a temperatura ambiente. Puede utilizarse durante un año. Vuélvase a filtrar si se forman partículas visibles.

5. EDTA (0,1M).

Disuélvase 3,72 g de ácido tetraacético (etilenodinitrilo), y sal disódica, hasta obtener un volumen de 100 ml en agua destilada. Puede utilizarse durante un año.

6. Solución de resuspensión.

Para preparar 10 ml de solución de resuspensión combínense estos ingredientes:

EDTA (0,1M) .....	1,25 ml
Cloruro de colina (al 40%) .....	2,5 ml
Fosfato (0,02M) y mertiolato (al 0,2%) .....	5,0 ml
Agua destilada .....	1,25 ml

*Esta solución se prepara cada vez que se hagan suspensiones de antígeno.*

7. Sueros control.

Véase "Preparación y empleo de los sueros control", pág. 10. Los sueros control refrigerados deben dejarse a temperatura ambiente durante 30 minutos por lo menos antes de usarse, y se estudian sin calentarlos.

## Preparación de los sueros

1. Centrifúguense muestras de sangre a temperatura ambiente a una velocidad suficiente para separar el suero de los elementos celulares. En general son suficientes de 1.500 a 2.000 rpm durante 4 minutos.

2. Déjese el suero en el tubo de obtención original.

*Nota: Las muestras se analizan sin calentar. Las muestras que se hayan refrigerado deben tenerse a temperatura ambiente durante 30 minutos por lo menos antes de la prueba.*

## Preparación de la suspensión de antígeno

1. Prepárese la suspensión de antígeno como para las reacciones VDRL en lámina (véase pág. 93).

2. Centrifúguense cantidades medidas de suspensión de antígeno en tubos de acero inoxidable en una centrifuga de cabezal angular, a tempera-

<sup>3</sup> Ely Lilly and Company, Indianapolis, Indiana.

tura ambiente y con una FCR de 2.000 G, aproximadamente, durante 15 minutos. En un solo tubo de centrifuga pueden centrifugarse de 5 a 30 ml.

3. Localícese y decántese el líquido sobrenadante invirtiendo el tubo por el lado opuesto al que contiene el sedimento. Mientras se sostiene el tubo en posición invertida, límpiase su pared con gasa de algodón sin tocar el sedimento.

4. Vuélvase a suspender con un volumen de solución de resuspensión igual a la cantidad de la suspensión de antígeno que se centrifugó. Soplando con la pipeta deposítase directamente sobre el sedimento la solución de resuspensión. Agítase manualmente el tubo de centrifuga para volver a suspender todo el sedimento.

5. Si se utiliza más de un tubo de centrifuga, mézclense todas las suspensiones en un frasco con tapón de cierre hermético. Así queda terminada la preparación de la suspensión de antígeno.

6. Verifíquese la reactividad de la suspensión de antígeno practicando la reacción RSNC con sueros control de títulos conocidos de reactividad.

7. La suspensión de antígeno debe guardarse en el refrigerador. Para el consumo diario retírese del frasco de reserva suspensión de antígeno suficiente para las necesidades del día y devuélvase el frasco de reserva al refrigerador. La suspensión de antígeno debe mantenerse a temperatura ambiente por no menos de 30 minutos antes de utilizarse.

8. La suspensión de antígeno conservada en la forma descrita proporciona resultados satisfactorios durante 6 meses por lo menos (2). Sin embargo, si en algún momento no se obtienen los resultados esperados con los sueros control estandarizados, no debe utilizarse la suspensión de antígeno.

### **Verificación de la exactitud de las agujas para depósito de la suspensión**

1. Es de primordial importancia utilizar las cantidades adecuadas de reactivos, y por esta razón deben examinarse diariamente las agujas que se empleen. Mediante la práctica se logrará un depósito rápido de la suspensión de antígeno, pero debe tenerse cuidado de obtener gotas de tamaño uniforme.

2. Para la reacción RSNC se administra la suspensión de antígeno con una jeringa a la que va unida una aguja despuntada de calibre 18, que rendirá  $45 \text{ gotas} \pm 1 \text{ gota}$  de suspensión de antígeno por mililitro cuando se verifica con una jeringa de 1 ó 2 ml sostenida en posición vertical.

3. Las agujas que no satisfagan las especificaciones indicadas deben ser ajustadas antes de usarse, a fin de que rindan los volúmenes correctos.

## Prueba preliminar de la suspensión de antígeno

1. La suspensión de antígeno debe examinarse primero con sueros control de reactividad conocida empleando el método descrito en "Reacción de reagina con suero no calentado (RSNC), con suero".

2. Sólo se emplearán las suspensiones de antígeno que hayan producido las reacciones indicadas con sueros control. Si en los análisis de suero No Reactivo las partículas de antígeno son demasiado grandes, es posible que haya algún defecto en la manera de preparar la suspensión de antígeno, aunque este inconveniente también puede deberse a otros factores.

3. No debe utilizarse una suspensión de antígeno que no sea satisfactoria.

## Reacción de reagina con suero no calentado (RSNC), con suero

1. Deposítense con pipeta en un anillo de una lámina de vidrio con bordes parafinados 0,05 ml de suero sin calentar procedente del tubo de obtención original.

2. Agréguese a cada suero una gota ( $\frac{1}{45}$  ml) de suspensión de antígeno.

3. Hágase girar la lámina en una máquina rotatoria durante 4 minutos a 180 rpm.

4. Inmediatamente después de la rotación léanse las reacciones en un microscopio con un aumento de 100X.

5. Infórmese como a continuación se indica:

<i>Lectura</i>	<i>Resultado</i>
Grumos medianos y grandes.....	Reactivo (R)
Grumos pequeños .....	Débilmente Reactivo (D)
Sin grumos o con muy ligera floculación....	No Reactivo (N)

## Referencias

(1) PORTNOY, J., y GARSON, W.: "New and Improved Antigen Suspension for Rapid Reagin Tests for Syphilis". *Public Health Rep* 75: 985-988, 1960.

