MANUAL DE REACCIONES SEROLOGICAS PARA DIAGNOSTICAR LA SIFILIS

PUBLICADO POR
LA
OFICINA SANITARIA
PANAMERICANA

OFICINA REGIONAL DE LA
ORGANIZACION MUNDIAL
DE LA SALUD

PUBLICACION Nº 249

MANUAL DE

REACCIONES SEROLOGICAS

PARA DIAGNOSTICAR LA

SIFILIS

PUBLICADO POR LA
OFICINA SANITARIA PANAMERICANA
Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud .

1501 NEW HAMSPHIRE AVENUE
WASHINGTON 8, D. C., E. U. A.

[1952]

Publicación No. 249

ORGANIZACION SANITARIA PANAMERICANA *

Países Miembros

Argentina	Costa Rica	El Salvador	México	Perú
Bolivia	Cuba	Estados Unidos	Nicaragua	República Dominicana
Brasil	Chile	Guatemala	Panamá	Uruguay
Colombia	Ecuador	Haití	Paraguay	Venezuela
		Honduras		

CONFERENCIA SANITARIA PANAMERICANA
(Reunión Cuadrienal con Delegaciones de Cada País)

CONSEJO DIRECTIVO
Reunión Anual con un Representante de cada País)

COMITE EJECUTIVO

Chile: Dr. Nacianceno Romero
Ecuador: Dr. Egberto García S.
El Salvador: Dr. Juan Allwood Paredes.
Estados Unidos: Dr. H. Van Zile Hyde
México: Dr. Gustavo Argil
Perú: Dr. Jorge Estrella Ruiz
República Dominicana: Dr. Luis F. Thomén.

OFICINA SANITARIA PANAMERICANA
Dr. Fred L. Soper
Director

Dr. M. G. Candau
Subdirector

Dr. Miguel E. Bustamante
Secretario General

Miembros de Honor

Dr. Carlos E. Paz Soldán (Perú)
Dr. Manuel Martínez Báez (México)
Dr. João de Barros Barreto (Brasil)
Dr. Edmundo Fernández (Venezuela)

OFICINA CENTRAL

Oficina Sanitaria Panamericana
1501 New Hampshire Ave., N. W
Washington 6, D. C.

OFICINAS DE ZONA

Oficina Sanitaria Panamericana
Zona III, Apartado 383
Guatemala, Guatemala

Repartição Sanitaria Panamericana
Zona V, Caixa Postal 159
Río de Janeiro, Brasil

Oficina Sanitaria Panamericana
Zona IV, Avenida Salaverry 722
Lima, Perú.

Oficina Sanitaria Panamericana
Zona VI, Charcas 684
Buenos Aires, Argentina.

OFICINAS DE CAMPO

Oficina Sanitaria Panamericana
314, U. S. Court House
El Paso, Texas, Estados Unidos.

Pan American Sanitary Bureau
Constant Spring P. O.
St. Andrew, Jamaica, B. W. I.

---

* *La Constitución de la Organización Sanitaria Panamericana fué aprobada por el Consejo Directivo el 1º de octubre de 1947 en Buenos Aires.*

[1952]

PREFACIO

La Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, se complace en presentar este "MANUAL DE REACCIONES SEROLOGICAS PARA DIAGNOSTICAR LA SIFILIS" a los trabajadores de la Salud Pública de los Países Americanos, como una contribución al desarrollo de sus programas de estandarización de técnicas serológicas en este Hemisferio.

La traducción e impresión de este Manual, así como los programas de adiestramiento en serología y de estandarización serológica que están en desarrollo en esta fecha en América Central y América del Sur, forman parte de la cooperación técnica que la Oficina proporciona a los Gobiernos de América Latina.

El Laboratorio de Investigaciones de las Enfermedades Venéreas del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de Norteamérica, con la colaboración de los autores de las técnicas, reunió los datos necesarios para la elaboración de este Manual el cual fué publicado en inglés por la División de Enfermedades Venéreas del Servicio citado, el año de 1949 como el Suplemento Nº 22 de la Revista de Información sobre Enfermedades Venéreas.

Esta Oficina hace patente su agradecimiento a la División de Enfermedades Venéreas del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de Norteamérica por su amable autorización para que este Manual fuera traducido e impreso en castellano.

Impreso en México, Editorial Luz, S. A.

CONTENIDO

Página

INFORMES GENERALES

Una técnica de análisis está formada por equipo, reactivos, volúmenes, período de tiempo y orden de procedimiento. Cada uno de estos factores puede ser de igual importancia y ninguno de ellos puede ser descuidado con impunidad. Los técnicos que hacen cambios arbitrarios en técnicas recomendadas deben asumir la plena responsabilidad de los resultados del análisis.

Aun cuando las reacciones serológicas para investigar sífilis no son absolutamente específicas y algunos sueros y líquidos cefalorraquídeos tienen la capacidad de reaccionar positivamente en una reacción y negativamente en otra, el análisis de los resultados serológicos discordantes en términos de diagnóstico y pronóstico no pueden ser hechos por técnicos. Estas decisiones se hallan dentro de la jurisdicción del médico. Sin embargo, los resultados válidos de los análisis serológicos son obtenidos cuando: (1) se usan reactivos y controles adecuados estandarizados, (2) se siguen estrictamente las recomendaciones técnicas y, (3) los resultados son reportados en la forma especificada para cada procedimiento.

Cada técnico deberá analizar cada nuevo lote de reactivo en comparación con uno que haya usado y que tenga reactividad aceptable antes que el nuevo lote de reactivo sea puesto en uso rutinario. Se recomienda este procedimiento sin tener en cuenta la fuente de la que el nuevo reactivo haya sido obtenido. Otros factores que deben ser considerados en el control de los análisis serológicos son discutidos en los siguientes párrafos.

Antígenos

La estandarización de un antígeno es lograda cuando el antígeno produce reacciones en análisis cualitativo y cuantitativo con suero y líquido cefalorraquídeo, idénticas a las obtenidas con un antígeno estandarizado. Los antígenos preparados de diferentes lotes de polvo de corazón de res pueden tener reactividades diferentes aun cuando se empleen los mismos procedimientos de extracción, en tal forma que en ocasiones es necesario un ajuste. Los métodos que pueden ser usados para el ajuste final de antígenos están contenidos en la descripción de las técnicas para cada análisis. La cardiolipina y lecitina purificada a que nos referimos en este texto son productos que han sido aislados y purificados por métodos ya publicados (1, 2) y que satisfacen las pruebas químicas y serológicas estándar prescritas.

Fijación del Complemento.

Los antígenos pueden ser más o menos reactivos que un antígeno estándar para un procedimiento dado y pueden poseer una capacidad indeseable para fijar la fracción complemento del suero del cobayo a baja temperatura.

La selección de la dilución a la cual un antígeno tiene reactividad máxima puede no ser un medio adecuado de estandarización, ya que todos los antígenos usados a sus diluciones óptimas pueden no ser igualmente reactivas para el procedimiento de análisis designados. La aceptación final de un antígeno debe estar basada en pruebas comparativas con un antígeno estándar.

La facultad de los antígenos para fijar el complemento del suero del cobayo a baja temperatura es verificada por el análisis previo de los sueros-complemento en la formacón descrita en las técnicas de fijación del complemento. Cuando 2 o más antígenos son usados simultáneamente para el análisis previo de los sueros de cobayos, un mayor número de combinaciones complemento-antígeno no satisfactorias puede ser producido por un antígeno que por otro. Los antígenos que son mínimamente reactivos en esta forma no específica deben ser los preferidos. Los antígenos cardiolipina-lecitina parecen estar exentos de la fracción responsable de esta fijación "no específica" del complemento. El análisis previo de suero de cobayos y el uso de clara de huevo pueden ser omitidos cuando este tipo de antígeno es empleado. Aún cuando los antígenos de cardiolipina-lecitina estén preparados de acuerdo con fórmulas calculadas, deberán ser comparados en la forma recomendada para los antígenos de extracto de corazón de res.

Floculación

Los antígenos de extracto de corazón de res que no puedan ser ajustados a un reactivo estándar por los medios descritos en la técnica del análisis, deberán ser desechados. Deberán entonces prepararse extractos de otros lotes de polvo de corazón de res.

El ajuste de los antígenos de cardiolipina-lecitina para estandarizar niveles de reactividad pueden ser logrados usualmente por una ligera alteración del contenido de lecitina.

Glóbulos de Carnero (Glóbulos rojos)

Los glóbulos de carnero pueden ser demasiado resistentes o demasiado susceptibles a la acción hemolítica del complemento y de la hemolisina. Como el nivel de reactividad de un análisis de fijación del com-

plemento es influído por la calidad de los glóbulos de carnero empleados, deberá darse atención particular a los glóbulos usados. Los efectos de la contaminación bacteriana sobre la reactividad de los glóbulos de carnero son imprevisibles y sólo la sangre de carnero recolectada asépticamente en recipientes estériles es recomendada para ser usada en los análisis de fijación del complemento. Los glóbulos rojos de algunos carneros tendrán resistencia excepcional a la acción hemolítica del complemento y hemolisina. Cuando se obtiene la sangre de un carnero no examinado deberán hacerse titulaciones comparativas del complemento y amboceptor empleando glóbulos de otro carnero de calidad aceptable.

Los glóbulos de carnero son demasiado frágiles para ser usados cuando una suspensión salina de glóbulos lavados, preparada en la forma descrita en una técnica de análisis, muestra cualquier grado de hemólisis cuando es guardada por una noche a 6° u 8° C.

La única solución recomendada en cualquiera de estos casos es la de desechar los glóbulos no satisfactorios y obtener una nueva cantidad de sangre de carnero.

Complemento

La sangre del cobayo puede poseer las siguientes propiedades indeseables: (1) menor actividad complementaria que la prescrita como mínima, (2) mayor actividad complementaria que la prescrita como máxima, (3) la fracción complemento fijada parcial o completamente por otras porciones del suero en combinación con el antígeno usado.

Los títulos bajos de complemento pueden ser causados por la alimentación o la habitación inadecuada de los cobayos o, más frecuentemente, por pérdida de reactividad durante el período de almacenamiento del suero de conejillo de indias. El suero-complemento almacenado en forma líquida (con preservativo añadido) a temperatura de refrigerador o en forma congelada deberá ser protegido en forma adecuada de la desecación parcial, resultante de la evaporación. Las partes alícuotas suficientes para un día de uso, deberán ser puestas en recipientes aparte para evitar la destrucción del complemento debido a los ascensos repetidos a la temperatura ambiente.

Algunos técnicos se engañan al restituir, al suero-complemento deshidratado, hasta la mitad o las dos terceras partes de su volumen original y omitir el factor de concentración del suero, cuando calculan la dilución del complemento. El suero sub-estándar puede hacerse aparecer adecuadamente reactivo en esta forma. Esta práctica usada para eludir las restricciones técnicas no debe ser permitida.

Los sueros individuales de algunos cobayos poseen un título más alto de complemento que el óptimo para algunas técnicas. La mezcla de sueros de varios cobayos evitará generalmente este defecto.

Algunos sueros de cobayo poseen la propiedad de fijar en forma inespecífica su fracción complemento en presencia de antígeno a baja temperatura. El análisis previo del complemento en la forma descrita en cada técnica permitirá la selección de una combinación adecuada de antígeno complemento. Sin embargo, un complemento satisfactorio para su uso con un antígeno, puede no reaccionar en forma aceptable con otro. La combinación antígeno-suero de cobayo usada para el análisis previo dedeberá ser la usada para la prueba final.

Hemolisina (glóbulos de carnero)

El lote de hemolisina de glóbulos rojos de carnero, glicerinada (al 50%), puede ser almacenado a la temperatura del refrigerador durante largos períodos de tiempo con pequeña pérdida de reactividad. Un abatimiento más rápido del título será notado en las soluciones diluídas de hemolisina. Cuando haya una caída notable en el título o si se ve un precipitado en la hemolisina diluída, este reactivo deberá ser desechado y preparado de nuevo del lote de hemolisina.

Una caída súbita del título de la hemolisina puede también ser causada por el complemento, los glóbulos de carnero o las soluciones salinas usadas; deberán hacerse análisis comparativos para determinar cual es el reactivo culpable.

Agua Destilada

El agua destilada de mala calidad puede resultar por falta de limpieza, del destilador o de la botella que recibe el agua, con la frecuencia necesaria. La clase de agua corriente usada y el número de horas por día que trabaja el destilador determinarán la frecuencia de la limpieza. Cuando una botella o un tanque está conectado al destilador de agua también se deberá cuidar la limpieza de la conexión.

El agua destilada absorberá iones de gases alcalinos o ácidos presentes en el laboratorio y puede en esta forma volverse no satisfactoria para su uso en los análisis serológicos. Por esta razón se aconseja frecuentemente el uso de agua recientemente destilada.

Las soluciones salinas y el agua destilada, cuando son almacenadas, deberán ser colocadas en recipientes de vidrio duro herméticamente tapados para evitar cambios debidos al paso de iones del vidrio o absorción del aire.

Equipo

Las temperaturas de los baños de María deberán ser revisadas cada vez que sean usados durante el día. Las temperaturas del refrigerador deberán ser revisadas diariamente con un termómetro colocado en la parte del refrigerador ocupada por las gradillas. Deberá anotarse nuevamente la temperatura cuando el refrigerador es abierto por primera vez en la mañana si se han guardado análisis de fijación de complemento (fijación de 16 a 18 horas). La velocidad de agitación y los aparatos deberán ser revisados por el técnico cada vez que son usados y no deberán aceptarse variaciones notables de las velocidades prescritas.

Las centrífugas deberán ser equipadas con tacómetros de modo que la velocidad pueda ser revisada y controlada. El interior de las centrífugas deberá ser limpiado de vez en cuando para evitar que caigan partículas de polvo dentro de las muestras.

Los aparatos de pipeteo automático deberán ser revisados diariamente por lo que se refiere al volumen correcto de rendimiento. En caso de que un nuevo ajuste sea necesario se deberán recoger y medir en un cilindro graduado certificado, los volúmenes de 25 o de 50 pipeteos.

Cristalería

Sólo deberá usarse en el laboratorio serológico cristalería lavada químicamente. Los tubos y las pipetas en que las soluciones de proteína no han sido eliminadas por completo, se irán tiñendo de un color café.

Esta coloración puede ser eliminada generalmente por inmersión en solución de bicromato-ácido sulfúrico.

Cuando se usan para el lavado soluciones alcalinas o ácidos, deberá enjuagarse en forma adecuada para eliminar cualquier huella de las soluciones del lavado. La prueba diaria de muestras de los artículos de cristal con papel o con soluciones indicadoras protegerá al laboratorio serológico contra el uso de cristalería contaminada químicamente.

Los tubos, las láminas, o las pipetas, que se rayen o desportillen a un grado que interfiera la lectura de los resultados deberán ser desechados o substituídos.

Bibliografía

1. Pangborn, M. C.: The composition of cardiolipin J. Biol. Chem., 168: 351-361, Apr. 1947.
2. Pangborn, M. C.: A note on the purification of lecithin. J. Biol. Chem., 137: 545-548, Feb. 1941.

EQUIPO GENERAL

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

Equipo

1. Centrífuga con tacómetro.
2. Papel filtro de 32 mm. a 250 mm.
3. Bomba filtro para conexión de agua.
4. Relojes de alarma a intervalos.
5. Microscopio.
6. Lámpara de microscopio.
7. Gradillas de madera o de alambre para los tubos con los especímenes.
8. Refrigerador de 6° a 10° C.
9. Reloj Cronógrafo.
10. Termómetros adecuados para los baños de María y el refrigerador.
11. Baños de María 37° C. y 56° C.

Cristalería

1. Frascos con tapón de vidrio, Pyrex, con capacidad de 100 c.c. a 1 litro.
2. Cilindros graduados con capacidad de 50 c.c. a 1 litro.
3. Frascos de Erlenmeyer con capacidad de 25 c.c. a 2 litros.
4. Embudos con diámetros de 65 mm. a 200 mm.
5. Pipetas serológicas graduadas hasta la punta:
   - 0.1 c.c. graduados en 1/100 c.c.
   - 0.2 c.c. graduados en 1/100 c.c.
   - 1.0 c.c. graduados en 1/100 de c.c.
   - 5.0 c.c. graduados en 1/10 de c.c.
   - 10.0 c.c. graduados en 1/10 de c.c.
6. Tubos para especímenes de tamaños adecuados para recolección de sangre y de líquido cefalorraquídeo.

REACCIONES DE EAGLE

REACCIONES DE FLOCULACION DE EAGLE CON SUERO O CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

Equipo y Cristalería

Equipo General

1. Agitador mecánico de Kahn (de 275 a 285 oscilaciones por minuto con amplitud de 1-½").
2. Anillador de parafina.

Cristalería

1. Frascos de 15 c.c. con tapón de rosca cubierto con papel de estaño o vinylite.
2. Láminas de vidrio de 2 x 3".

Reactivos

1. Antígenos para floculación de Eagle. (Véa "Preparación del Antígeno", página 12).
2. Solución salina.

   a) Solución de Cloruro de sodio al 0.85%: pese 850 miligramos de cloruro de sodio seco (A.C.S.) y añada hasta 100 c.c. de agua destilada. La sal puede ser pesada y guardada en tubos tapados con tapón de corcho para evitar pesarla diariamente. La solución salina deberá prepararse diariamente en la forma requerida.

   b) Solución de cloruro de sodio al 4%: pese 4 grms. de cloruro de sodio seco y añada hasta 100 c.c. de agua destilada. El cloruro de sodio puede ser pesado previamente y guardado en la forma antes descrita.

Preparación de Sueros

1. Separe los sueros de los coágulos por centrifugación y pipeteo o decantación.

2. Caliente los sueros en baño de María a 56° C. durante 20 a 30 minutos o de 60° a 62° C. durante 3 minutos .

3. Vuelva a centrifugar cualquier muestra en la que se hayan formado partículas visibles durante el calentamiento.

Preparación de Líquidos Cefalorraquídeos

1. Centrifugue y decante todos los líquidos cefalorraquídeos para separar restos celulares y particulados. (Los líquidos grandemente contaminados o sanguinolentos no son satisfactorios para el análisis.)

2. Los líquidos cefalorraquídeos son examinados sin calentamiento previo.

Reacciones Cualitativas con Suero o con Líquido Cefalorraquídeo

1. Prepare la suspensión primaria de antígeno en la siguiente forma:

   a) Pipetée un volumen (1, 2 ó 3 c.c.) de antígeno de floculación de Eagle en un frasco de 15 c.c.

   b) Sople 2 volúmenes (2, 4 ó 6 c.c. respectivamente) de solución de cloruro de sodio al 85% en el frasco que contiene el antígeno con una pipeta que tenga la salida suficientemente amplia para hacer la mezcla de antígeno y de solución salina en forma rápida y completa.

   c) Tape el frasco que contiene la suspensión de antígeno y colóquelo en el refrigerador.

   d) Madure la suspensión primaria de antígeno en el refrigerador durante 24 horas. La suspensión es utilizable por un período de 5 días durante los cuales debe ser guardada en el refrigerador.

2. Coloque tubos de ensayo (100 x 13 mm. de diámetro exterior) en gradillas adecuadas de modo que haya un tubo por cada suero y líquido cefalorraquídeo que vayan a ser analizados y para los controles de suero positivo, suero negativo y solución salina. Numere los tubos para que correspondan a los números de identificación de los sueros y líquidos cefalorraquídeos.

3. Pipetée 0.4 c.c. ([1]) de cada suero calentado, sueros controles y solución salina, en el número correspondiente de tubos.

4. Pipetée 1 c.c. de cada líquido cefalorraquídeo en los tubos correspondientemente numerados.

---

(1) Pueden usarse 0.2 a 0.1 c.c. de suero calentado en tubos de ensayo más pequeños (de 7 a 8 mm. de diámetro interior) con cantidades proporcionalmente menores de suspensión secundaria de antígeno.

5. Prepare la suspensión secundaria de antígeno inmediatamente antes de usarla, en la siguiente forma:

a) Calcule la cantidad de suspensión secundaria de antígeno que se necesita para incluir 0.2 c.c. para cada análisis de suero y 0.1 c.c. para cada análisis de líquido cefalorraquídeo. Permita un ligero exceso para compensar la pérdida durante el pipeteo.

b) Prepare la suspensión secundaria de antígeno, soplando un volumen de suspensión primaria de antígeno en 8 volúmenes de solución de cloruro de sodio al 4%.

Las siguientes fórmulas son usadas para calcular el volumen de suspensión primaria de antígeno y de solución de cloruro de sodio al 4% necesitadas para preparar la cantidad requerida de suspensión secundaria de antígeno.

$$\frac{\text{Volumen requerido de suspensión secundaria}}{9} = \text{Volumen de suspensión primaria de antígeno que va a ser usado.}$$

$$\text{Volumen de suspensión primaria de antígeno} \times 8 = \text{Volumen de solución de cloruro de sodio al 4\% que va a ser usado.}$$

EJEMPLO:

Se necesitan 63 c.c. de suspensión secundaria de antígeno.

$$\frac{63}{9} = 7 \text{ c.c. de suspensión primaria de antígeno necesitada.}$$

$$7 \text{ c.c.} \times 8 = 56 \text{ c.c. de solución de cloruro de sodio al 4\% necesitada.}$$

6. Añada 0.2 c.c. de suspensión secundaria de antígeno a cada suero y al control de solución salina, y 0.1 c.c. cada líquido cefalorraquídeo.

7. Agite las gradillas con tubos durante 5 minutos en un agitador mecánico de Kahn. (Los tubos deben ser agitados a mano vigorosamente durante 5 minutos y colocados en el baño de María a 37° C. durante 30 minutos cuando no se puede utilizar un agitador mecánico de Kahn.)

8. Centrifugue todos los tubos de 1.500 a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos.

9. Saque los tubos de la centrífuga y examine macroscópicamente ante la ventana o una fuente de luz artificial ante fondo negro.

10. Lea y anote las reacciones macroscópicamente positivas, evidenciadas por agregación gruesa de partículas de antígeno suspendidas en un fluído relativamente claro.

11. Examine el contenido de cada tubo en el que la agregación es dudosa o completamente ausente, por pipeteo de una parte de su contenido en un anillo de parafina sobre una lámina de vidrio y observe microscópicamente.

12. Lea y anote las reacciones observadas microscópicamente de acuerdo con la descripción siguiente:

Positivo..... Floculación definida de partículas de antígeno.
Dudoso..... Ligera floculación de partículas de antígeno.
Negativo..... Ausencia de floculación, con partículas de antígeno uniformemente distribuidas.

13. Informe los resultados anotados en la siguiente forma:

Lectura Macroscópica	Lectura Microscópica	Informe
Positiva	(No hecha)	Positivo
Dudosa	Positiva	Positivo
Dudosa	Dudosa	Dudoso
Negativa	Positiva	Positivo
Negativa	Dudosa	Dudoso
Negativa	Negativa	Negativo

Nota: Las reacciones zonales en las que un suero fuertemente positivo da un resultado negativo en las reacciones rutinarias con suero total pero que son fuertemente positivas cuando el suero es analizado en diluciones en serie, son raramente encontradas. Cuando hay una razón para sospechar que esa inhibición de la reacción ha sucedido, deberá analizarse una dilución al 1:10 de suero en solución salina normal.

Reacción Cuantitativa de Floculación de Eagle con Suero o Líquido Cefalorraquídeo

1. Prepare diluciones de suero o de líquido cefalorraquídeo en proporciones de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, ó mayores si es necesario, de acuerdo con el siguiente método:

a) Pipetée en cada uno de 6 (o más) tubos 0.4 c.c. de solución salina al 0.85% para dilución de suero o de 1.0 c.c. para dilución de líquido raquídeo.

b) Añada 0.4 c.c. de suero calentado o 1 c.c. de líquido cefalorraquídeo al primer tubo y mezcle.

c) Pase 0.4 c.c. del primero al segundo tubo y mezcle (suero).

Ó bien

Pase 1.0 c.c. del primero al segundo tubo y mezcle (líquido cefalorraquídeo).

d) Continúe pasando y mezclando de un tubo al siguiente (0.4 c.c. de mezcla de suero ó 1.0 c.c. de dilución de líquido cefalorraquídeo) hasta que todas las diluciones hayan sido hechas. (2)

2. Analice cada dilución de suero o de líquido cefalorraquídeo en la forma indicada en "Reacciones Cualitativas con Suero o con líquido Cefalorraquídeo" (página Nº 8).

3. Anote la reacción obtenida en cada dilución.

4. Informe los resultados de acuerdo con la dilución más alta que dé una reacción cuando la siguiente dilución más alta rinda un resultado negativo.

EJEMPLO:

Dilución						*Informe*
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
+	+	+	+	—	—	Positivo, dilución 1:16
+	+	+	—	—	—	Positivo, dilución 1:8

(2) El siguiente método de dilución es preferido por el Dr. Harry Eagle:

Suero: Coloque cantidades decrecientes de suero en una serie de tubos y ajuste los volúmenes a 0.4 c.c. por adición de solución salina al 0.85% en la forma abajo indicada:

Tubo Nº	1	2	3	4	5	6 etc.
Suero total	0.2	0.1	..	..	..	..
1:8 suero	..	..	0.4	0.2	0.1	0.05
0.85% solución salina	0.2	0.3	..	0.2	0.3	0.35
Dilución final	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64

Líquido cefalorraquídeo: Ponga cantidades decrecientes de líquido cefalorraquídeo en una serie de tubos y ajuste el volumen total en la forma abajo indicada:

Tubo Nº	1	2	3	4	5	6 etc.
Total de líquido cefalorraquídeo	0.5	0.25	..	..	..	..
1:8 líquido cefalorraquídeo	..	..	1	0.5	0.25	0.1
0:85% de solución salina	0.5	0.75	..	0.5	0.75	0.7
Dilución final	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64

Cuando una reacción positiva es seguida por una dudosa en la dilución próxima más alta se hace un cálculo interpolado del título.

EJEMPLO:

Diluciones del suero						*Informe*
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
+	+	+	+	±	—	Positivo, dilución 1:24
+	+	+	±	—	—	Positivo, dilución 1:12

Antígeno de Floculación de Eagle

Preparación del Antígeno

Reactivos:

1. Polvo seco de corazón de res. (3)
2. Eter anestésico.
3. Alcohol etílico absoluto.
4. Colesterol.
5. Esterol de gérmenes de maíz.

Procedimiento

1. Pese 50 grams. de polvo seco de corazón de res.

2. Pase a un frasco de 1,000 c.c. con tapón de vidrio y añada 250 c.c. de éter anestésico frío.

3. Extraiga a temperatura de refrigerador durante 15 minutos con agitación frecuente.

4. Filtre rápidamente por succión y deseche el filtrado etéreo.

5. Regrese el polvo de corazón de res al frasco y repita la extracción y filtración 3 veces más, utilizando cada vez 250 c.c. de éter frío.

6. Después de la última extracción y filtración lave el polvo en el filtro con 100 c.c. de éter fresco.

7. Disemine el polvo en una hoja limpia de papel filtro y deje secar a temperatura ambiente hasta que quede exento de olor a éter.

8. Coloque el polvo en un frasco limpio y seco y añada 250 c.c. de alcohol etílico absoluto.

9. Tápelo herméticamente y haga la extracción durante 5 días de 20° a 37° C. Agite el frasco todos los días.

---

(3) Obtenible de la Difco Laboratories, Detroit, Mich.

10. Filtre el extracto alcohólico en un cilindro graduado de 250 c.c. y lave el polvo húmedo de corazón de res con fracciones frescas de alcohol absoluto hasta que el volumen total equivalga a 250 c.c.

11. Pase el extracto alcohólico a un frasco, tápelo herméticamente y enfríe de —10° a —25° C. Déjelo a esta temperatura durante una hora.

12. Filtre rápidamente por succión y deseche el precipitado floculento.

13. Añada 6 mg. de colesterol y 6 mg. de esterol de gérmenes de maíz para cada c.c. de antígeno. La solución de esteroles puede ser ayudada calentándola en el baño de María a 56° C.

El antígeno deberá ser guardado a temperatura ambiente en la obscuridad, en frascos herméticamente tapados. Compare cada lote de antígeno con uno de reactividad conocida, practicando análisis comparativos de sueros negativos conocidos, débil y fuertemente positivos.

Rectificación del antígeno

Si el antígeno demuestra ser insensible o si los resultados negativos son de aspecto granuloso, el antígeno puede ser rectificado en ocasiones por el siguiente procedimiento:

1. Coloque 20 c.c. de extracto de antígeno (sin colesterol o esterol de gérmenes de maíz añadidos) en un pequeño plato de evaporación.

Cuadro 1.—*Método de rectificación del antígeno de floculación de Eagle.*

A. Preparación de antígenos con concentraciones variables de extractos de tejidos.

	Antígeno N°				
	1	2	3	4	5
Extracto alcohólico doblemente concentrado, fortificado con colesterol y esterol de gérmenes de maíz al 0.6% cada uno, c.c.	1.6	1.2	1.0	0.8	0.6
Solución en alcohol absoluto de 0.6% de colesterol y 0.6% de esterol de gérmenes de maíz, c.c.	0.4	0.8	1.0	1.2	1.4
Concentración de extractos de tejidos en relación con el extracto original	1.6×	1.2×	1.0×	0.8×	0.6×

Antígeno N°	Dilución de suero positivo en suero negativo							Observaciones
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	Suero Negativo	
1	+	+	+	±	—	—	—	Reacciones negativas suaves.
2	+	+	+	+	±	—	—	Reacciones negativas suaves (mezcla óptima)
3	+	+	+	+ -	± —	—	—	Reacciones negativas con granulaciones
4	+	+	+	+ -	+	—	—	Reacciones negativas con granulaciones
5	+	+	+	+	±	±	±	Reacciones negativas con granulaciones

B. Método de analizar antígenos rectificados

Conclusión: Cada 12.0 c.c. del extracto alcohólico original deberán ser concentrados a 10.0 c.c. antes de la adición de esteroles. En el Venereal Disease Research Laboratoy algunos polvos de corazón de res que produjeron antígenos que no respondieron a los métodos de rectificación prescritos, han sido alterados por extracción preliminar con acetona (5 c.c. para cada gramo de polvo durante 18 horas a temperatura ambiente), de modo que se obtuvieron antígenos satisfactorios para la reacción de floculación de Eagle.

2. Coloque el plato de evaporación en el baño de María a 56° C. y deje concentrar el antígeno hasta 10 c.c.

3. Pase el antígeno a un pequeño frasco y añada 60 mg. de colesterol y 60 mg. de esterol de gérmenes de maíz. Caliente el frasco en baño de María a 56° C. para ayudar a la solución de los esteroles.

4. Pese 600 mg. de colesterol y 600 mg. de esterol de gérmenes de maíz. Disuélvalos en 100 c.c. de alcohol absoluto.

5. Diluya 1.6 c.c., 1.2 c.c., 1.0 c.c., 0.8 c.c. y 0.6 c.c., del extracto concentrado de antígeno conteniendo 0.6% de colesterol y 0.6% de esterol de gérmenes de maíz, con 0.4 c.c., 0.8 c.c., 1.0 c.c., 1.2 c.c. y 1.4 c.c., respectivamente, de alcohol absoluto conteniendo 0.6% de colesterol y 0.6% de esterol de gérmenes de maíz.