(2) ———; BOSSAK, H. N.; FALCONE, V. H., y HARRIS, A.: "Rapid Reagin Test with Unheated Serum and New Improved Antigen Suspension". *Public Health Rep* 76: 933-935, 1961.

---

# REACCIONES VDRL EN LAMINA CON SUERO Y LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (1) (2) (3) (4)

---

*Antes de ejecutar estas reacciones, el técnico debe estar bien enterado del contenido de los capítulos Información general y Equipo general.*

## Equipo

1. Máquina rotatoria, adaptable a 180 rpm, que describa un círculo de  $\frac{3}{4}$  de pulgada de diámetro en 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, sin bisel.
  - a. Para reacciones con sueros: calibre 18, 19 y 23.
  - b. Para reacciones con líquido cefalorraquídeo: calibre 21 ó 22.

## Cristalería

1. Láminas, de 2 x 3 pulgadas, con 12 anillos de parafina o cerámica <sup>1</sup> de 14 mm de diámetro, aproximadamente, para las reacciones con suero.
2. Láminas <sup>2</sup> para aglutinación, de  $2\frac{1}{4}$  x 3 pulgadas, con 12 concavidades, cada una de 16 mm de diámetro y 1,75 mm de profundidad, para la reacción con líquido cefalorraquídeo.
3. Jeringa, tipo Luer, de 1 ó 2 ml.
4. Frascos <sup>3</sup> redondos, de boca angosta y tapón de vidrio, con capacidad para 30 ml.

*Nota: Algunos de los frascos de 30 ml con tapón de vidrio actualmente en el mercado no son adecuados para preparar un solo volumen de suspensión de antígeno para estas reacciones, debido a que el fondo está combado hacia adentro, lo cual da lugar a que los 0,4 ml de solución salina se distribuyan únicamente en la periferia. Puede obtenerse una suspensión satisfactoria cuando se preparan cantidades dobles de suspensión de antígeno, si los 0,8*

<sup>1</sup> Para la reacción VDRL en lámina pueden usarse láminas de vidrio con anillos de cerámica si se adoptan las siguientes precauciones: Los anillos deben ser suficientemente altos para impedir el derrame cuando las láminas giran a las velocidades indicadas. Deben limpiarse las láminas cada vez que se usen, de modo que el suero pueda extenderse por la superficie interior de los anillos de cerámica. Este tipo de lámina debe desecharse tan pronto como el anillo comience a desportillarse, pues en los sueros de prueba esas partículas pueden tomarse por grupos de partículas de antígeno y ocasionar así un resultado Reactivo falso.

<sup>2</sup> Will Corporation, Rochester, Nueva York. No. de Catálogo 7, "Agglutination slide"; No. 19391, "Concavity slide".

<sup>3</sup> Corning Glass Works, Corning, Nueva York, No. de Catálogo LG-1, MW-90530.



*ml de solución salina cubren la superficie del fondo de esta clase de frascos. Los frascos redondos, de un diámetro de 35 mm, aproximadamente, con la superficie interior del fondo plana o cóncava, son adecuados para preparar volúmenes simples de suspensión de antígeno.*

## Reactivos

### 1. Antígeno VDRL.

a. El antígeno para esta reacción es una solución alcohólica que contiene cardiolipina al 0,03%, colesterol al 0,9% y suficiente lecitina purificada para producir una reactividad estándar. En los últimos años esta cantidad de lecitina ha sido de  $0,21 \pm 0,01$  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 pardo con tapón de rosca (recubierto con lámina de vinilita), o en ampollitas de vidrio selladas herméticamente, y se debe guardar a temperatura ambiente.

d. Los componentes de este antígeno permanecen en solución a temperaturas normales, de modo que cualquier precipitado que se observe indica que hay alteraciones debidas a factores tales como la evaporación o la introducción de materiales aditivos con las pipetas. Deben desecharse los antígenos que contengan precipitados.

### 2. Solución salina amortiguada VDRL, con cloruro de sodio al 1%, de pH $6,0 \pm 0,1$ :

Formaldehído neutro, de calidad analítica.....	0,5 ml
Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$ ) .....	0,093 g
Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) .....	0,170 g
Cloruro de sodio (A.C.S.*) .....	10,0 g
Agua destilada .....	1.000,0 ml

Compruébese el pH de la solución y guárdese en frascos con tapón de rosca o vidrio.

### 3. Ácido benzoico en solución alcohólica al 1,0 por ciento.

Disuélvase 1,0 g de ácido benzoico de grado analítico en 100 ml de alcohol etílico absoluto. Consérvese en un recipiente totalmente de vidrio, herméticamente sellado, y en refrigerador, a una temperatura de  $6^\circ$  a  $10^\circ\text{C}$ . Puede utilizarse mientras la solución permanezca clara.

### 4. Solución salina al 0,9 por ciento.

Añádanse 900 mg de cloruro de sodio desecado (A.C.S.\*) a cada 100 ml de agua destilada.

### 5. Solución salina al 10 por ciento.

Añádanse 10 g de cloruro de sodio desecado (A.C.S.\*) a cada 100 ml de agua destilada.

\* A.C.S.: American Chemical Society: Sociedad de Química de los E.U.A.

## **Preparación de la suspensión de antígeno**

*La temperatura de la solución salina amortiguada y del antígeno debe estar entre 23° y 29°C (73° y 85°F) en el momento de preparar la solución de antígeno.*

1. Deposítense con pipeta 0,4 ml de solución salina amortiguada en el fondo de un frasco redondo de 30 ml con tapón de vidrio.

2. Añádanse 0,5 ml de antígeno (de la mitad inferior de una pipeta de 1,0 ml graduada hasta la punta) directamente sobre la solución salina mientras se hace girar el frasco suave pero continuamente sobre una superficie plana.

*Nota: El antígeno se añade gota a gota, pero rápidamente, de modo que se permitan 6 segundos, aproximadamente, para cada 0,5 ml de antígeno. La punta de la pipeta debe quedar en el tercio superior del frasco y la rotación no debe ser tan vigorosa que se salpique la pipeta con la solución salina. Se obtendrá la velocidad de rotación adecuada cuando el centro del frasco describa un círculo de 2 pulgadas de diámetro, aproximadamente, 3 veces por segundo.*

3. Soplese la última gota de antígeno de la pipeta sin que esta toque la solución salina.

4. Prosígase la rotación del frasco durante 10 segundos.

5. Con una pipeta de 5 ml, añádanse 4,1 ml de solución salina amortiguada.

6. Tátese el frasco y agítese de abajo hacia arriba y viceversa, aproximadamente 30 veces en 10 segundos.

7. La suspensión de antígeno está lista y puede ser utilizada durante un día.

8. Puede prepararse el doble de esta cantidad de suspensión de antígeno de una sola vez, empleando cantidades dobles de antígeno y de solución salina. En tal caso, debe emplearse una pipeta de 10 ml para depositar el volumen de 8,2 ml de solución salina. Si se necesitan cantidades mayores de suspensión de antígeno, debe prepararse más de una mezcla. Estas suspensiones pueden luego probarse y mezclarse.

9. Mézclase suavemente la suspensión de antígeno cada vez que se use. La suspensión no debe mezclarse haciéndola pasar a la fuerza de un lado a otro de la jeringa y la aguja, puesto que eso podría ocasionar la ruptura de partículas y pérdidas de reactividad.

## **Preparación de la suspensión estabilizada de antígeno**

Si se desea, la suspensión de antígeno VDRL que ha de emplearse en todas las reacciones VDRL puede estabilizarse agregándole ácido benzoico. Cuando se utiliza esta suspensión estabilizada no es necesario preparar suspensiones frescas cada día que se practiquen las reacciones.

1. Inmediatamente después de preparada la suspensión de antígeno VDRL, añádanse 0,05 ml de ácido benzoico al 1,0% a cada volumen sencillo (5,0 ml) ó 0,1 ml a cada volumen doble (10,0 ml). Agítese suavemente de abajo hacia arriba durante 10 segundos. *Deposítese la solución de ácido benzoico con una pipeta con capacidad de 0,1 ml o de 0,2 ml, graduada en centésimos.*

2. Pruébese cada suspensión estabilizada comparándola con sueros control y mézclense todas las de reactividad estándar. Mézclese agitando suavemente el frasco.

3. Guárdese la suspensión madre estabilizada en un frasco de reserva cerrado herméticamente en el refrigerador a una temperatura de 6° a 10°C.

4. Cuando se vaya a emplear la suspensión, retírese el frasco de reserva del refrigerador, agítese suavemente para mezclar y extraíga-se una cantidad suficiente para las reacciones de un día. Vuélvase inmediatamente el frasco de reserva al refrigerador para evitar su calentamiento.

5. Déjese a temperatura ambiente por lo menos durante 30 minutos antes de emplear la suspensión de antígeno necesaria para las reacciones del día. Verifíquese diariamente su reactividad estándar con sueros control antes de analizar los sueros en estudio.

6. Utilícese todos los días una nueva suspensión de antígeno tomada del refrigerador.

7. La suspensión madre estabilizada conservada como reserva en el refrigerador, puede utilizarse mientras mantenga un nivel estándar de reactividad conforme lo determinen las pruebas con los sueros control.

### **Verificación de la exactitud de las agujas para depósito de la suspensión**

1. Es de primordial importancia emplear las cantidades adecuadas de reactivos; por esta razón, deben examinarse diariamente las agujas que se empleen. Mediante la práctica se logra el depósito rápido de la suspensión de antígeno, pero debe tenerse cuidado de obtener gotas de tamaño uniforme.

2. Para la reacción cualitativa en lámina con suero, la suspensión de antígeno se administra con una jeringa a la que va unida una aguja despuntada de calibre 18, que rendirá 60 gotas  $\pm$  2 gotas de suspensión de antígeno por mililitro cuando se verifica con una jeringa de 1 ó 2 ml sostenida en posición vertical.

3. Para la reacción cuantitativa en lámina con suero, la suspensión de antígeno se reparte con una jeringa a la que va unida una aguja despuntada de calibre 19, que rendirá 75 gotas  $\pm$  2 gotas de suspensión de antígeno por mililitro al sostener verticalmente la jeringa y la aguja.

4. Para la reacción cuantitativa en lámina con suero, se reparte suspensión salina al 0,9% de una jeringa a la que va unida una aguja de calibre

23 (con punta o sin ella), que rendirá 100 gotas  $\pm$  2 gotas de solución salina por mililitro al sostener verticalmente la jeringa y la aguja.<sup>4</sup>

5. Para las reacciones cualitativa y cuantitativa en lámina con líquido cefalorraquídeo, se reparte suspensión de antígeno sensibilizada de una jeringa a la que va unida una aguja despuntada de calibre 21 ó 22, la que rendirá 100 gotas  $\pm$  2 gotas de suspensión de antígeno sensibilizada por mililitro al sostener verticalmente la jeringa y la aguja.

6. Las agujas que no satisfagan las especificaciones indicadas deben ser ajustadas antes de usarse, a fin de que rindan los volúmenes correctos.

### **Prueba preliminar de la suspensión de antígeno**

1. Pruébense sueros control de títulos conocidos de reactividad (véase "Preparación y empleo de los sueros control", pág. 10) como se describe en la "Reacción cualitativa VDRL en lámina con suero".

2. Las reacciones con los sueros control deben reproducir la pauta de reactividad. Para que un suero sea No Reactivo, debe presentar completa dispersión de partículas de antígeno y el número óptimo de partículas por campo microscópico.