6. Prepare diluciones en serie de un suero positivo conocido y un suero negativo conocido.

7. Analice cada uno de los cinco antígenos con estas mezclas de sueros. El antígeno que descubra la cantidad más pequeña de suero sifilítico y que no muestre evidencia de agregados con suero negativo representa la proporción óptima de extracto a mezcla de alcohol.

El cuadro 1 ilustra el método de preparar y analizar antígeno con concentraciones variables de extractos de tejido en la forma antes descrita.

REACCIONES DE FIJACION DEL COMPLEMENTO DE EAGLE

Equipo y Cristalería

Cristalería

1. Tubos graduados para centrífuga de 15 c.c.
2. Tubos con cuello para centrífuga de 50 c.c.

Preparación de Sueros

1. Separe los sueros de las sangres coaguladas por centrifugación y pipeteo o decantación.

2. Caliente los sueros a 56° C. durante 20 a 30 minutos o de 60° a 62° C. durante 3 minutos. Los sueros previamente calentados deberán ser nuevamente calentados durante 5 minutos a 56° C. el día del análisis.

Nota: Si se desean reacciones de fijación del complemento de sensibilidad máxima, es necesario en primer lugar eliminar de los sueros las hemolisinas naturales anti-carnero. Esto puede ser logrado en la siguiente forma:

a) Pipetée 1 c.c. de cada suero no calentado en un pequeño tubo (12 × 75 mm.) y colóquelo en el refrigerador durante 15 ó más minutos.

b) Añada una gota de glóbulos rojos de carnero lavados y comprimidos a cada suero y mezcle bien.

c) Lleve nuevamente todos los tubos al refrigerador durante 15 minutos.

d) Centrifugue todos los tubos y separe los sueros por decantación. Evite al pasar los residuos celulares del lavado de las paredes y del fondo de los tubos.

e) Caliente los sueros a 56° C. durante 20 a 30 minutos o de 60° a 62° C. durante 3 minutos. Los sueros previamente calentados y absorbidos deberán ser calentados durante 5 minutos el día del análisis.

Preparación del Líquido Cefalorraquídeo

1. Centrifugue y decante todos los líquidos cefalorraquídeos para eliminar restos celulares y particulados.

2. Caliente todos los líquidos cefalorraquídeos recibidos por correo o almacenados durante 3 ó más días, a 56° C. durante 15 minutos, para inactivar sus substancias termolábiles anti-complementarias.

3. Los líquidos cefalorraquídeos recientemente extraídos son analizados sin calentamiento preliminar.

Reactivos

1. Solución salina normal (0.85%):

   a) Pese 8.5 grms. de cloruro de sodio seco (A. C. S.) para cada litro de solución salina. La sal puede ser pesada y distribuída en tubos tapados con tapón de corcho para evitar el pesado diario. La solución salina deberá ser preparada diariamente.

   b) Disuelva la sal en agua recientemente destilada y filtre en un frasco con tapón de vidrio o de gasa de algodón.

   c) Ponga una porción de solución salina suficiente para diluir el complemento que va a ser usado en el análisis de fijación de complemento, en el refrigerador, dejando el resto a la temperatura ambiente.

2. Dilución de Antígeno:

   a) Coloque la cantidad necesaria de antígeno en un frasco (vea "Preparación del Antígeno para la Reacción de Fijación del Complemento de Eagle", página 27). Vierta la cantidad designada de solución salina lentamente en el antígeno. La cantidad de dilución de antígeno necesitada puede ser calculada por el número de tubos conteniendo antígeno en el análisis y en las titulaciones. El factor de dilución es anotado en la etiqueta del frasco de antígeno. La dosis del análisis es 0.4 c.c. de antígeno diluído.

EJEMPLO:

	Antígeno		*Solución Salina*
Título designado del antígeno 1:120	1.0 c.c.	—	120 c.c.
	0.6 c.c.	—	72 c.c.
Título designado del antígeno 1:160	1.0 c.c.	—	160 c.c.
	0.4 c.c.	—	64 c.c.

   b) El antígeno diluído se deja reposar a temperatura ambiente.

3. Suero-complemento:

   a) Suero de cobayo exento de células o de glóbulos, puede ser obtenido por centrifugación de tubos con sangre y decantación

del suero, cuando el laboratorio acostumbra sangrar a los cobayos el día anterior al que son practicados los análisis de fijación del complemento. Los sueros de 3 o más cobayos deberán ser mezclados y llevados al refrigerador.

b) El suero-complemento deshidratado deberá ser llevado a su volumen original añadiendo la cantidad necesaria de diluyente amortiguado o de agua destilada. El complemento rehidratado deberá ser guardado en el refrigerador.

c) El suero-complemento guardado en estado de congelación deberá ser vuelto al estado líquido colocándolo a temperatura ambiente o a 37° C. solo el tiempo suficiente para que se funda. Como el contenido de proteína de estos sueros tiende a depositarse en el fondo del tubo durante la descongelación, estos tubos de suero deberán ser mezclados adecuadamente por inversión y regresados al refrigerador (6° a 10° C.).

d) Pruebe previamente el complemento para obtener una combinación satisfactoria predecible con el antígeno. (Véa "Reacción Previa del Complemento" página 27.)

4. Dilución de hemolisina:

a) Prepare un lote de dilución de hemolisina al 1% en la siguiente forma:

Solución salina (0.85%)	94.0 c.c.
Fenol (en solución salina al 5%)	4.0 c.c.
Hemolisina glicerinada (50%)	2.0 c.c.

La solución del fenol deberá ser bien mezclada con solución salina antes de que la hemolisina glicerinada sea añadida. Esta solución se conserva bien a la temperatura del refrigerador, pero deberá ser desechada cuando contenga precipitado.

b) Las diluciones de hemolisina son preparadas por mezcla posterior de partes alícuotas de la solución al 1%.

5. Preparación de la suspensión de los glóbulos rojos de carnero:

a) Filtre una cantidad adecuada de sangre de carnero preservada a tubos de centrífuga de fondo redondo.

b) Añada 10 a 15 volúmenes de solución salina a cada tubo.

c) Centrifugue los tubos a una fuerza suficiente para depositar los glóbulos en 5 minutos.

d) Elimine el líquido sobrenadante por succión a través de una pipeta capilar, quitando la capa superior de glóbulos blancos.

e) Vierta los glóbulos en un tubo de centrífuga graduado, resuspenda en una segunda porción de solución salina y recentrifugue hasta que haya sido obtenido un volumen constante de glóbulos. Generalmente bastarán 10 a 15 minutos de 2,000 a 2,500 r. p. m.

f) Lea el volumen de las células comprimidas en el tubo de la centrífuga y elimine cuidadosamente el líquido sobrenadante.

g) Prepare una suspensión de glóbulos de carnero al 3%, lávelos en un frasco con un volumen de solución salina calculado para su uso en la siguiente forma:

$$\frac{\text{Volumen de células comprimidas}}{3} \times 97 = \text{volumen necesitado de solución salina.}$$

EJEMPLO:

Volumen de células comprimidas 3.3 c.c.

$$\frac{3.3 \text{ c.c.}}{3} \times 97 = 106.7 \text{ c.c. necesitados de solución salina.}$$

h) Coloque el frasco con la suspensión de glóbulos en el refrigerador cuando no esté en uso. Agite siempre el frasco antes de usarlo para obtener una suspensión uniforme de glóbulos, ya que los glóbulos se sedimentan en el fondo del frasco cuando son dejados en reposo.

Reacciones Cualitativas con Suero

1. Coloque los tubos de ensayo (13 × 100 mm.) en gradillas de modo que haya dos tubos para cada suero, incluyendo los controles de sueros positivo y negativo. Numere la primera hilera de tubos para corresponder a los sueros analizados.

2. Pipetée 0.2 c.c. de solución salina en cada tubo de la primera hilera.

3. Pipetée 0.6 c.c. de solución salina en cada tubo de la segunda hilera.

4. Añada 0.2 c.c. de suero calentado a los dos tubos del análisis.

5. Añada 0.4 c.c. de la dilución de suero-complemento al 1:10 a cada tubo.

Nota: Una dilución de complemento al 1:10 es preparada añadiendo 9 c.c. de solución salina fría para cada c.c. de suero-complemento.

6. Añada 0.4 c.c. de antígeno diluído a cada tubo de la primera hilera.

7. Mezcle el contenido de los tubos agitando bien la gradilla y colóquela en el refrigerador a 6° C. durante 3 a 4 horas.

8. Prepare los tubos controles de antígeno y de glóbulos en la siguiente forma:

a) Tubo control de antígeno:

Solución salina al 0.85%	0.4 c.c.
Dilución de antígeno	0.4 c.c.
Complemento, 1:10	0.4 c.c.

b) Tubo control de glóbulos:

Solución salina	1.2 c.c.

9. Coloque los tubos controles de antígeno y de glóbulos en el refrigerador con los tubos de la reacción misma.

10. Prepare 4 juegos de tubos controles de complemento del siguiente modo.

a) Coloque los tubos de ensayo en una gradilla de modo que haya 4 juegos de 4 tubos cada uno, numerados del 1 al 4.

b) Pipetée 0.4 c.c. de solución salina, en los tubos numerados con el Nº 1. Pipetée 0.6 c.c. de solución salina en los tubos numerados con el Nº 2. Pipetée 0.7 c.c. de solución salina en los tubos con los Nos. 3 y 4.

c) Añada 0.4 c.c. de antígeno diluído a todos los tubos.

d) Añada 0.4 c.c. de dilución de complemento al 1:10 a los tubos numerados con el Nº 1.
Añada 0.2 c.c. de dilución de complemento al 1:10 a los tubos numerados con el Nº 2.
Añada 0.13 c.c. de dilución de complemento al 1:10 a los tubos numerados con el Nº 3.
Añada 0.1 c.c. de dilución de complemento al 1:10 a los tubos numerados con el Nº 4.

e) Mezcle el contenido de los tubos por agitación de la gradilla y colóquelos en el refrigerador.

11. Practique la titulación de hemolisina de acuerdo con la siguiente descripción:

a) Coloque los 7 tubos de ensayo de 13 × 100 mm. en una gradilla.

b) Prepare una dilución de hemolisina 1:1200 pipeteando 11 c.c. de solución salina en un frasco de Erlenmeyer de 25 c.c. y adicionando 1 c.c. de solución del lote de hemolisina al 1:100.

c) Prepare una serie de diluciones de hemolisina a partir de la dilución de 1:1200 en la siguiente forma:

	Dilución final de hemolisina						
	1:1200	1:1400	1:1600	1:2000	1:2400	1:3000	1:4000
1:1200 hemolisina, c.c.	0.4	0.34	0.3	0.24	0.2	0.16	0.12
Solución salina al 0.85% c.c.	Ninguna	0.06	0.1	0.16	0.2	0.24	0.28

d) Prepare una dilución de complemento al 1:25 añadiendo 0.2 c.c. de suero de cobayo a 4.8 c.c. de solución salina y añada los reactivos a los tubos en la forma indicada en el cuadro Nº 2.

Cuadro Nº 2.—*Técnica de la titulación de la hemolisina (1)*

	Dilución de hemolisina						
	1:1200	1:1400	1:1600	1:2000	1:2400	1:3000	1:4000
	c.c.	*c.c.*	*c.c.*	*c.c.*	*c.c.*	*c.c.*	*c.c.*
Dilución de hemolisina	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Complemento, 1:25	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Suspensión de células 3%	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Solución salina 0.85%	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8

e) Coloque la gradilla en el baño de María a 37° C. durante 30 minutos.

f) Saque la gradilla del baño de María y lea la titulación de hemolisina.

El Título de Hemolisina es la Mayor Dilución que Produce Hemolisis Completa

12. Compare la titulación de hemolisina en la siguiente forma:

a) Prepare 3 pequeños lotes de glóbulos sensibilizados (aproximadamante 8 a 12 c.c.), mezclando partes iguales de hemoli-

sina diluída y de suspensión de glóbulos al 3%. Los 3 títulos de hemolisina usados deberán incluir el punto de titulación observado en la siguiente forma:

EJEMPLO: Titulación observada igual a dilución 1:2000

Por lo tanto, glóbulos sensibilizados con hemolisina diluída:

1:1600 (título inmediato inferior).
1:2000 (título observado).
1:2400 (título inmediato superior).

Los volúmenes de hemolisina diluída y de suspensión de glóbulos que pueden ser usados en la preparación de pequeñas cantidades de glóbulos sensibilizados, requeridas, son presentados en la siguiente descripción:

Título	*Solución de hemolisina Lote 1:100*	*Solución salina al 0.85%*	*Suspensión de glóbulos al 3 por ciento*
	c.c.	*c.c.*	*c.c.*
1:1200	0.4	4.4	4.8
1:1400	0.3	3.9	4.2
1:1600	0.3	4.5	4.8
1:2000	0.2	3.8	4.0
1:2400	0.2	4.6	4.8
1:3000	0.2	5.8	6.0
1:4000	0.1	3.9	4.0

b) Saque 3 juegos de controles de complemento del refrigerador y colóquelos en baño de María a 37° C. durante 30 minutos.

c) Saque los controles de complemento del baño de María y añada 0.8 c.c. de cada lote de suspensión de glóbulos sensibilizados a cada tubo de un juego de tubos controles de complemento. Mezcle por agitación.

d) Coloque la gradilla conteniendo los 3 juegos de tubos controles de complemento en el baño de María a 37° C. durante 30 minutos.

e) Saque la gradilla del baño de María y observe el grado de hemolisis.

Nota: Los primeros 2 tubos de la titulación del complemento deberán estar completamente hemolizados. El tubo 3 deberá estar parcialmente hemolizado y el tubo 4 deberá mostrar poca o ninguna hemólisis. Cualquier error en la titulación de hemolisina se vuelve aparente inmediatamente. Si el primer tubo de solución está completamente hemolizado los glóbulos han

sido sensibilizados inadecuadamente y deberá añadirse mayor cantidad de hemolisina. Si 3 tubos muestran lisis completa se ha usado un exceso de hemolisina.

f) Elija como título correcto de hemolisina la dilución de hemolisina que reuna las condiciones arriba mencionadas.

13. Prepare una cantidad suficiente de suspensión de glóbulos sensibilizados de modo que 0.8 c.c. puedan ser añadidos a cada tubo de análisis de suero y a todos los controles, más 0.4 c.c. para cada tubo a los análisis de líquido cefalorraquídeo. Partes iguales de hemolisina (diluída de acuerdo con el título verificado) y de suspensión de glóbulos al 3%, cada una contenida en pequeños frascos de precipitado son mezcladas vaciándolas de un frasco al otro varias veces. Los volúmenes de hemolisina diluída y de suspensión de glóbulos al 3% que pueden ser usados en la preparación de 100 c.c. aproximadamente de glóbulos sensibilizados son ilustrados en el siguiente cuadro:

Título final	*Solución de hemolisina Lote 1:100*	*Solución salina al 0.85%*	*Suspensión de glóbulos al 3 por ciento*
	c.c.	*c.c.*	*c.c.*
1:1200	4.0	44.0	48.0
1:1400	4.0	52.0	56.0
1:1600	3.0	45.0	48.0
1:2000	2.5	47.5	50.0
1:2400	2.0	46.0	48.0
1:3000	2.0	58.0	60.0
1:4000	1.5	58.5	60.0

14. Saque del refrigerador, después de un período de 3 a 4 horas, las gradillas de los análisis de suero, incluyendo el juego restante de tubos de control de antígeno y de glóbulos y colóquelos al baño de María a 37° C. durante 30 minutos.

15. Saque las gradillas del baño de María y añada 0.8 c.c. de suspensión de glóbulos sensibilizados a cada tubo.

16. Mezcle bien el contenido de los tubos por agitación y vuelva a poner las gradillas en el baño de María para la incubación final de 20 a 30 minutos.

17. Observe el grado de hemólisis en los 4 tubos del juego control de complemento. Los tubos 1 y 2 deberán mostrar hemólisis completa y el tubo 3 hemólisis parcial después de incubación de 20 a 30 minutos en el baño de María a 37° C. Si los tubos 1 y 2 requieren 20 minutos para

aclarar, las gradillas de las reacciones con suero son leídas después de la incubación final de 20 minutos. Si los tubos 1 y 2 requieren 30 minutos para aclarar, las gradillas con suero son leídas después de 30 minutos de incubación final. El control de antígeno deberá estar completamente hemolizado. El control de glóbulos no deberá mostrar hemólisis.

18. Saque cada gradilla del baño de María al terminar el período de incubación final. Anote la hemólisis observada y reporte en la forma descrita en "Lectura e Informe".

Lectura e Informe

1. Observe los resultados de las reacciones cualitativas con suero o con líquido cefalorraquídeo e informe de acuerdo con la siguiente descripción:

Lectura de los tubos de ensayo (conteniendo antígenos)	Lectura del tubo control (sin antígeno)	Informe
Hemólisis completa o casi completa	Hemólisis completa	Negativo
Hemólisis parcial	Hemólisis completa	Dudoso
No hay hemólisis o hemólisis apenas perceptible	Hemólisis completa	Positivo
No hay hemólisis o hemólisis parcial	No hay hemólisis o hemólisis parcial	Anticomplementario

Reacciones Cualitativas con Líquido Cefalorraquídeo

1. Prepare tubos de ensayo (13 × 100 mm.) en gradillas de modo que haya 2 tubos para cada líquido cefalorraquídeo, incluyendo los controles positivo y negativo del líquido cefalorraquídeo.

2. Pipetée 0.2 c.c. de solución salina en cada tubo de la primera hilera. Pipetée 0.4 c.c. de solución salina en cada tubo de la segunda hilera.

3. Añada 1 c.c. de líquido cefalorraquídeo a los 2 tubos del análisis.

4. Añada 0.2 c.c. de dilución de suero-complemento al 1:10 a cada tubo.

Nota: Una dilución de complemento al 1:10 es preparada añadiendo 9 c.c. de solución salina fría a cada 1 c.c. de suero-complemento.

5. Añada 0.2 c.c. de antígeno diluído a cada tubo de la primera hilera.

6. Mezcle el contenido de los tubos agitando bien la gradilla y colóquelos en el refrigerador de 6° a 7° C durante 3 a 4 horas.

Suero analizado	Suero Control	Lectura de Resultados
Lisis completa	Lisis completa	NEGATIVO
Lisis parcial	Lisis completa	DUDOSO
No hay lisis	Lisis completa	POSITIVO
Lisis parcial	Lisis parcial	ANTICOMPLEMENTARIO
No hay lisis	No hay lisis	ANTICOMPLEMENTARIO

1 LECTURA DE LA REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO DE "EAGLE"

Figura N° 1

7. Complete los análisis en la forma descrita en "Reacciones Cualitativas de Suero" (página 18), excepto que deben añadirse 0.4 c.c. de suspensión de glóbulos sensibilizados a cada tubo de análisis con líquido cefalorraquídeo en lugar de los 0.8 c.c. prescritos para los análisis con suero.

8. Informe los resultados observados en la forma descrita en "Lectura e Informe" (página 23).

Reacciones Cuantitativas con Sueros o con Líquidos Cefalorraquídeos

Preparación de las diluciones de suero o de líquido cefalorraquídeo.

1. Coloque tubos de ensayo (13 x 100 mm) en gradillas, 6 tubos para cada suero o líquido cefalorraquídeo que deban ser analizados. Incluya un par de tubos para cada suero positivo, suero negativo y controles de antígeno y de glóbulos ([3]).

(3) El siguiente método para preparar las diluciones de suero y de líquido cefalorraquídeo es preferido por el doctor Harry Eagle:
Suero: Coloque cantidades decrecientes de suero en una serie de tubos y lleve el volumen total a 0.4 c.c. con solución salina al 0.85% en la forma abajo indicada.

						Control
Tubo Nº	1	2	3	4	5	6
Suero total, c.c.	0.2	0.1	...	...	...	0.2
Suero al 1:8 c.c.	...	...	0.4	0.2	0.1	...
Solución salina al 0.85% c.c.	0.2	0.3	...	0.2	0.3	0.6
Dilución final	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	...

Líquido cefalorraquídeo: **Calcule cantidades decrecientes de líquido cefalorraquídeo en una serie de tubos y lleve el volumen total a un c.c. con solución salina al 0.85% en la forma abajo indicada:**

						Control
Tubo Nº	1	2	3	4	5	6
Líquido cefalorraquídeo, c. c.	1.0	0.5	0.25	...	...	1.0
Líquido cefalorraquídeo al 1:8, c. c.	...	...	...	1.0	0.5	...
Solución salina al 0.85% c. c.	...	0.5	0.75	...	0.5	0.2
Dilución final	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	...

2. Pipetée 0.6 c. c. de solución salina al tubo 1 y 0.4 c. c. a los tubos 2, 3, 4, 5 y 6 para cada suero.

3. Pipetée 1 c.c. de solución salina en los tubos 2, 3, 4 y 5 y 0.2 c. c. al tubo 6 para cada líquido cefalorraquídeo.

4. Para cada suero:

Añada 0.6 c. c. de suero calentado al tubo 1.
Mezcle y pase 0.4 c.c. al tubo 6 (control de suero) y al tubo 2.
Mezcle el tubo 2 y pase 0.4 c.c. al tubo 3.
Mezcle el tubo 3 y pase 0.4 c.c. al tubo 4.
Mezcle el tubo 4 y pase 0.4 c.c. al tubo 5.
Mezcle el tubo 5 y deseche 0.4 c.c.

5. Para cada líquido cefalorraquídeo:
Añada 1.0 c.c. de líquido cefalorraquídeo a los tubos 1, 2 y 6.
Mezcle el tubo 2 y pase 1.0 c.c. al tubo 3.
Mezcle el tubo 3 y pase 1.0 c.c. al tubo 4.
Mezcle el tubo 4 y pase 1.0 c.c. al tubo 5.
Mezcle el tubo 5 y deseche 1.0 c.c.

Procedimientos de Análisis

1. Añada 0.4 c.c. de dilución al 1:10 de suero complemento a cada uno de 6 tubos de los análisis con suero (conteniendo suero diluído).

Nota: Una dilución de complemento al 1:10 es preparada añadiendo 9 c.c. de solución salina fría para cada 1 c.c. de suero complemento.

2. Añada 0.2 c.c. de dilución de suero complemento al 1:10 a cada uno de 6 tubos de análisis de líquido cefalorraquídeo (conteniendo líquido cefalorraquídeo diluído).

3. Añada 0.4 c.c. de antígeno diluído a cada uno de los primeros 5 tubos de los análisis con suero.

4. Añada 0.2 c.c. de antígeno diluído a cada uno de los primeros 5 tubos de análisis con líquido cefalorraquídeo.

5. Mezcle el contenido de los tubos agitando la gradilla y colóquelos en el refrigerador de 6° a 8° C. durante 3 a 4 horas y después a 37° C. durante 30 minutos.

6. Añada 0.4 c.c. de suspensión de glóbulos sensibilizados a cada tubo del análisis con líquido cefalorraquídeo y 0.8 c.c. de suspensión de glóbulos sensibilizados a cada tubo de análisis con suero y complete los análisis en la forma descrita en "Reacciones Cualitativas con Suero" (página 18).

7. Los resultados son informados en términos de la mayor dilución de suero ó de líquido cefalorraquídeo que produce una reacción POSITIVA.

Reacción Previa del Complemento

Es esencial hacer el análisis previo de los sueros-complemento individuales para asegurar que no son inactivos por el antígeno bajo las condiciones del análisis de fijación del complemento (2). Esto puede ser llevado a cabo en la forma descrita en el cuadro 3.

CUADRO 3.—*Método de pre-selección del complemento (2)*

	Actividad hemolítica del complemento después de incubación sin antígeno bajo las condiciones del análisis.				Actividad hemolítica del complemento después de incubación con antígeno bajo las condiciones del análisis.			
Dilución de antígeno en la forma usada en el análisis, c.c.	0	0	0	0	0.4	0.4	0.4	0.4
Dilución de complemento al 1:10 c.c.	0.4	0.3	0.2	0.15	0.4	0.3	0.2	0.15
Solución de NaCl al 0.85% c.c.	0.8	0.9	1.0	1.1	0.4	0.5	0.6	0.6
	4 horas en el refrigerador seguidas por media hora en el baño de María a 37° C; 0.8 c.c. de glóbulos sensibilizados en la forma usada en el análisis son añadidos entonces.							
	Resultados de Hemólisis							
Complemento A	Completa	Completa	Completa	Parcial	Completa	Completa	Parcial	Ninguna
Complemento B	Completa	Completa	Completa	Parcial	Completa	Completa	Completa	Parcial
Complemento C	Completa	Completa	Parcial	Ninguna	Parcial	Parcial	Ninguna	Ninguna

CONCLUSIÓN: Complemento A.—Deterioración mínima bajo la influencia de antígeno, adecuada para el uso. Complemento B.—Sin deterioración bajo la influencia del antígeno, adecuado para el uso. Complemento C.—grandemente inactivo bajo la influencia del antígeno, no adecuado para el uso.

Preparación del Antígeno para la Reacción de Fijación del Complemento de Eagle

Un extracto alcohólico colesterolizado de corazón de res es empleado. El polvo de corazón de res (4) puede ser usado.

(4) Obtenible de los Laboratorios Difco, Inc., Detroit, Mich.

1. Pese 50 grms. de polvo de corazón de res y colóquelos en un frasco de Erlenmeyer de 500 c.c. con tapón de vidrio.

2. Añada 250 c.c. de éter anestésico puro (5 c.c. por gramo de polvo) e incube durante 15 minutos de 30° a 37° C. con agitaciones frecuentes.

3. Filtre por succión a través de papel filtro exento de grasa. Deseche esta y todas las demás extracciones etéreas.

4. Añada 250 c.c. de éter anestésico puro al polvo húmedo y repita la extracción en la misma forma.

5. Repita la extracción etérea 4 veces.

6. Lave el polvo de corazón de res con 100 c.c. de éter anestésico fresco mientras que el polvo esté en el embudo filtro.

7. Saque el polvo del embudo y déjelo secar a temperatura ambiente hasta que quede exento de éter.

8. Coloque el polvo en un frasco de Erlenmeyer con tapón de vidrio exento de éter y añada 5 c.c. de alcohol absoluto por gramo de polvo. Anote la cantidad de alcohol empleada.

9. Extraiga el polvo de corazón de res durante 5 días a temperatura ambiente guardándolo en un lugar obscuro.

10. Filtre el extracto alcohólico a través de un papel filtro exento de grasa.

11. Lave el polvo en el embudo filtro con pequeñas porciones de alcohol fresco hasta que el volumen del filtro alcohólico combinado y los lavados sea igual a la cantidad de alcohol usada originalmente para la extracción.

12. Añada 0.6 mg. de colesterol por cada c.c. de extracto alcohólico.

13. Caliente el antígeno (extracto alcohólico colesterolizado) en baño de María a 56° C. hasta que el colesterol se haya disuelto. Este antígeno deberá ser guardado a temperatura ambiente.

Reacciones para Actividades Anticomplementarias y Hemolíticas del Antígeno

Cada lote de antígeno deberá ser analizado, una vez, para investigar sus actividades anticomplementaria y hemolítica y estar seguros que estas propiedades indeseables no son tan pronunciadas como para que su uso interfiera en la reacción.

1. Titulación anticomplementaria del antígeno:

a) Prepare diluciones de antígeno en la siguiente forma:

Dilución final de antígeno	1:1	1:2	1:3	1:4	1:6	1:8	1:12
Antígeno, c.c.	0.4	0.2	0.13	0.1	0.07	0.05	0.035
Solución Salina 0.85%, c.c. ...	Ninguno	0.2	0.27	0.3	0.33	0.35	0.37

b) Complete el análisis en la forma indicada con el cuadro 4.

c) **Conclusión:** En este ejemplo (cuadro 4) el antígeno no es anticomplementario en una dilución mayor de 1:6.

Cuadro 4

	Dilución de antígen						
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:6	1:8	1:12
Dilución de antígeno, c.c.	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Solución salina al 0.85%, c.c.	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Complemento, 1:10 c.c.	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

Después de 4 horas de 6° a 8° C. seguimos por 30 minutos a 37° C. añada 0.8 c.c. de glóbulos sensibilizados a todos los tubos y regréselos al baño de María durante 30 minutos.

Ejemplo de hemólisis después de 30 minutos a 37° C.	Completa	Ninguna	Ninguna	Parcial	Completa	Completa	Completa

2. Titulación hemolítica del antígeno:

a) Prepare las diluciones de antígeno en la forma descrita para "Titulación anticomplementaria del antígeno (a)".

b) Complete el análisis en la forma indicada en el cuadro 5.

Cuadro 5

	Dilución del antígeno						
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:6	1:8	1:12
	c.c.	c.c.	c.c.	c.c.	c.c.	c.c.	c.c.
Dilución de antígeno	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Solución salina al 0.85%	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Suspensión de glóbulos al 3%..	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

Las lecturas son hechas después de que los tubos han estado durante 30 minutos en el baño de María a 37° C.

Ejemplo de hemólisis	Completa	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna

c) **Conclusión:** En este ejemplo (cuadro 5) el antígeno no es significativamente hemolítico.

Determinación del Título del Antígeno

La dilución óptima del antígeno necesita ser determinada sólo una vez con cada lote de antígeno.

1. Prepare una dilución de antígeno al 1:40 virtiendo lentamente 39 c.c. de solución salina al 0.85% en un frasco que contenga 1 c.c. de antígeno.

Prepare diluciones de antígeno de acuerdo con la descripción siguiente:

Dilución final del antígeno	1:40	1:80	1:100	1:120	1:160	1:200
Dilución de antígeno al 1:40 c.c. ..	8.0	4.0	3.2	2.7	2.0	1.6
Solución salina al 0.85%, c.c.	Ninguna	4.0	4.8	5.3	6.0	6.4

2. Prepare las diluciones de un suero fuertemente positivo calentado de acuerdo con las siguientes instrucciones.

Dilución final del suero	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Suero, c.c.	4.0	2.0	1.0	0.5	0.25	0.125	0.062
Solución salina al 0.85%, c.c. ..	Ninguna	2.0	3.0	3.5	3.75	3.9	4.0

3. Practique la titulación en la forma descrita en el cuadro 6. Las anotaciones muestran un resultado típico de titulación.

Cuadro 6.—*Determinación de la dilución óptima del antígeno.*

Dilución del Antígeno	Resultado de la reacción de fijación del complemento en suero diluído con solución salina.							
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
1:40	[1]+	+	+	[2]±	[1]—	—	—	—
1:80	+	+	+	+	±	—	—	—
1:100	+	+	+	+	+	—	—	—
1:120	+	+	+	+	+	±	—	—
1:160	+	+	+	+	+	±	—	—
1:200	+	+	+	+	+	—	—	—

[1] + = positivo (sin hemólisis).
[2] ± = Dudoso (hemólisis parcial).
[3] — = negativo (hemólisis completa).

4. La dilución más reactiva es considerada como la dilución óptima del antígeno. El ejemplo mostrado en el cuadro Nº 6 indica que el antígeno analizado fué más reactivo en las diluciones 1:120 ó 1:160. Al preparar el antígeno para el uso diario en el análisis, el volumen correcto de solución salina es vertido lentamente en un volumen de antígeno. La dilución del antígeno deberá ser opalescente y homogénea y no tener gránulos visibles.