3. No debe utilizarse una suspensión de antígeno que no sea adecuada.

## **REACCIONES VDRL EN LAMINA CON SUERO**

*Nota: Para esta reacción no se recomiendan láminas de vidrio con concavidades o anillos de cristal.*

### **Preparación del suero**

1. El suero claro, obtenido de sangre coagulada, centrifugada, se calienta a 56°C en baño de María durante 30 minutos antes de analizarlo.

2. Se examinan todos los sueros al retirarlos del baño de María, y los que contengan restos visibles de partículas deberán volver a centrifugarse.

3. Los sueros que se analicen después de 4 horas del primer período de calentamiento, deben volver a calentarse a 56°C durante 10 minutos.

### **Reacción cualitativa VDRL en lámina con suero**

*Nota: Durante un período de análisis siempre se incluyen sueros control de títulos conocidos de reactividad (Reactivo, Débilmente Reactivo y No Reactivo), a fin de asegurar la reactividad adecuada de la suspensión de antígeno en el momento de practicar las reacciones.*

1. En un anillo de parafina o cerámica de la lámina de vidrio, deposítense con pipeta 0,05 ml de suero calentado.

<sup>4</sup>La solución salina puede repartirse de una aguja de calibre 19 (0,02 ml por gota) y de una aguja de calibre 15 (0,03 ml por gota).

2. Añádase 1 gota (1/60 de ml) de suspensión de antígeno sobre cada suero, con una aguja de calibre 18.

3. Háganse girar las láminas durante 4 minutos. (Pónganse a 180 rpm las máquinas de rotación que describan un círculo de  $\frac{3}{4}$  de pulgada de diámetro. Con la rotación a mano debe describirse un círculo de 2 pulgadas de diámetro a razón de 120 veces por minuto.)

*Nota: Cuando las reacciones se ejecuten en un clima cálido y seco, las láminas pueden cubrirse con la tapa de una caja provista de un papel secante húmedo a fin de impedir un exceso de evaporación durante la rotación.*

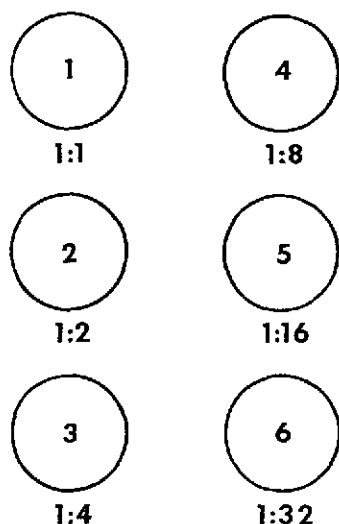
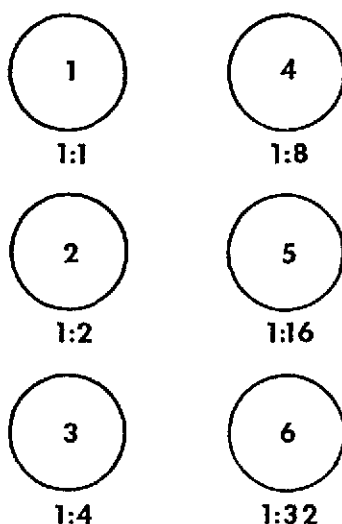
4. Inmediatamente después de la rotación léase la reacción al microscopio con objetivo débil, con un aumento de 100X, y anótense los resultados en la forma siguiente:

<b>Lectura</b>	<b>Resultado</b>
Grumos medianos y grandes.....	Reactivo (R)
Grumos pequeños .....	Débilmente Reactivo (D)
Sin grumos o con muy ligera floculación.....	No Reactivo (N)

5. *Las reacciones zonales*, que resultan de un exceso de componente Reactivo del suero, se reconocen por la presencia de floculación irregular y de grumos débilmente unidos. El resultado Reactivo se caracteriza habitualmente por grumos grandes o pequeños pero de tamaño bastante uniforme. La experiencia permitirá diferenciar entre este tipo de reacciones y el aspecto zonal, en el que grumos grandes y/o pequeños, pueden estar entremezclados con partículas libres de antígeno. Una reacción zonal se registra 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. *En consecuencia, se recomienda que todos los sueros que produzcan resultados Débilmente Reactivos en la reacción cualitativa vuelvan a analizarse, empleando el procedimiento cuantitativo, antes de someter un informe sobre la reacción VDRL en lámina.* Cuando se obtiene un resultado Reactivo con alguna dilución de suero que sólo produjo un resultado Débilmente Reactivo con suero no diluido, se anotará como Reactivo. (Véase "Reacción cuantitativa VDRL en lámina con suero".) Son raros los casos en que la única indicación de una reacción zonal es un resultado "aproximado" No Reactivo en la reacción cualitativa. Por esta razón, muchos laboratorios adoptan la práctica de muestras cuantitativas de este tipo.

### **Reacción cuantitativa VDRL en lámina con suero**

Todos los sueros que produzcan resultados Reactivos o Débilmente Reactivos en la reacción cualitativa VDRL en lámina, deben analizarse de nuevo cuantitativamente hasta un título en dilución final. Las diluciones de suero que deben analizarse inicialmente son: sin diluir (1:1), 1:2, 1:4,

**Suero No. 1****Suero No. 2**

**Figura 1—Diagrama de lámina para la reacción cuantitativa.**

1:8, 1:16 y 1:32. Las dos reacciones cuantitativas del suero pueden ejecutarse en una sola lámina.

1. Colóquense sueros para análisis cuantitativo en la hilera delantera de una gradilla con un tubo que contenga 0,7 ml de solución salina al 0,9%, directamente detrás de cada suero.

2. Prepárese una dilución al 1:8 de cada suero agregando 0,1 ml del suero a 0,7 ml de la solución salina al 0,9%, para lo cual se utiliza una pipeta de 0,2 ml graduada en 0,01 ml.