Bibliografía

1. Gold, Allen: The Eagle complement fixation test for syphilis; note on the amboceptor titration. J. Lab. and Clin. Med., 25: 194-195, Nov. 1939.

2. Giordano, A. S.; Carlson, B.: Occurence of non-specific substance in guinea pig serum fixed by antigen in Wassermann test. Am. J. Clin. Path., 9: 130-135, Mar. 1939.

REACCIONES DE HINTON

Equipo y Cristalería

Equipo General

1. Agitadora Kahn (275 a 285 oscilaciones por minuto, con amplitud de pulgada y media).
2. Termómetro de máxima y mínima.

Cristalería

1. Tubos de ensayo (1) de 100 × 11-1/4 mm. de diámetro exterior.
2. Frascos, Erlenmeyer, de 125 ó 250 c.c. con dos compartimentos semicirculares en el fondo formados por un reborde en forma de V. invertida (Frascos de Hinton).

Reactivos:

1. Indicador de Hinton (Ver "Preparación del Indicador Glicerinado de Hinton (Regular), página 34).

2. Solución de Cloruro de Sodio al 5 por ciento.
   a) Pese 5 gramos de cloruro de sodio (A. C. S.) previamente secado.
   b) Añada el cloruro de sodio a 100 c.c. de agua recientemente destilada y caliente la solución en un autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.
   c) Guarde la solución de sal en botellas tapadas con tapones de cristal a temperatura ambiente.

3. Solución de cloruro de sodio al 0.85 por ciento:
   a) Añada la cantidad necesaria (8.5 gramos por cada litro) de cloruro de sodio seco, al agua recientemente destilada. Esta solución no necesita ser calentada y debe ser preparada el día que se va a usar.

4. Solución de glicerina al 50 por ciento:

---

(1) Aparecen bajo el Nº 45060/S73, en el catálogo de Kimble Glass Co., Vineland, N. J.

a) Mezcle volúmenes iguales de glicerina Baker y Adamson (reactivo) y agua destilada. Esta solución dura, sin dañarse, indefinidamente.

Preparación del Suero

1. Separe los sueros de los coágulos por centrifugación y pipeteo o decantación.

2. Caliente los sueros en el baño de María durante 30 minutos a 56° C. No se debe calentar los sueros antes del día en que se van a analizar. Si hay necesidad de repetir el examen en una muestra, use suero recién separado del coágulo, si lo hubiere.

3. Vuelva a centrifugar cualquier muestra a la cual se le hayan formado partículas visibles durante el calentamiento.

Preparación del Indicador Glicerinado de Hinton (Regular)

1. Pipetée una parte del indicador de Hinton dentro de uno de los compartimentos del frasco de Hinton.

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

2. Pipetée 0.8 c.c. de la solución de cloruro de sodio al 5 por ciento dentro del otro compartimento del frasco de Hinton. Debe tenerse cuidado al depositarla dentro de la botella para evitar una mezcla prematura de las soluciones.

3. Mezcle los contenidos del frasco, agitándolo rápidamente de un lado a otro durante 1 minuto exactamente.

4. Deje reposar la mezcla durante 5 minutos exactamente.

5. Agregue 13.2 partes de la solución de cloruro de sodio al 5 por ciento y agite el frasco vigorosamente.

6. Agregue 15 partes de la solución de glicerina al 50 por ciento y agite la botella hasta que la suspensión sea hemogénea.

7. Guarde la botella tapada con un tapón de cristal, en el refrigerador. Esta suspensión, designada como solución del indicador glicerinado, se conserva en buen estado por lo menos durante 3 semanas.

REACCION ESTANDAR DE HINTON CON SUERO

1. Coloque los tubos de ensayo (100 × 11-1/4 mm. de diámetro exterior) en gradillas adecuadas, de manera que haya un tubo para cada

suero que se va a analizar y para los sueros positivo y negativo de control. Numerar los tubos de modo que correspondan a los números que identifican los sueros.

2. Pipetée 0.5 c.c. de cada suero calentado dentro del tubo correspondiente.

Nota: Ocasionalmente los sueros que son fuertemente positivos producirán una reacción negativa cuando se usan 0.5 c.c. de suero como cantidad para el análisis. Cuando se sospeche una reacción de este tipo deberá hacerse el análisis también con 0.1 c.c. de suero, además del hecho con la cantidad de 0.5 c.c. de suero.

3. Pipetée 0.5 c.c. del indicador glicerinado de Hinton dentro de cada tubo con suero.

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

4. Agite a mano las gradillas que contienen los tubos, hasta ver que los sueros y el indicador glicerinado estén mezclados.

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

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

Nota: El baño de María debe permanecer destapado durante este período. El baño de María debe estar equipado con termómetros de temperatura máxima y mínima y la temperatura no deberá bajar a menos de 34° ni subir a más de 39° C. para obtener resultados dignos de confianza.

Lectura e Informe

1. Coloque una lámpara cilíndrica, fluorescente, de 18 o más pulgadas de largo, con pantalla frente a un lugar con fondo obscuro. El foco de la lámpara deberá quedar escasamente arriba del nivel de los ojos.

2. Saque cada tubo de la gradilla cuidadosamente sin alterar su contenido.

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

4. Vea si hay clarificación del líquido y la presencia o ausencia de un anillo de copos o gránulos blancos y gruesos en el menisco.

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

6. Informe los resultados en la siguiente forma:

Positivo..... Copos o gránulos blancos y gruesos en el menisco, y floculación definida cuando los tubos son ligeramente agitados.

Negativo..... Ausencia de un anillo o banda de flóculos, y cuando no aparece floculación ni hay aspecto granuloso al agitar ligeramente los tubos. Los sueros contaminados con bacterias o hemolizados frecuentemente producen un anillo blanquecino que se adhiere fuertemente al tubo.

7. Centrifugue todos los tubos a los cuales no se les pueda hacer lecturas francamente positivas o negativas, a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos.

8. Retire los tubos de la centrífuga y lea las reacciones en la forma antes descrita.

9. Informe los resultados como sigue:

Dudoso..... Aquellas reacciones que muestran una granulación gruesa en el menisco, y floculación definida cuando los tubos son agitados suavemente.

Negativo..... Todas aquellas muestras que no reaccionan como se describe para las reacciones dudosas.

10. Informe las muestras que estén hemolizadas o contaminadas como "no satisfactorias" a menos que la reacción sea fuertemente positiva.

REACCION RAPIDA DE HINTON CON SUERO

1. Caliente el suero fresco durante 3 minutos a 60° C.

2. Coloque los tubos de ensayo (100 × 11-1/4 mm. de diámetro exterior) en gradillas adecuadas de modo que haya un tubo para cada suero que se va a analizar y para los sueros positivo y negativo de control.

3. Pipetée 0.5 c.c. de cada suero por analizar dentro del tubo correspondiente.

4. Añada 0.5 c.c. del indicador glicerinado a cada tubo con suero y agítelo en la agitadora durante 10 minutos, después de haberlo agitado a mano para mezclar el contenido de los tubos.

5. Retire la gradilla con los tubos de la agitadora y colóquela en el baño de María a 37° C. durante 20 minutos.

6. Retire los tubos del baño de María y centrífugue a 2,000 r.p.m. durante 10 minutos.

7. Retire los tubos de la centrífuga sin agitar su contenido.

8. Lea cada tubo como se describe bajo "Lectura e Informe" (página 35).

9. Informe los resultados observados en la siguiente forma:

Positivo..... Si hay copos claramente visibles en el menisco y se ven flóculos al agitar los tubos suavemente.

Negativo..... Cuando no hay anillo o banda de flóculos en el menisco, y no hay floculación cuando los tubos son ligeramente agitados.

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

Nota: Los resultados pueden ser comprobados colocando los tubos en el refrigerador hasta que puedan ser colocados en el baño de María a 37° C. durante 16 horas y repitiendo la lectura.

REACCION CUANTITATIVA DE HINTON

Preparación de Diluciones de Suero

Nota: El suero negativo es usado como diluyente. Este puede ser reunido con el de los análisis de días anteriores. Sin embargo, si se debe hacer un número considerable de reacciones cuantitativas es deseable usar suero negativo previamente mertiolado con solución de mertiolato al 1:500 a una proporción de 5 c.c. por 100 c.c. de suero reunido, filtrado a través de un filtro Seitz.

1. Coloque una hilera de tubos de dilución (100 × 11-¼ mm. de diámetro exterior), numerados del 2 al 10 y añada 1.5 c.c. de suero negativo al tubo 2, 1 c.c. a los tubos 3, 4 y 5, 0.5 c.c. a los tubos 6, 7, 8 y 9 y 1 c.c. al tubo 10.

2. Añada 1 c.c. del suero del paciente al tubo 2.

3. Mezcle y pase 1 c.c. del tubo 2 al tubo 3. Continúe este procedimiento hasta el tubo 10. Esto da lugar a las diluciones aproximadas siguientes: 1:2.5, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:45, 1:67, 1:100, 1:200.

4. Prepare una serie de 6 tubos de ensayo (100 × 11-¼ mm. D. E.) numerados 1, 2, 3, 4, 5 y 10 y pipetée 0.5 c.c. del suero del paciente en el tubo 1.

5. Pase 0.5 c.c. de suero diluído de los tubos de dilución 2, 3, 4, 5 y 10 a los tubos de la prueba del mismo número. Como los tubos de dilución 6, 7, 8 y 9 contienen sólo 0.5 c.c. de suero diluído; se vuelven parte de la serie de tubos de ensayo completando la serie del 1 al 10.

6. Añada 0.5 c.c. de indicador glicerinado a cada tubo y agítelo a mano para asegurar la mezcla completa de suero e indicador.

7. Agite la gradilla de tubos en la agitadora de Kahn durante 5 minutos.

8. Coloque la gradilla de tubos en el baño de María descubierto a 37° C. durante 16 horas.

9. Lea las reacciones en la forma descrita en "Lectura e Informe" (página 35).

10. Informe los resultados en términos de la mayor dilución de suero que produce una reacción positiva, como positivo a la dilución 1:8, a la dilución 1:16, etc.

Preparación del Indicador
Solución madre de Polvo de Corazón de Res

Se emplea un extracto alcohólico colesterolizado de corazón deshidratado de res ([2]).

1. Pese 100 grms. de polvo de corazón de res y colóquelos en un frasco de Erlenmeyer de un litro con tapón de cristal.

2. Añada 400 c.c. de éter anestésico puro y agítelo bien a mano durante 10 minutos.

3. Deje asentar y vierta el éter a través de un papel filtro desechando esta extracción etérea y las siguientes.

4. Separe el polvo húmedo del papel filtro y colóquelo nuevamente en el frasco original.

Nota: No deje secar la porción principal de tejido extractado entre las extracciones.

5. Añada 400 c.c. de éter anestésico al polvo húmedo y repita las extracciones en la misma forma.

6. Repita las extracciones etéreas hasta un total de 5 veces.

7. Saque el polvo del frasco y séquelo a temperatura ambiente hasta que quede exento de éter y péselo.

---

(2) **Puede obtenerse en los Laboratorios Difco, Detroit, Mich.**

8. Coloque el polvo seco en un frasco con tapón de cristal y añada alcohol etílico de 95% (5 c.c. de alcohol para cada gramo de polvo).

9. Extraiga durante 3 días a temperatura ambiente, agitando el contenido del frasco vigorosamente a mano tres veces cada día.

10. Filtre el extracto alcohólico a través de papel exento de grasa a un frasco con tapón de cristal.

11. Añada 0.4 grms. de colesterol (De Merck Q. P.) para cada 100 c.c. de extracto alcohólico.

12. Caliente el extracto alcohólico colesterolizado en el baño de María a 37° C. hasta que el colesterol se haya disuelto. Esta solución es denominada indicador solución madre y deberá ser guardada a temperatura ambiente.

13. El indicador solución madre deberá ser analizado frente a un indicador hallado satisfactorio por determinación y serológica.

Nota: Ocasionalmente es necesario el ajuste de la concentración lipoidea para la preparación de un indicador solución madre satisfactorio. Se ha descrito un procedimiento en el que la concentración lipoidea puede ser cambiada de acuerdo con las necesidades (1).

REACCIONES CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS CON INDICADOR CARDIOLIPINA-LECITINA

1. Se preparará el indicador glicerinado del indicador solución madre conteniendo cardiolipina y lecitina purificada, en la misma forma descrita para el indicador solución madre hecho con polvo de corazón de res.

2. Se practican los análisis y los resultados son leídos e informados en la forma descrita para el indicador regular de Hinton.

Preparación del Indicador Solución Madre de Cardiolipina y Lecitina

El indicador para las reacciones de Hinton puede ser preparado de soluciones alcohólicas de cardiolipina, lecitina y colesterol. Se ha dicho (2) que los mejores resultados se obtuvieron con un indicador conteniendo 0.7 c. c. de solución de cardiolipina (8.92 mg. por c. c.) 1.0 c. c. de solución de lecitina (30.91 mg. por c. c.) y 2.5 c. c. de solución de colesterol (4.0 mg. por c.c.).

Recientemente recibimos el siguiente enunciado del doctor W. Hinton:

"Los indicadores solución madre Hinton han sido preparados con cardiolipina y lecitina fabricada de acuerdo con las direcciones de Pangborn y las reacciones practi-

cadas con estos indicadores han sido más exactas hasta la fecha que las practicadas con indicadores hechos con extractos de corazón de res. Nuestra experiencia ha estado confinada al uso de tres lotes de cardiolipina-lecitina preparada en el Laboratorio de la doctora Pangborn y un lote preparado en un Laboratorio comercial. Hasta que se puedan obtener comercialmente la cardiolipina y lecitina de concentración y potencia especificadas, será posible dar una descripción breve de la forma de ajustar las cantidades de estas substancias para obtener resultados óptimos".

REACCIONES DAVIES-HINTON

Reacción de Floculación Davies-Hinton para líquido Cefalorraquídeo

Reactivos

1. Indicador glicerinado de Hinton (Véa "Preparación del Indicador Glicerinado de Hinton", página 34).

2. Solución de cloruro de sodio al 0.85%:

   a) (Véa "Reactivos para las Reacciones de Hinton" página 33).

3. Solución de cloruro de sodio al 3.0%.

Añada la cantidad necesitada (3 gramos para cada 100 c.c.) de cloruro de sodio seco al agua recientemente destilada. Esta solución debe ser preparada el día en que sea usada.

4. Suero humano negativo de Hinton:

   a) Seleccione uno o más sueros francamente negativos a la reacción de Hinton y vuélvalos a analizar de acuerdo con la técnica de "Reacción Rápida de Hinton con Suero", (página 36), empleando las dos cantidades siguientes:

      Tubo Nº 1: 0.5 c.c. de suero y 0.5 c.c. de indicador glicerinado de Hinton.

      Tubo Nº 2: 0.1 c.c. de suero y 0.5 c.c. de indicador glicerinado de Hinton.

Nota: Cuando se analiza un gran número de líquidos cefalorraquídeos es conveniente reunir, filtrar a través de filtros Seitz y mertiolizar (1:10.000) los sueros y practicar reacciones rápidas de Hinton en forma antes descrita. Guarde los sueros analizados de 8° a 10° C. durante no más de tres semanas. Evite el uso de sueros turbios.

5. Solución de goma de acacia al 20%.

a) Coloque 20 gramos de goma de acacia en polvo blanco (U. S. P.) en un frasco de 4 onzas (3)

b) Añada 100 c.c. de solución de sal al 3%.

c) Coloque el tapón de baquelita sobre el frasco (no atornille el tapón).

d) Coloque el frasco en el autoclave y caliéntelo a 15 libras de presión durante 15 minutos.

e) Retire los frascos del autoclave, atornille bien el tapón, agítelos bien para completar la solución de acacia y manténgalos en condiciones estériles.