3. Mézclase perfectamente y déjese la pipeta en el tubo de dilución hasta que todas las diluciones estén preparadas.

4. Con esta pipeta, pásense 0,04 ml, 0,02 ml y 0,01 ml de las diluciones de suero al 1:8 a los anillos parafinados cuarto, quinto y sexto, respectivamente (véase fig. 1).

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

6. Añádanse 2 gotas (0,01 ml en cada gota) de solución salina al 0,9% a los anillos segundo y quinto de cada suero, con una aguja de calibre 23.<sup>5</sup>

7. Añádanse 3 gotas de suspensión salina al 0,9% (en la misma forma) del mismo tamaño a los anillos tercero y sexto de cada suero.<sup>5</sup>

8. Háganse girar las láminas suavemente con la mano durante 15 segundos para que el suero se mezcle con la solución salina.

<sup>5</sup> La solución salina puede descargarse de una aguja de calibre 19 (0,02 ml por gota) y de una aguja de calibre 15 (0,03 ml por gota).

9. Agréguese una gota (1/75 ml) de suspensión de antígeno a cada anillo con una aguja de calibre 19.

*Nota: La cantidad de suspensión de antígeno utilizada en este método se ha reducido a 1/75 de ml con objeto de que corresponda al volumen reducido de suero de 0,04 ml.*

10. Termínense las reacciones en la forma descrita en "Reacción cualitativa VDRL en lámina con suero", e inmediatamente después de la rotación léanse los resultados al microscopio.

11. Anótense los resultados en términos de la mayor dilución de suero que produzca un resultado Reactivo (no Débilmente Reactivo), conforme a los ejemplos siguientes:

Suero no diluido	Diluciones de suero						Resultado
1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32		
R	D	N	N	N	N		Reactivo, solamente sin diluir, o 1dil.
R	R	D	N	N	N		Reactivo, en dilución al 1:2, o 2 dils.
R	R	R	D	N	N		Reactivo, en dilución al 1:4, o 4 dils.
D	D	R	R	D	N		Reactivo, en dilución al 1:8, u 8 dils.
N	D	R	R	R	N		Reactivo, en dilución al 1:16, o 16 dils.
(aproximado)							

12. Si todas las diluciones de suero analizadas producen resultados Reactivos, prepárese una dilución de ese suero al 1:64 en solución salina. Para ello agréguese 0,1 ml de la dilución del suero al 1:8, a 0,7 ml de solución salina, mézclese y practíquese la reacción con esta dilución al 1:64 en tres cantidades como se hizo para la dilución de suero al 1:8. Esto equivaldrá a diluciones de 1:64, 1:28 y 1:256.

## REACCIONES VDRL EN LAMINA CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

### Sueros control

1. Aunque esta reacción se ejecuta con líquidos cefalorraquídeos, es más conveniente preparar controles de suero diluido en solución salina al 0,9 por ciento. Para la prueba de ensayo deben seleccionarse diluciones de suero que produzcan resultados Reactivos, Mínimamente Reactivos y No Reactivos en la reacción VDRL en lámina con líquido cefalorraquídeo (de preferencia una dilución al 1:80 o más alta).

2. En tubos debidamente rotulados y cerrados herméticamente con corchos parafinados, distribúyanse cantidades de sueros Reactivos y No Reactivos suficientes para un período de prueba. Guárdense en el congelador.

3. Para el consumo diario retírese del congelador una serie de sueros

Reactivos y No Reactivos, descongélnse y mézclense perfectamente; préparense las correspondientes diluciones en solución salina al 0,9 por ciento. Los controles se analizan sin calentarlos previamente en la reacción en lámina.

### **Preparación del líquido cefalorraquídeo**

Centrifúguese y decántese cada líquido cefalorraquídeo. El líquido cefalorraquídeo se analiza *sin calentarlo previamente*. Las muestras que a la simple vista se ven contaminadas o que contienen sangre no son adecuadas para la reacción.

### **Preparación de la "Suspensión de antígeno sensibilizada"**

1. Prepárese la suspensión de antígeno como se describe para las reacciones VDRL en lámina (véase "Preparación de la suspensión de antígeno", pág. 93).

2. Añádase 1 parte de solución salina al 10% a 1 parte de suspensión para la reacción VDRL en lámina.

3. Mézclese bien por rotación o inversión del tubo y déjese en reposo durante 5 minutos por lo menos, pero no más de 2 horas, antes de utilizarse.

### **Reacción cualitativa VDRL en lámina con líquido cefalorraquídeo**

1. En cada una de tres concavidades de una lámina de aglutinación, deposítense con pipeta 0,05 ml de suero control diluido para producir resultados Reactivos (R), Mínimamente Reactivos ( $R_m$ ) y No Reactivos (N).

2. En una concavidad de la lámina deposítense con pipeta 0,05 ml de líquido cefalorraquídeo.

3. Añádase una gota (0,01 ml) de suspensión de antígeno sensibilizada a cada líquido de control y cefalorraquídeo con una aguja de calibre 21 ó 22.

4. Háganse girar las láminas durante 8 minutos en una máquina rotatoria a 180 rpm.

*Nota: Cuando las reacciones se practican en un clima cálido y seco, las láminas pueden cubrirse con la tapa de una caja que esté provista de un papel secante húmedo, a fin de impedir exceso de evaporación durante la rotación.*

5. Inmediatamente después de la rotación, léanse las reacciones al microscopio con un aumento de 100X y anótense los resultados en la forma siguiente:

<b>Lectura</b>	<b>Resultado</b>
Visible aglutinación .....	Reactivo (R)
Sin aglutinación o con muy ligera floculación...	No Reactivo (N)



## Reacción cuantitativa VDRL en lámina con líquido cefalorraquídeo

Se practican reacciones cuantitativas con todos los líquidos cefalorraquídeos que resulten Reactivos en la reacción cualitativa.

1. Prepárense diluciones de líquido cefalorraquídeo en la forma siguiente:

- a. Deposítense con pipeta 0,2 ml de solución salina al 0,9% en cada uno de 5 o más tubos.
- b. Añádanse 0,2 ml de líquido cefalorraquídeo sin calentar al tubo 1, mézclese perfectamente y pásense 0,2 ml al tubo 2.
- c. Continúese mezclando y pasando 0,2 ml de un tubo al siguiente hasta llegar al último tubo. Las diluciones respectivas son: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc.

2. Analícese cada dilución de líquido cefalorraquídeo y cada líquido cefalorraquídeo no diluido, en la forma descrita en "Reacción cualitativa VDRL en lámina con líquido cefalorraquídeo".

3. Anótense los resultados en términos de la dilución más alta de líquido cefalorraquídeo que presente un resultado Reactivo.

### Referencias

(1) HARRIS, A.; ROSENBERG, A. A., y RIEDEL, L. M.: "A Microflocculation Test for Syphilis Using Cardiolipin Antigen. Preliminary report". *J Vener Dis Inform* 27: 169-174, 1946.

(2) ———; ———, y DEL VECCHIO, E. R.: "The VDRL Slide Flocculation Test for Syphilis. II. A Supplementary Report". *J Vener Dis Inform* 29: 72-75, 1948.

(3) DUNCAN, W. P.; BOSSAK, H. N., y HARRIS, A.: "VDRL Slide Spinal Fluid Test". *Amer J Clin Path* 35: 93-95, 1961.

(4) BOSSAK, H. N. y DUNCAN, W. P.: "Method of Stabilizing Antigen Emulsion Used in VDRL Syphilis Tests". *Public Health Rep* 73: 836-838, 1958.

---

# REACCIONES VDRL EN TUBO CON SUERO Y LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (1) (2) (3)

---

## Equipo

1. Agitador mecánico Kahn (275 a 285 oscilaciones por minuto).
2. Centrífuga I.E.C.,<sup>1</sup> Tamaño 1 ó 2, con cabezal horizontal y tacómetro.
3. Lámpara de lectura, fluorescente o de articulación universal, con luz diurna azulada.

## Cristalería

1. Tubos de ensayo, de 12×75 mm en sus dimensiones exteriores, para la reacción con suero.
2. Tubos de ensayo, de 13×100 mm en sus dimensiones exteriores, para la reacción con líquido cefalorraquídeo.
3. Frascos redondos de boca angosta<sup>2</sup> y tapón de vidrio, con capacidad para 30 ml.

## Reactivos

1. Antígeno VDRL.
  2. Solución salina amortiguada VDRL.
  3. Solución salina al 0,9 por ciento.
- Agréguense 900 mg de cloruro de sodio desecado (A.C.S.\*) a cada 100 ml de agua destilada.
4. Solución salina al 1% para la reacción con suero.
- Agréguense 1 g de cloruro de sodio desecado (A.C.S.\*) a cada 100 ml de agua destilada.
5. Solución salina al 10% para la reacción con líquido cefalorraquídeo.
- Agréguense 10 g de cloruro de sodio desecado (A.C.S.\*) a cada 100 ml de agua destilada.

---

<sup>1</sup> International Equipment Company, Boston, Massachusetts.

<sup>2</sup> Corning Glass Works, Corning, Nueva York, No. del Catálogo LG-1, MW-90530.

\* A.C.S.: American Chemical Society: Sociedad de Química de los E.U.A.

# REACCIONES VDRL EN TUBO CON SUERO

## Preparación del suero

1. Calientese suero claro obtenido de sangre centrifugada y coagulada en baño de María a 56°C durante 30 minutos antes de analizarse.
2. Examínense todos los sueros al retirarlos del baño de María y vuélvanse a centrifugar los que contengan restos visibles de partículas.
3. Los sueros que se analicen después de más de 4 horas de haber sido calentados, volverán a calentarse a 56°C durante 10 minutos.

*Nota: Los sueros turbios o hemolizados pueden ser causa de que las reacciones terminadas presenten un aspecto demasiado turbio para la lectura macroscópica y, por consiguiente, son muestras inadecuadas para este análisis.*

## Preparación de la "Suspensión de antígeno diluida"

1. Prepárese una suspensión de antígeno como la que se ha descrito para la reacción VDRL en lámina (véase pág. 93).
2. Añádanse 4 partes de la solución salina al 1% a 1 parte de la suspensión para la reacción VDRL en lámina. Mézclese bien y déjese reposar la mezcla 5 minutos, pero no más de 2 horas, antes de utilizarla. Esta suspensión se denominará "suspensión de antígeno diluida". Vuelva a suspenderse la suspensión de antígeno diluida antes de utilizarla.

## Reacción cualitativa VDRL en tubo con suero

*Nota: Durante un período de análisis siempre se incluyen sueros control de títulos conocidos de reactividad (véase "Preparación y empleo de los sueros control", pág. 10), a fin de asegurar la reactividad adecuada de la suspensión de antígeno en el momento de practicar las reacciones.*

1. Depósitense con pipeta 0,5 ml de sueros calentados y sueros control en tubos de ensayo de 12 × 75 mm.
2. Añádanse 0,5 ml de suspensión de antígeno diluida a cada suero y control.
3. Agítense los tubos en el aparato Kahn durante 5 minutos.
4. Centrifúguense todos los tubos durante 10 minutos a una fuerza equivalente a 2.000 rpm en una centrífuga I.E.C., Tamaño 1, o a 1.700 rpm en la de Tamaño 2, con cabezal horizontal.
5. Llévense nuevamente los tubos al agitador Kahn y agítense exactamente durante 1 minuto.
6. Tan pronto como haya terminado el segundo período de agitación, léanse los resultados sosteniendo los tubos cerca de la pantalla de una

lámpara de lectura, frente a un fondo negro y a la altura de los ojos aproximadamente.