Reacción Preliminar de Suero Negativo Hinton y Solución de Goma de Acacia

1. Mezcle 5 c.c. de suero negativo Hinton con 5 c.c. de solución de goma de acacia al 20% para cada 10 líquidos cefalorraquídeos que deban ser analizados.

2. Practique una reacción rápida en la siguiente forma:

   a. Pipetée 0.6 c.c. de solución de cloruro de sodio al 0.85% en un tubo de ensayo (100 x 11¼ mm. D. E.), añada 0.2 c.c. de mezcla recientemente hecha de acacia-suero y 0.2 c.c. de indicador glicerinado de Hinton y mezcle bien por agitación.

   b. Coloque el tubo en el baño de María a 37° C durante 30 minutos.

   c. Centrifugue el tubo a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos.

   d. Una mezcla satisfactoria de suero-acacia da una reacción negativa.

Preparación del Líquido Cefalorraquídeo

Centrifugue y decante el líquido cefalorraquídeo. Los líquidos visiblemente contaminados con bacterias no son satisfactorios para el análisis. Un líquido cefalorraquídeo sanguinolento puede ser analizado después de haber sido aclarado por centrifugación, pero deberá ser informado como no satisfactorio para el análisis si se observa una reacción positiva.

---

(3) Son satisfactorios los frascos de cristal con tapón de rosca de baquelita y recubiertos de vinylite.

Reacción de Floculación con Líquido Cefalorraquídeo

1. Prepare en una gradilla 4 tubos de ensayo (100 x 11-1/4 mm. D.E). uno detrás de otro, para cada líquido cefalorraquídeo que deba ser analizado y para controles de líquidos cefalorraquídeos positivo y negativo. Número los tubos de modo que correspondan a los números de indentificación de cada líquido.

2. Pipetée 0.6 c.c. de cada líquido cefalorraquídeo al tubo numerado correspondiente a la primera hilera, 0.4 c.c. al tubo de la segunda hilera, 0.2 c.c. al tubo de la tercera hilera y 0.1 c.c. al tubo de la última hilera.

3. Añada 0.2 c.c. de suero-acacia a cada tubo.

4. Añada 0.2 c.c. de indicador glicerinado de Hinton a cada tubo.

5. Agite vigorosamente las gradillas de tubos hasta que su contenido se vuelva completamente homogéneo.

6. Coloque las gradillas de tubos en el baño de María a 37° C. durante 16 horas.

7. Retire todos los tubos del baño de María y centrifugue a 2.000 r. p.m. durante 5 minutos.

Lectura e Informe

1. Retire suavemente los tubos de la centrífuga sin agitar su contenido.

2. Ante una luz artificial adecuada (véa "Lectura e Informe" de las pruebas de Hinton, página 35), golpée suavemente el tubo en su base mientras lo sostiene por su extremo superior.

3. Informe como positivos todos los líquidos cefalorraquídeos que muestren flóculos claros dispersándose del menisco hacia abajo en cualquiera de los cuatro tubos.

4. Vuelva a centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos todos los otros tubos.

5. Retire los tubos de la centrífuga y vuelva a examinarlos golpeándolos en la forma antes descrita.

6. Informe en la siguiente forma:

Positiva.....	**Flóculos claros dispersados hacia abajo del menisco en uno o más de los cuatro tubos.**
Dudosa.....	**Floculación discutible en cualquier tubo.**
Negativa.....	**Ausencia de floculación y aspecto de vidrio molido en todos los tubos.**

REACCION DE MICRO-FLOCULACION DE DAVIES-HINTON

Equipo y Cristalería

Equipo General:

1. Tapones de hule (1).
2. Bulbos de hule para pipeta capilar.

Cristalería:

1. Tubos de cristal de diámetro interior 80 x 2.5 mm.
2. Pipeta capilar (10 x 1 cm. diámetro, con pipeta capilar de 1 mm. de diámetro aproximadamente).

Preparación del Suero

1. Colecte la sangre en tubos de vidrio (80 x 2.5 mm.).

2. Quite el tapón de un extremo del tubo y utilice un alambre para separar el coágulo de las paredes del tubo.

3. Coloque el tubo de colección de sangre tapado en un tubo de ensayo rotulado, de 13 x 100 mm. y centrifugue a alta velocidad durante 10 minutos. En el caso en que el suero no esté bien separado vuelva a centrifugar.

4. Añada agua a los tubos de ensayo de 13 x 100 mm. conteniendo los tubos de colección de sangre tapados (con el coágulo hacia abajo) y colóquelos en el baño de María a 56° C durante 30 minutos.

5. Retire los tubos del baño de María y deseche el agua de los tubos de ensayo.

6. Retire el tapón del extremo en el que está el suero en el tubo de colección y marque el tubo inmediatamente arriba de la unión del suero y el coágulo, con una lima para vidrio.

7. Sostenga horizontalmente el tubo de colección, rómpalo y deseche la parte del tubo que contiene el coágulo.

Procedimientos de la Reacción

1. Pase cada suero a dos tubos de colección (80 x 2.5 mm.) de vidrio. Un tubo deberá contener una columna de suero de 2.5 cms. de largo y el otro una columna de 0.5 cms. a 1.0 cm. de largo.

2. Añada al tubo que contiene la columna de 2.5 c.c. una cantidad de indicador glicerinado de Hinton igual a la cantidad de suero en el tu-

(1) Tapón de vial número 3 del catálogo N° 68 de West Co., 1,117 Shakamaxon St., Philadelphia, Penna.

bo. Use una pipeta capilar para el indicador. Deberá tenerse cuidado de que el aire no separe el suero del indicador.

3. Añada una cantidad de indicador glicerinado de Hinton igual a cinco veces aproximadamente la cantidad de suero contenido en el segundo tubo (columna de suero de 0.5 cm. a 1.0 cm.).

4. Mezcle el suero y el indicador de Hinton en cada tubo, inclinando el tubo hacia los extremos alternadamente 10 veces.

5. Tape ambos extremos de los dos tubos de colección y colóquelos en los tubos de ensayo (13 x 100 mm.) numerados en forma idéntica.

6. Llene con agua los tubos de ensayo conteniendo los tubos de colección tapados y colóquelos en el baño de María a 37° C. durante 16 horas.

7. Retire los tubos del baño de María, vacíe el agua de los tubos de ensayo y centrifugue los tubos de ensayo conteniendo los tubos de colección tapados, durante 5 minutos a 2.000 r.p.m. aproximadamente.

Lectura e Informe

1. Lea los resultados con el objetivo de bajo poder del microscopio y sólo la luz suficiente para que los agregados en el menisco sean fácilmente visibles. La platina del microscopio deberá ser inclinada a 30° aproximadamente de la línea horizontal y el tubo deberá ser colocado bajo la lente con el menisco hacia arriba.

2. Observe el grado de floculación, en caso de haberla, en el menisco e informe los resultados en la siguiente forma:

Positiva ..... Grumos bien definidos, discretos y compactos en el menisco en cualquiera de los tubos. (El golpeo suave del tubo puede ayudar a que los grumos floten a la vista).

Negativa ..... No hay grumos visibles en ningún tubo. Las partículas granulares, turbias y amorfas en el menisco también son interpretadas como negativas.

Dudosa ..... Algunos pequeños grumos en el menisco de cualquier tubo. En estos casos los grumos deberán ser redispersados golpeando el tubo con el dedo y el tubo será nuevamente centrifugado durante 3 minutos. La reacción es informada dudosa si se ven nuevamente pequeños grumos en el menisco, pero si los grumos son grandes y compactos en cualquiera de los tubos será informada como positiva.

Bibliografía

1. Harris, Ad; Rosenberg, A. A.; Bossak, H. N.: Standaridization of Hinton indicator. Ven. Dis. Inform., 23.263-265, July 1942.
2. Stuart, G. O.; Grant, J. F.; Hinton, W. A.: A note on the use of cardiolipin in the preparation of indicator (atingen) for the Hinton test. J. Ven. Dis. Inform., 29:27, Jan. 1948.

REACCIONES DE KAHN

Equipo y Cristalería

Equipo General

1. Gradillas de Kahn.

2. Gradillas para viales de antígeno.

3. Máquina agitadora de Kahn (275-285 oscilaciones por minuto con amplitud de 1½ pulgadas)

4. Espejo de microscopio.

5. Lámpara fluorescente (ajustable).

6. Lámpara tipo cuello de ganso con bombilla azul opaca.

Cristalería

1. Tubos de Kahn con diámetro exterior de 75 x 12 mm.

2. Pipetas de Kahn para medir cantidades de 0.25 c.c. de suspensión de antígeno graduadas en 0.0125 c.c.

3. Pipetas de 1.0 c.c., graduadas en 0.01 c.c.

4. Viales de Kahn para la suspensión de antígeno de fondo plano y con un diámetro interior de 55 x 15 mm.

Reactivos

1. Antígeno estándar de Kahn. (Ver "Preparación del Antígeno Estándar de Kahn, página 66):

   a. El antígeno debe guardarse a la temperatura ambiente en la oscuridad. El frasco de antígeno que se usa diariamente debe de guardarse en envase de cartón para evitar que sea expuesto a la luz.

   b. El antígeno no deberá ponerse en contacto con tapones de hule o corcho porque ambos contienen elementos solubles en alcohol los cuales afectan su especificidad. Dichos tapones deberán ser cubiertos con papel de estaño de primera calidad o vinylite.

   c. Pueden registrarse cambios en el antígeno debido al envejecimiento de éste, los cuales generalmente se reflejan en reacciones de apariencia negativa. Si estas reacciones llegaran a ser

demasiado claras o demasiado turbias, el antígeno deberá ser titulado y estandarizado nuevamente.

2. Antígeno sensibilizado de Kahn, (Véase "preparación del antígeno sensibilizado de Kahn, página 55).

3. Solución salina:

a. Pese 9.0 grms. de cloruro de sodio seco químicamente puro (calidad reactivo) para cada litro de solución salina. El cloruro de sodio deberá ser pesado y distribuído en tubos bien tapados para evitar pesarlo a diario.

b. Disuelva el cloruro de sodio en agua destilada fresca y agite la solución perfectamente para asegurar una mezcla completa. Filtre y guarde en frascos bien tapados.

Preparaciones de Sueros

1. Separe el suero de los coágulos por medio de centrifugación y pipetée o decante el suero sobrenadante.

2. Caliente los sueros en el baño de María a una temperatura de 56° C. durante 30 minutos. Después de sacar los sueros del baño de María se dejan a temperatura ambiente por lo menos diez minutos, de manera que las muestras vuelvan a la temperatura ambiente antes de ser analizadas.

Cuando se necesite repetir la prueba de los sueros, éstos deberán calentarse nuevamente por diez minutos, si dicha repetición se lleva a cabo dentro de las 2 a las 24 horas del período inicial del calentamiento y 15 minutos si se hace después de las 24 horas.

3. Centrifugue nuevamente cualquier muestra en la cual se hayan formado precipitados visibles durante el período del calentamiento.

Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn con Suero

1. Prepare los tubos en gradillas estándar de Kahn, de modo que haya tres tubos para cada suero que se vaya a analizar, incluyendo controles de suero positivo, suero negativo y salina. Numere la primera fila de tubos con los números que corresponden a los sueros que se estén analizando.

2. Prepare la suspensión de antígeno estándar en la siguiente forma:

a. Mida en un vial de suspensión de antígeno la cantidad de solución salina de acuerdo con el título, requerida para una cantidad de antígeno.

Nota: El título en el frasco de antígeno indicará la cantidad de solución salina que debe ser mezclada con 1.0 c.c. de antígeno para obtener una suspensión de reactividad estándar. Generalmente 1 c.c. de antígeno da suficiente suspensión para veinte análisis. No deberá medirse en un solo vial menos de 1 c.c. ni más de 2 c.c. de antígeno.

b. Mida en un segundo vial de suspensión la cantidad requerida de antígeno.

c. Vierta la solución salina sobre el antígeno y, sin dilación, pase el contenido de un vial al otro 12 veces, evitando derramar el contenido al hacer la mezcla.

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

3. Coloque el dedo pulgar sobre la boca del vial y agítelo suavemente para suspender las partículas de antígeno.

4. Pipetée 0.05 c.c. de suspensión de antígeno, directamente al fondo de cada tubo de la fila de enfrente de la gradilla, empleando una pipeta de antígeno de Kahn.

5. Pipetée 0.025 c.c. de suspensión de antígeno directamente al fondo de cada tubo de la fila de en medio de la gradilla, empleando una pipeta de Kahn.

6. Pipetée 0.0125 c.c. de suspensión de antígeno directamente al fondo de cada tubo de la fila de atrás en la gradilla, empleando una pipeta de Kahn.

7. Agregue 0.15 c.c. de cada suero a los tres tubos de la serie correspondiente, conteniendo las cantidades de 0.05 c.c., y 0.025 c.c. y 0.0125 c.c. de suspensión de antígeno respectivamente.

Nota: Complete la adición de suspensión de antígeno y sueros de una gradilla antes de añadir la suspensión de antígeno y sueros a otra gradilla.

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

9. Deje reposar la mezcla de suero-antígeno a temperatura ambiente de 3 a 7 minutos.

10. Agite la gradilla de tubos durante 3 minutos en la máquina agitadora de Kahn.

11. Saque la gradilla de la máquina agitadora. Agregue 1.0 c.c. de solución salina a cada uno de los tubos de la fila de enfrente y 0.5 c.c. a cada tubo en las otras 2 filas.

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

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

13. Lea cada tubo de la gradilla inmediatamente después de haberle agregado la solución salina. (Véa "Lectura de los Resultados" e "Informe de los Resultados", página 49).

14. Repita la lectura de cada tubo, 15 minutos después de haber hecho la primera, cuando no se hayan obtenido reacciones negativas en la primera lectura.

Cuadro 1.—*Descripción de la Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn con Suero*

	Tubo 1 (frente)	Tubo 2 (medio)	Tubo 3 (atrás)
Proporciones entre suero y suspensión de antígeno.	3:1	6:1	12.1
Suspensión de antígeno, c.c.	0.05	0.025	0.0125
Suero c.c.	0.15	0.15	0.15
Agite a mano durante 10 segundos.			
Deje reposar de 3 a 7 minutos.			
Agite durante 3 minutos en la agitadora de Kahn:			
Solución salina, c.c.	1.0	0.5	0.5
Agite suficientemente para mezclar los ingredientes, y examine por si hay presencia o ausencia de precipitados.			

Lectura de los Resultados

Métodos de Lectura usando la Luz de una Ventana:

1. Tenga una sola fuente de luz que venga de una sola ventana, directamente enfrente del lector.

2. Cubra la parte superior y la inferior de la ventana, reduciendo la entrada de luz a una franja angosta.

3. **Evite otras fuentes de luz en el cuarto.**

4. Sostenga la gradilla frente a la parte descubierta de la ventana.

5. Diferencie las reacciones positivas y negativas por la clara opalescencia de los negativos y la turbidez u opacidad de los positivos y en el caso de los positivos fuertes, por la presencia de flóculos.

6. Examine cada tubo que muestre cualquier grado de turbidez u opacidad levantándolo varias pulgadas arriba del nivel de los ojos e inclinándolo hasta una posición casi horizontal para extender el líquido en una capa delgada.

7. Observe el tamaño y número de los flóculos visibles.

Método de Lectura Usando el Espejo de Microscopio (Recomendado)

1. El espejo se coloca en la mesa de la lectura, con la superficie cóncava hacia arriba.

2. Ajuste la lámpara de lectura (bombilla de luz de día o tubo fluorescente) arriba del espejo de manera que la imagen de la bombilla no sea visible en el espejo, pero en tal forma que el tubo pueda ser sostenido dentro del cono de luz.

3. Coloque cada tubo que se va a leer en una posición inclinada de manera que la porción baja del tubo quede de 1 a 2 pulgadas sobre el espejo.