*Nota: Durante la lectura, cada tubo puede mantenerse inmóvil o agitarse suavemente. Debe evitarse la agitación excesiva.*

**7. Interpretense los resultados en la forma siguiente:**

Reactivo (R) ..... Conglomerados visibles en un medio claro o ligeramente turbio.

Todas las reacciones dudosas en las que el observador no esté seguro respecto a la visibilidad de los grumos, deben registrarse como No Reactivas.

No Reactivo (N) ..... No hay conglomerados, sino completa dispersión de partículas, y el aspecto es turbio o ligeramente granuloso. Agitando suavemente se forma un franco remolino sedoso.

Las *reacciones zonales*, debidas a un exceso de componente Reactivo del suero, pueden aparecer sumamente débiles o, en casos raros, No Reactivas. Siempre que se sospeche una reacción zonal o atípica, debe practicarse otro análisis del suero empleando la reacción cuantitativa, antes de presentar un informe de la reacción VDRL en tubo.

### **Reacción cuantitativa VDRL en tubo con suero**

Todos los sueros que produzcan resultados Reactivos en la reacción cualitativa VDRL en tubo, deben volver a analizarse cuantitativamente hasta alcanzar un título en dilución final.

**1. Prepárense diluciones de suero en la forma siguiente:**

a. Deposítense con pipeta 0,5 ml de solución salina al 0,9% en cada uno de 5 o más tubos de ensayo, excepto en el primero.

b. Añádanse 0,5 ml de suero a los tubos 1 y 2.

c. Mézclese el tubo 2 y pásese 0,5 ml al tubo 3.

d. Continúese mezclando y pasando 0,5 ml de cada tubo al siguiente hasta que el último tubo contenga 1,0 ml. Mézclese y deséchense 0,5 ml. Las respectivas diluciones son: sin diluir, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc.

**2. Siempre que se practiquen reacciones cuantitativas en tubo se incluyen sueros control de títulos conocidos de reactividad.**

**3. Añádanse a cada tubo 0,5 ml de suspensión de antígeno diluida y terminense los análisis en la forma descrita para la "Reacción cualitativa VDRL en tubo con suero", pág. 102.**

**4. Anótense los resultados en términos de la máxima dilución de suero**

que produzca un resultado Reactivo, de conformidad con los siguientes ejemplos:

Suero no diluido	Diluciones de suero				Resultado
1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	
R	N	N	N	N	Reactivo, solamente sin diluir, o 1 dil.
R	R	R	N	N	Reactivo, en dilución al 1:4, o 4 dils.
R	R	R	R	N	Reactivo, en dilución al 1:8, u 8 dils.

## REACCIONES VDRL EN TUBO CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

### Preparación del líquido cefalorraquídeo

1. Centrifúguese y decántese cada líquido cefalorraquídeo. Las muestras que a la simple vista se ven contaminadas o que contienen sangre no son adecuadas para la reacción.

2. Calientese el líquido cefalorraquídeo a 56°C durante 15 minutos. Déjese enfriar a temperatura ambiente antes de analizarlo.

### Preparación de la "Suspensión de antígeno sensibilizada"

1. Prepárese la suspensión de antígeno en la forma descrita para las reacciones VDRL en lámina (véase pág. 93).

2. Añádase 1 parte de la solución salina al 10% a 1 parte de la suspensión para la reacción VDRL en lámina.

3. Mézclese bien y déjese reposar durante 5 minutos por lo menos, pero no más de 2 horas, antes de utilizarse.

### Reacción cualitativa VDRL en tubo con líquido cefalorraquídeo

*Nota: Durante un período de análisis siempre se incluyen controles calentados de títulos conocidos de reactividad (véase "Sueros control" en "Reacciones VDRL en lámina con líquido cefalorraquídeo", pág. 98) a fin de asegurar la reactividad adecuada de la suspensión de antígeno en el momento de practicar las reacciones.*

1. Deposítese con pipeta en tubos de ensayo de 13 x 100 mm, 1,0 ml de líquido cefalorraquídeo calentado y de controles.

2. Agréguese a cada líquido cefalorraquídeo y a los controles 0,2 ml de suspensión de antígeno sensibilizada. Vuélvase a suspender la suspensión de antígeno sensibilizada, inmediatamente antes de usarla, invirtiendo el frasco varias veces.

3. Agítense las gradillas con los tubos en el agitador mecánico Kahn durante 15 minutos.

4. Centrifúguense todos los tubos durante 5 minutos a una velocidad equivalente a 1.800 rpm en una centrífuga I.E.C., Tamaño 1, o a 1.600 rpm en una de Tamaño 2, con cabezal horizontal.

5. Vuélvanse a llevar los tubos al aparato Kahn y agítense durante 2 minutos exactamente.

6. *Tan pronto como sea posible después del segundo período de agitación, léanse los resultados sosteniendo los tubos cerca de la pantalla de una lámpara de escritorio y contra un fondo negro.*

*Nota: Cada tubo puede sostenerse inmóvil o agitarse suavemente durante la lectura. Debe evitarse la agitación excesiva.*

7. Anótese los resultados de la manera siguiente:

Reactivo (R) . . . . . Conglomerados visibles en un medio claro o ligeramente turbio. Deben registrarse como No Reactivas todas las reacciones dudosas en las que el observador no esté seguro respecto a la visibilidad de los grumos.

No Reactivo (N) . . . . . No hay conglomerados, sino completa dispersión de partículas, y el aspecto es turbio o ligeramente granuloso. Cuando se agita suavemente se forma un franco remolino sedoso.

### **Reacción cuantitativa VDRL en tubo con líquido cefalorraquídeo**

Todos los líquidos cefalorraquídeos que produzcan resultados Reactivos en la reacción cualitativa deben someterse a análisis cuantitativos.