4. Véa la imagen del contenido del tubo en el espejo y anote el grado de floculación.

Interpretación de los Resultados

Anote el grado de floculación en la siguiente forma:

4+.....Flóculos relativamente grandes suspendidos en un medio claro.

3+.....Flóculos de tamaño mediano, suspendidos en un medio claro o ligeramente opalescente.

2+.....Flóculos finos fácilmente distinguibles en un medio ligeramente opalescente.

1+.....Flóculos muy finos distinguibles en un medio ligeramente opalescente.

±.....Flóculos extremadamente finos apenas distinguibles en un medio (ligeramente opalescente).

Negativo....Un medio opalescente, libre de partículas visibles.

Informe de los Resultados

1. Informe los resultados de las pruebas, como positivo, dudoso, o negativo, como se muestra en los siguientes cuadros:

2. En todas las reacciones en donde el mayor grado de floculación es producido por la cantidad más pequeña de suspensión de antígeno, (2º y 3º tubos) puede usar el siguiente cuadro para informar:

Suma de cruces en las lecturas de 6 tubos (1)	*Reporte*
22 a 24	Positivo (4+)
16 a 21	Positivo (3+)
10 a 15	Positivo (2+)
5 a 9	Dudoso (1+)
4	Dudoso (±)
3 o menos	Negativo.

(1) Las lecturas de ± son descartadas.

3. La forma de informar otros tipos de reacciones, se describe en los cuadros 2 a 8.

Cuadro 2.—*Tipos de Reacciones Informadas "Positivas (+ + + +)"*

Suero Nº	Primera Lectura			Segunda Lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1	++++	++++	+++	++++	++++	+++
2	++++	++++	++	++++	++++	++
3	++++	++++	+	++++	++++	+
4	++++	++++	—	++++	++++	—

Cuadro 3.—*Tipos de Reacciones Informadas "Positivas (+ + + +)" cuando las Pruebas Suplementarias 1 ó 2 son positivas.*

Suero Nº	Primera Lectura			Segunda Lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1	++++	+++	+++	+++	+++	+++
2	++++	+++	++	++++	+++	++
3	++++	+++	—	++++	+++	—
4	++++	+	—	++++	—	—
5	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6	++	++	++	++	++	++
7	++	—	—	++	—	—
8	+	+	+	+	+	+
9	+	—	—	+	—	—
10	±	±	±	±	±	±
11	±	—	—	±	—	—

Cuadro 4.—*Tipos de Reacciones Informadas "Positivas (+ + +)" cuando las pruebas Suplementarias 1 y 2 son negativas.*

Nº Suero	Primera Lectura			Segunda Lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1	++++	+++	+++	+++	+++	+++
2	++++	+++	++	++++	+++	++
3	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Cuadro 5.—*Tipos de Reacciones Informadas "Positivas (+ +)" cuando las pruebas Suplementarias 1 y 2 son negativas.*

Suero Nº	Primera Lectura			Segunda Lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1	++++	++	++	+++	++	++
2	++++	+	+	++++	+	+
3	++++	+++	±	++++	+++	±
4	+++	+++	++	+++	+++	—

Cuadro 6.—*Tipos de Reacciones Informadas "Dudosas (+)" cuando las pruebas Suplementarias 1 y 2 son negativas.*

Suero Nº	Primera Lectura			Segunda Lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1	++++	+	±	+++	+	±
2	+++	++	±	+++	—	—
3	+++	±	—	+++	±	—
4	++	++	++	++	++	++

Cuadro 7.—*Tipos de Reacciones Informadas "Dudosas (±)" cuando las pruebas Suplementarias 1 y 2 son negativas.*

Suero Nº	Primera Lectura			Segunda Lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1	++	++	+	++	++	±
2	++	++	—	++	+	—
3	++	+	—	++	+	—

Cuadro 8.—*Tipos de Reacciones Informadas "Negativas" cuando las pruebas Suplementarias 1 y 2 son negativas.*

Suero Nº	Primera Lectura			Segunda Lectura		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1	++	±	±	++	±	±
2	++	±	±	++	—	—
3	++	±	—	++	—	—
4	++	—	—	++	—	—
5	+	+	±	+	±	±
6	+	±	±	+	—	—
7	±	±	±	±	—	—
8	±	—	—	±	—	—

REACCIONES SUPLEMENTARIAS DE KAHN CON SUERO

Reacción Suplementaria Nº 1

1. Pipetée 0.025 c.c. de la suspensión de antígeno (véa "Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn con Suero", párrafo 2 página 46) en el fondo de cada uno de dos tubos (numerados 1 y 2).

2. Agregue 0.025 c.c. de suero (previamente calentado) al tubo Nº 1 y 0.05 c.c. de suero al tubo Nº 2.

3. Agite la gradilla a mano durante 10 segundos para mezclar el contenido de los tubos. Déjelos reposar de 3 a 7 minutos.

4. Agite la gradilla en la agitadora de Kahn durante 3 minutos.

5. Quite la gradilla de la agitadora, agregue 0.3 c.c. de solución salina a cada tubo y agítela para mezclar.

6. Léa inmediatamente como se describe en "Lectura de los Resultados", página 48. Una reacción de 2+, 3+ ó 4+ en cualquier tubo es considerada como una reacción positiva.

Reacción Suplementaria Nº 2

1. Prepare diluciones de suero al 1:5, 1:10 y 1:20 de la siguiente manera:

   a. Pipetée dentro de 3 tubos (numerados 1, 2 y 3) 0.8, 0.5 y 0.5 c.c. de solución salina, respectivamente.

   b. Agregue 0.2 c.c. de suero al tubo 1 y mezcle.

c. Pase 0.5 c.c. del tubo 1 al tubo 2 y mezcle.
d. Pase 0.5 c.c. del tubo 2 al tubo 3 y mezcle.

2. Pipetée 0.01 c.c. de la suspensión de antígeno (Véa "Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn con Suero", párrafo 2, página 46), en el fondo de 3 tubos de Kahn (numerados 1, 2 y 3).

3. Añada 0.15 c.c. de las diluciones de suero al 1:5, 1:10, 1:20 a los tubos 1, 2 y 3, respectivamente.

4. Agite la gradilla a mano durante 10 segundos para mezclar el contenido de los tubos. Deje reposar de 3 a 7 minutos.

5. Agite la gradilla en la agitadora de Kahn durante 3 minutos.

6. Quite la gradilla de la agitadora, añada 0.5 c.c. de solución salina a cada tubo, y agite para mezclar.

7. Lea inmediatamente como se describe en "Lectura de los Resultados", página 48. Una reacción de 2+, 3+, ó 4+ en cualquiera de los 3 tubos es considerada como una reacción positiva.

Sistema de Control para la Reacción Estándar de Kahn

1. Los controles de suero postivo, suero negativo y solución salina deberán ser probados con cada suspensión de antígeno.

2. Los resultados obtenidos con sueros o líquidos cefalorraquídeos no deben ser informados si las reacciones típicamente positivas y negativas no han sido producidas por los tres líquidos controles. El fracaso para obtener reacciones negativas con suero negativo y solución salina o reacciones positivas con suero positivo de control puede ser causado por: (1) la solución salina impropiamente preparada, (2) el antígeno no satisfactorio, (3) suspensión de antígeno preparada incorrectamente, o (4) el uso de una suspensión de antígeno que ha sido preparada más de 30 minutos antes. Lo ideal sería que las pruebas de control fueran incluídas al final de cada serie de análisis.

Reacción Cuantitativa de Kahn con Suero

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

a) Pipetée dentro de cada uno de 6 (o más) tubos, 0.5 c.c. de solución salina al 0.9 por ciento.

b) Añada 0.5 c.c. del suero calentado al primer tubo y mezcle.

c) Pase 0.5 c.c. del primer tubo al segundo y mezcle.

d) Continúe pasando y mezclando de un tubo al siguiente hasta que se hayan hecho todas las diluciones. Deje la pipeta con que se mezcla dentro del último tubo.

Nota: Las diluciones de suero deben ser empleadas en la prueba inmediatamente después de haber sido preparadas.

2. Prepare la suspensión de antígeno como se describe previamente, mezclando antígeno estandar de Kahn con solución salina al 0.9 por ciento.

3. Después que la suspensión de antígeno ha reposado 10 minutos (pero no más de 30 minutos), coloque el pulgar en la boca del vial conteniendo la suspensión y agítelo suavemente para obtener una suspensión homogénea de partículas de antígeno.

4. Pipetée 0.01 c.c. de la suspensión de antígeno en el fondo de 6 (o más) tubos de Kahn numerados.

5. Añada 0.15 c.c. de la dilución de suero al 1:64 a la suspensión de antígeno contenida en el tubo 6.

6. Añada 0.15 c.c. de la dilución de suero al 1:32 a la suspensión de antígeno contenida en el tubo 5.

7. Continúe añadiendo 0.15 c.c. de las diluciones decrecientes del suero a los tubos 4, 3, 2 y 1 respectivamente.

8. Agite la gradilla a mano durante 10 segundos y déjela reposar de 3 a 7 minutos.

9. Agite la gradilla en la agitadora mecánica durante 3 minutos.

10. Quite la gradilla de la agitadora, y añada 0.5 c.c. de la solución salina al 0.9 por ciento a cada tubo.

Nota: Añada la solución salina a una gradilla y termine la lectura antes de añadirla a otra.

11. Agite la gradilla a mano durante unos segundos para mezclar el contenido de los tubos.

12. Lea cada tubo en la gradilla inmediatamente después de haber añadido la solución salina al 0.9 por ciento.

13. Anote la titulación del punto final, esto es, la dilución mayor del suero en la cual las reacciones de 4+, 3+ ó 2+ son observadas.

14. Calcule el título cuantitativo aplicando la fórmula $S = 4D$, en la cual S es la potencia del suero en términos de unidades de Kahn y D es la mayor dilución que muestra floculación definida.

EJEMPLOS:

a. La mayor dilución que muestra floculación definida es 1:64
$S = 4 \times 64$ ó 256 unidades de Kahn.

b. La mayor dilución que muestra floculación definida es 1:16

$S = 4 \times 16$ ó 64 unidades de Kahn.

15. Los informes de 3 unidades, 2 unidades y 1 unidad son dados como resultados de la prueba cuantitativa cuando sólo reacciones negativas son obtenidas por el procedimiento cuantitativo, en sueros que producen reacciones de 3+, 2+ ó 1+, respectivamente, en la prueba cualitativa de Kahn.

Nota: Ha sido la práctica de los laboratorios del Servicio de Sanidad Pública de los Estados Unidos hacer pruebas cuantitativas solamente a sueros que producen reacciones de 4 + en la prueba cualitativa de Kahn.

El Dr. Kahn recomienda que se hagan pruebas cuantitativas a los sueros que producen reacciones de 3+ ó 4+ en la prueba cualitativa.

REACCION PRESUNTIVA DE KAHN CON SUERO

Ejecución de la Reacción Presuntiva de Kahn con Suero

1. Coloque tubos de Kahn en una gradilla de manera que haya un tubo para cada suero a probar, incluyendo controles de suero positivo, suero negativo y solución salina. Numere los tubos para que correspondan con los sueros que se van a analizar.

2. Prepare una suspensión de antígeno sensibilizado como sigue:

a. Mida en un vial la cantidad correcta de solución salina requerida para preparar una suspensión de antígeno sensibilizado con 1.0 c.c. de antígeno. (Ver "Método para Ajustar el Título del Antígeno Sensibilizado", página 57).

b. Mida 1.0 c.c. de antígeno sensibilizado en un vial para mezclar antígeno.

c. Vierta la solución salina sobre el antígeno y tan rápidamente como sea posible, mezcle 12 veces de un vial a otro sin esperar que se escurra el líquido.

3. Deje reposar la suspensión de antígeno durante 10 minutos antes de usarla. (Deseche la suspensión de antígeno después de pasados los 30 minutos de preparada.)

4. Coloque el pulgar en la boca del vial y agite suavemente para suspender las partículas de antígeno por igual.

5. Pipetée 0.025 c.c. de la suspensión de antígeno sensibilizado directamente en el fondo de cada tubo.

6. Añada 0.15 c.c. del suero calentado a cada tubo correspondiente.

Nota: Complete la adición de la suspensión de antígeno sensibilizado y suero a una gradilla antes de añadir suspensión sensibilizada a otra.

7. Agite la gradilla a mano durante 10 segundos.

8. Deje reposar la gradilla durante 3 minutos a temperatura ambiente.

9. Agite la gradilla de tubos durante 3 minutos en la agitadora de Kahn.

10. Saque la gradilla de la agitadora y añada 0.5 c.c. de solución salina a cada tubo.

Nota: Añada la solución salina a una gradilla y termine la lectura antes de agregar la solución salina a otra.

11. Agite la gradilla a mano unos segundos para mezclar el contenido en los tubos.

12. Lea cada tubo de la gradilla como se describe en "Lectura de los Resultados", página 48, inmediatamente después de añadirle la solución salina.

13. Informe los resultados como sigue:

INFORME DE LAS REACCIONES PRESUNTIVAS DE KAHN CON SUERO

Lectura	*Informe*
4+	Positivo
3+	Positivo
2+	Dudoso
1+	Negativo
±	Negativo
—	Negativo

REACCION PRESUNTIVA DE KAHN CON SUERO

Suspensión de antígeno sensibilizado, c.c.	0.025
Suero (calentado) c.c.	0.15
Agite la gradilla a mano durante 10 segundos.	
Deje reposar 3 minutos.	
Agite durante 3 minutos en la agitadora Kahn.	
Solución salina, c.c.	0.5

Léase inmediatamente.

Método para Ajustar el Título del Antígeno Sensibilizado

1. Prepare la suspensión de antígeno estándar de Kahn como se describe en "Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn con Suero", (página 46).

2. Prepare 3 suspensiones de antígeno sensibilizado como sigue:

   a. Mida en un vial para mezcla (marcado A) la cantidad indicada de solución salina requerida para preparar la suspensión de antígeno sensibilizado, con 1.0 c.c. de antígeno sensibilizado.

   b. Mida en un segundo vial para mezcla (marcado B) 0.05 c.c. más de la cantidad indicada de solución salina requerida para preparar la suspensión de antígeno sensibilizado con 1.0 c.c. de antígeno sensibilizado.

   c. Mida en un tercer vial para mezcla (marcado C) 0.05 c.c. menos que la cantidad indicada de solución requerida para preparar la suspensión de antígeno sensibilizado con 1.0 c.c. de antígeno sensibilizado.

   d. Mida 1.0 c.c. de antígeno sensibilizado dentro de cada uno de los tres viales marcados A, B y C, respectivamente.

   e. Vierta la solución salina del vial marcado A dentro del vial conteniendo el antígeno también marcado A, y tan rápidamente como sea posible, vierta la mezcla de uno a otro 12 veces sin dar tiempo para escurrir los viales.

   f. Haga lo mismo con los viales marcados B y C.

3. Deje reposar las suspensiones de antígeno por 10 minutos antes de usarlas. Las suspensiones de antígeno no deberán ser usadas después de haberse dejado reposar más de 30 minutos.

4. Prepare 4 juegos de tubos de Kahn, cada juego en una gradilla estándar de Kahn, y rotule los juegos S, A, B y C, respectivamente.