1. Prepárense diluciones de líquido cefalorraquídeo en la forma siguiente:

a. Deposítese con pipeta 1 ml de solución salina al 0,9% en cada uno de cinco o más tubos, excepto en el primero.

b. Añádase 1,0 ml de líquido cefalorraquídeo calentado a los tubos 1 y 2. Mézclese el tubo 2 y pásese 1,0 ml al tubo 3.

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 respectivas diluciones son: sin diluir, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc.

2. Siempre que se practiquen pruebas cuantitativas con tubo se incluyen controles calentados de títulos conocidos de reactividad.

3. Añádase 0,2 ml de suspensión de antígeno sensibilizada a cada tubo y termínese la reacción en la forma descrita en "Reacción cualitativa VDRL en tubo con líquido cefalorraquídeo", pág. 104.

4. Anótese los resultados en términos de la máxima dilución de líquido

cefalorraquídeo que produzca resultado Reactivo, de conformidad con los siguientes ejemplos:

Líquido cefalo- rraquídeo no diluido	Diluciones de líquido cefalorraquídeo					Resultado
1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
R	N	N	N	N	N	Reactivo, solamente sin diluir, o 1 dil.
R	R	R	R	N	N	Reactivo, en dilución al 1:8, u 8 dils.
R	R	R	R	R	N	Reactivo, en dilución al 1:16, o 16 dils.

### Referencias

- (1) HARRIS, A.; ROSENBERG, A. A., y DEL VECCHIO, E. R.: "A Macroflocculation Test for Syphilis Using Cardiolipin-Lecithin Antigen". *J Vener Dis Inform* 29: 313-316, 1948.
- (2) ROSENBERG, A. A.; HARRIS, A., y HARDING, V. L.: "A Macroflocculation Spinal Fluid Test Employing Cardiolipin-Lecithin Antigen". *J Vener Dis Inform* 29: 359-361, 1948.
- (3) BOSSAK, H. N., y DUNCAN, W. P.: "Method of Stabilizing Antigen Emulsion Used in VDRL Syphilis Tests". *Public Health Rep* 73: 836-838, 1958.

---

## Apéndice

# OTRAS REACCIONES SEROLOGICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA SIFILIS

---

*Hay varias reacciones, no descritas en esta publicación, que servirán de ayuda adecuada para el diagnóstico. Estas se enumeran a continuación con referencias bibliográficas.*

### Reacción de Davies-Hinton con líquido cefalorraquídeo

(1) Organización Panamericana de la Salud: *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis* (Revisión de 1959). Publicación Científica 47. Washington, D. C., 1960.

### Reacciones estándares de Kahn con suero y líquido cefalorraquídeo Reacción de Kahn con cardiolipina y suero

(1) Kahn, R. L.: *Serology with Lipid Antigen with Special Reference to Kahn and Universal Reactions*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins Co., 1950.

(2) Organización Panamericana de la Salud: *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis* (Revisión de 1959). Publicación Científica 47. Washington, D. C., 1960.

### Reacciones de Kline con líquido cefalorraquídeo

(1) Kline, B. S. y Suessenguth, H.: "Standard Kline Test of Cerebrospinal Fluid for Syphilis". *Amer J Clin Path* 19: 274-277, marzo de 1949.

(2) Organización Panamericana de la Salud: *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis* (Revisión de 1959). Publicación Científica 47. Washington, D. C., 1960.

### Reacciones de Mazzini con líquido cefalorraquídeo

(1) Mazzini, L. Y.: "Mazzini Cardiolipin Microflocculation Test for Syphilis". *J Immun* 66: 261-275, febrero de 1951.

(2) Organización Panamericana de la Salud: *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis* (Revisión de 1959). Publicación Científica 47. Washington, D. C., 1960.

### Reacción rápida de reagina en plasma (RRP) con plasma

(1) Portnoy, J.; Garson, W., y Smith, C. A.: "Rapid Plasma Reagin Test for Syphilis". *Public Health Rep* 72: 761-766, septiembre de 1957.

(2) Organización Panamericana de la Salud: *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis* (Revisión de 1959). Publicación Científica 47. Washington, D. C., 1960.



**Reacción de fijación del complemento con *Treponema pallidum* 50(fetp 50) con suero**

(1) Portnoy, J.: "Complement-Fixation with Small Volume of Reagents". *Amer J Clin Path* 31: 316-322, 1959.

(2) Organización Panamericana de la Salud: *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis* (Revisión de 1959). Publicación Científica 47. Washington, D. C., 1960.

**Reacción VDRL en lámina (Método cuantitativo A) con suero**

(1) Organización Panamericana de la Salud: *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis* (Revisión de 1959). Publicación Científica 47. Washington, D. C., 1960.

*Se enumeran a continuación nuevas reacciones que requieren más estudio y evaluación:*

**Reacción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (ATF-ABS)—  
Procedimiento de absorción con suero**

(1) Hunter, E. F.; Deacon, W. E., y Meyer, P. E.: "An Improved FTA Test for Syphilis. The Absorption Procedure (FTA-ABS)". *Public Health Rep* 79: 410-412, mayo de 1964.

**Reacción rápida de reagina en plasma (RRP), en tarjeta, con plasma**

(1) Portnoy, J.; Brewer, J. H., y Harris, A.: "Rapid Plasma Reagin Card Test for Syphilis and Other Treponematoses". *Public Health Rep* 77: 645-652, agosto de 1962.

(2) Secretaría de Salud, Educación y Bienestar de los E.U.A.: *Laboratory Procedures for Modern Syphilis Serology*. Publicación No. 988 del Servicio de Salud Pública. Washington, D. C.: U.S. Government Printing Office, 1962.

**Reacción rápida de reagina en plasma (RRP) (círculo), en tarjeta,  
con suero**

(1) Portnoy, J.: "Modifications of the RPR Card Test for Syphilis for Use in Large Scale Testing". *Amer J Clin Path* 40: 473-479, noviembre de 1963.

LIBRARY  
PAN AMERICAN SANITARY BUREAU  
WASHINGTON 2, D. C.