5. Pipetée 0.025 c.c. de la suspensión de antígeno estándar en el fondo de los tres tubos rotulados S.

6. Pipetée 0.025 c.c. de la suspensión de antígeno sensibilizado A dentro de los tubos del juego marcado A.

7. Pipetée 0.025 c.c. de las suspensiones de antígeno sensibilizado B y C, dentro de los tubos en los juegos B y C.

8. Añada 0.15 c.c. del suero control positivo calentado, a un tubo de cada juego.

9. Añada 0.15 c.c. de suero control negativo calentado, a otro tubo de cada juego.

10. Añada 0.15 c.c. de solución salina al tercer tubo de cada juego.

11. Agite la gradilla a mano durante 10 segundos.

12. Deje reposar la gradilla durante 3 minutos a la temperatura ambiente.

13. Agite la gradilla de tubos durante 3 minutos en la agitadora mecánica.

14. Saque la gradilla de la agitadora y añada 0.5 c.c. de solución salina a cada tubo.

15. Agite la gradilla a mano unos segundos para mezclar el contenido de los tubos.

16. Lea y compare los tubos de cada juego conteniendo sueros de control positivo, negativo y salino.

17. Escoja la suspensión de antígeno sensibilizado, para probar los sueros, que se ajuste a las tres siguientes condiciones:

a. El control positivo muestra floculación de la mezcla de suspensión de antígeno y suero.

b. Los controles de suero negativo y solución salina están libres de partículas o flóculos.

c. Las reacciones del suero negativo y solución salina con la suspensión de antígeno sensibilizado muestran el mismo grado de opalescencia que las reacciones del suero negativo y solución salina con la suspensión de antígeno estándar.

Nota: Cuando las suspensiones de antígeno sensibilizado producen reacciones más turbias con suero negativo y solución salina que aquellas obtenidas con las suspensiones de antígeno estándar, es necesario aumentar el título de la solución salina generalmente en cantidades de 0.05 c.c., y muy rara vez en 0.1 c.c. Cuando las suspensiones de antígeno sensibilizado producen reacciones más claras con suero negativo y solución salina que aquellas obtenidas con las suspensiones de antígeno estándar, es necesario disminuir el título de la solución salina generalmente en cantidades de 0.05 c.c., y muy raras veces en 0.1 c.c. Una suspensión de antígeno sensibilizado es satisfactoria para la ejecución de la prueba presuntiva solamente cuando las reacciones del suero negativo y solución salina con la suspensión de antígeno sensibilizado muestran el mismo grado de opales-

cencia que las reacciones del suero negativo y solución salina con la suspensión de antígeno estándar.

REACCION ESTANDAR (CUALITATIVA) DE KAHN CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO* (LCR)

Preparación de la Solución Saturada de Sulfato de Amonio

1. A 500 grms. de sulfato de amonio de calidad reactiva, añada 500 c.c. de agua bidestilada usando un matraz de Pyrex limpio de 3 a 5 litros de capacidad.

2. Ponga el contenido a hervir hasta que la solución se aclare.

3. Deje enfriar a la temperatura ambiente.

4. Filtre a través de papel.

5. Almacene en frascos con tapones de vidrio a la temperatura ambiente.

Preparación de la Solución Concentrada de Globulina de Cada LCR

1. Centrifugue y decante todos los LCR para eliminar los restos celulares y partículas.

2. Pipetée 1.5 c.c. de LCR en un tubo de Kahn.

3. Añada 1.5 c.c. de la solución saturada de sulfato de amonio al 1.5 c.c. de LCR.

4. Coloque el pulgar (protegido con dedal de hule) en la boca del tubo y agite vigorosamente para mezclar el contenido.

5. Coloque la mezcla en el baño de María a 56° C. durante 15 minutos para acelerar la precipitación de la globulina.

6. Saque el tubo del baño de María y centrifugue a 2.000 r.p.m. durante 15 minutos. (El precipitado de globulina se encontrará acumulado en el fondo del tubo.)

7. Decante y deseche el líquido sobrenadante.

8. Escurra el tubo en papel filtro durante 10 minutos y use una tira de la misma clase de papel para quitar las gotas del líquido sobrenadante que hayan quedado.

---

* (LCR) = Líquido cefalorraquídeo.

9. Añada 0.15 c.c. de solución salina al precipitado de globulina centrifugada, colocando la punta de la pipeta cerca del fondo del tubo para evitar que arrastre cualquier residuo del sulfato de amonio que haya quedado adherido a las paredes del mismo.

10. Golpee suavemente la base del tubo para volver a disolver la globulina.

Nota: Cuando la globulina no se disuelve completamente en 0.15 c.c. de solución salina, añada 0.05 c.c. más de solución salina y agite suavemente. Si todavía no se disuelve, vuelva a añadir 0.05 c.c. de solución salina. En raras ocasiones, la globulina permanecerá completamente insoluble. Entonces la solución clara de globulina es separada de la proteína insoluble por medio de centrifugación. Si por medio de centrifugación no obtuviera un líquido sobrenadante claro, agregue una pequeña cantidad de talco o caolín a la mezcla y vuelva a centrifugar el tubo. El líquido sobrenadante claro (el cual es la solución de globulina) es sacado y está entonces listo para probarse con la suspensión de antígeno.

Ejecución de la Prueba Cualitativa de Kahn con Globulina Concentrada de LCR

1. Coloque tubos de Kahn en una gradilla de tal manera que haya un tubo para cada LCR concentrado que se vaya a probar, incluyendo controles de LCR positivo y negativo y de solución salina. Numere los tubos para que correspondan con los LCR que se están probando.

2. Prepare la suspensión de antígeno estándar como se describe en "Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn con Suero", página 46).

3. Coloque el pulgar en la boca del frasco y agite suavemente para suspender las partículas de antígeno.

4. Pipetée 0.01 c.c. de la suspensión de antígeno estándar directamente en el fondo del tubo.

5. Añada 0.15 c.c. de la globulina concentrada del LCR a cada tubo correspondiente.

Nota: Complete la adición de la suspensión de antígeno y de la globulina concentrada a una gradilla antes de agregar suspensión de antígeno y globulina concentrada a otra.

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

7. Agite la gradilla de tubos durante 4 minutos en la agitadora mecánica.

8. Saque la gradilla de la agitadora y añada 0.5 c.c. de solución salina a cada tubo.

Nota: Añada la solución salina a una gradilla y termine la lectura antes de añadirla a otra.

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

10. Lea cada tubo de la gradilla inmediatamente después de la adición de la solución salina, usando un espejo de microscopio como se describe en "Lectura de los Resultados", (página 48).

11. Informe de acuerdo con el cuadro 9.

Cuadro 9.—*Forma de Informar los Análisis Estándar y Presuntivas de Kahn con LCR*

Lectura	*Prueba Estándar*	*Prueba Presuntiva*
4+	Positiva (4+)	Positiva
3+	Positiva (3+)	Positiva
2+	Positiva (2+)	Dudosa
1+	Dudosa (1+)	Negativa
±	Negativa	Negativa
—	Negativa	Negativa

REACCIÓN ESTÁNDAR (CUALITATIVA) DE KAHN CON LCR

Suspensión de Antígeno, c.c. 0.01
Globulina concentrada del LCR c.c. 0.15
Agite la gradilla a mano durante 10 segundos.
Agite durante 4 minutos en la agitadora de Kahn.
Solución Salina, c.c. 0.5
Lea inmediatamente.

REACCION CUANTITATIVA DE KAHN CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

Las reacciones cuantitativas del líquido cefalorraquídeo son practicadas en los líquidos cefalorraquídeos que producen reacciones positivas en la reacción cualitativa de Kahn.

1. Prepare diluciones de líquido cefalorraquídeo en la forma indicada en el cuadro siguiente:

Cuadro Nº 10

Tubo	Cantidad de Líquido Cefalorraquídeo (c.c.)	Cantidad de Solución Salina (c.c.)	Dilución Designada
1	Cantidad utilizable	Ninguna	(¹) 1:10
2	0.2	0.1	1:15
3	0.2	0.2	1:20
4	0.1	0.2	1:30
5	0.1	0.3	1:40
6	0.1	0.4	1:50

(1) El líquido cefalorraquídeo total es considerado a la dilución 1:10 ya que el análisis cualitativo es practicado en globulina del líquido céfalorraquídeo concentrada 10 veces.

2. Prepare una suspensión estandarizada de antígeno en la forma descrita en "Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn con Suero" (página 46).

3. Coloque el pulgar sobre la boca del frasco de mezcla y agite suavemente para suspender las partículas del antígeno.

4. Pipetée 0.01 c.c. de la suspensión de antígeno directamente en el fondo de un tubo de ensayo de Kahn. Un tubo se necesita para cada dilución del líquido cefalorraquídeo en análisis.

5. Añada 0.15 c.c. de líquido cefalorraquídeo diluído a cada tubo, principiando con el de mayor dilución.

6. Agite la gradilla a mano durante 10 segundos.

7. Agite la gradilla en un agitador de Kahn durante 4 minutos.

8. Saque la gradilla del agitador, añada 0.5 c.c. de solución salina a cada tubo y lea inmediatamente.

9. Anote la dilución más alta del líquido cefalorraquídeo que da una reacción positiva (4+, 3+ ó 2+).

10. Calcule las unidades Kahn de acuerdo con la fórmula S = 4D, en donde S es la potencia del líquido cefalorraquídeo en términos de unidades Kahn y D es la dilución más alta que muestra floculación definida.

EJEMPLO:

(*a*) Líquido cefalorraquídeo positivo a dilución 1:10 (designado).
10 × 4 = 40 unidades Kahn.

(*b*) Líquido cefalorraquídeo positivo a la dilución 1:40 (designado).
40 × 4 = 160 unidades Kahn.

11. Vuelva a analizar los líquidos cefalorraquídeos que producen reacciones negativas en las diluciones designadas, en la siguiente forma:

a. Prepare un concentrado de globulina de líquido cefalorraquídeo en la forma descrita en "Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn con Líquido Cefalorraquídeo" (página 59).

b. Añada una cantidad suficiente de solución salina a la solución de globulina para hacer una dilución al 1:5 (0.15 c.c. de solución de globulina más 0.6 c.c. de solución salina.

c. Practique un análisis en un tubo en la forma prescrita para analizar las diluciones del líquido cefalorraquídeo.

d. Si esta dilución al 1:5 da una reacción positiva, el título cuantitativo es de 20 unidades Kahn; si da una reacción negativa el título es equivalente a la lectura obtenida con la solución de globulina no diluída.

REACCIONES ESTANDAR Y MICROFLOCULACION DE KAHN CON ANTIGENO DE CARDIOLIPINA

Preparación del Antígeno de Cardiolipina

Nota: El antígeno de cardiolipina para las reacciones de Kahn consiste en cardiolipina (0.1%), lecitina purificada (1.0%) y colesterol (0.025%) en alcohol absoluto. Esa fórmula puede no ser exactamente aplicable a todos los lotes de lecitina y de cardiolipina, pero proporciona una base utilizable de la cual pequeñas variaciones en la proporción de lecitina a cardiolipina serán suficientes para volver a diferentes lotes de estos reactivos, en antígenos adecuados.

Antígeno de Cardiolipina en la Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn con Suero

Nota: Estas reacciones deberán ser llevadas a cabo en paralelo con reacciones duplicadas usando antígeno estándar de Kahn (5).

1. Coloque tubos de ensayo en gradillas de Kahn de modo que haya 3 tubos para cada suero que vaya a ser analizado, incluyendo controles de suero positivo, suero negativo y solución salina. Numere la primera fila de tubos, para que corresponda a los sueros en análisis, usando un lápiz graso coloreado diferente al usado para numerar los tubos para las reacciones con antígeno estándar de Kahn.

2. Prepare la suspensión del antígeno de cardiolipina exactamente en la forma descrita en "Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn con

Suero" (página 46) y deje reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. (Deseche después de 30 minutos.)

3. Coloque el pulgar sobre la boca del vial y agite suavemente para suspender las partículas del antígeno.

4. Pipetée 0.05 c.c. de la suspensión de antígeno directamente en el fondo de cada tubo de la primera hilera de la gradilla de Kahn, empleando una pipeta de antígeno de Kahn.

5. Pipetée 0.025 c.c. de suspensión de antígeno directamente en el fondo de cada tubo de la hilera de en medio de la gradilla de Kahn, empleando una pipeta de antígeno de Kahn.

6. Pipetée 0.0125 c.c. de suspensión de antígeno directamente en el fondo de cada tubo de la hilera posterior de la gradilla de Kahn, empleando una pipeta de antígeno de Kahn.

7. Añada 0.15 c.c. de cada suero al juego designado de 3 tubos conteniendo 0.05 c.c., 0.025 c.c. y 0.0125 c.c. de suspensión de antígeno, respectivamente.

Nota: El calentamiento del suero durante 30 minutos a 56° C., la absoluta claridad del suero y la preparación de la reacción en 3 tubos son iguales que en la reacción de Kahn con antígeno estándar. Los sueros deben ser empleados pronto después del período de calentamiento.

8. Agite la gradilla a mano durante 10 segundos, después de haber añadido a todos los tubos la suspensión de antígeno y los sueros.

9. Deje en reposo durante 3 a 7 minutos, a temperatura ambiente, la mezcla suero-suspensión de antígeno.

10. Agite la gradilla de tubos durante 3 minutos en un aparato agitador de Kahn (275 a 285 oscilaciones por minuto).

11. Añada 0.3, 0.1 y 0.1 c.c. de solución salina al 1.2% a los tubos 1, 2 y 3, respectivamente.

Nota: A este respecto la reacción de Kahn con antígeno de cardiolipina difiere de la reacción de Kahn con antígeno de Kahn, en la que 1.0, 0.5 y 0.5 c.c. de solución salina al 0.9% son añadidos a los tubos 1, 2 y 3, respectivamente.

12. Lea cada tubo de la gradilla inmediatamente después de haber añadido la solución salina al 1.2% y de agitar la gradilla suavemente para mezclar los ingredientes.

Nota: La lectura de los resultados de Kahn con antígeno de cardiolipina es esencialmente la misma que la lectura de los resul-

tados de Kahn con antígeno de Kahn, excepto que cada tubo es leído una sola vez (véa "Lectura de Resultados" en "Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn con Suero" página 46).

13. Promedie los resultados de la reacción de Kahn con antígeno de cardiolipina en la misma forma que en la reacción de Kahn con antígeno de Kahn e informe en la forma ilustrada.

INFORME DE LOS RESULTADOS DE LAS REACCIONES DE KAHN CON ANTÍGENO DE CARDIOLIPINA

Nº total de + en las lecturas en 3 tubos(1)	*Reporte*	
11 ó 12	Positivo	(4+)
8 a 10	Positivo	(3+)
5 a 7	Positivo	(2+)
3 ó 4	Dudoso	(1+)
2	Dudoso	(±)
1 ó 0	Negativo	

14. Centrifugue durante 10 minutos a 2.000 r.p.m. las reacciones negativas y dudosas con antígeno de cardiolipina en aquellos casos en que se hayan obtenido resultados positivos o dudosos con el antígeno de Kahn. (La centrifugación tiende a agregar las partículas y a aclarar el medio.) Anote las lecturas individuales de los tubos como positiva (grumos relativamente grandes), medianamente positiva (grumos de tamaño mediano), débilmente positiva (grumos pequeños pero definidos). Base el resultado final sobre el promedio de las lecturas de 3 tubos, considerando positiva la equivalente a 3+; moderadamente positiva la equivalente a 2+ y débilmente positiva la equivalente a 1+. (Los grumos relativamente grandes son designados como 3+ en vez de 4+ con el objeto de que en los resultados finales estén sobre una escala sensibilizada más baja que las reacciones que no requieren centrifugación (6).)

Antígeno de Cardiolipina en la Reacción de Microfloculación de Kahn

1. Emplée en el procedimiento microscópico la misma suspensión de antígeno cardiolipina antes descrito, usada en la reacción de 3 tubos.

2. Deje envejecer el antígeno cardiolipina durante 10 minutos antes de usarlo y deséchelo después de que haya envejecido más de 30 minutos.

(1) Las lecturas ± no son tomadas en cuenta.

3. El suero libre de partículas es calentado a 56° C. durante 30 minutos.

4. Deposite en una lámina anillada con parafina cantidades de suero de 0.05 c.c.

5. Mezcle bien la suspensión de antígeno sacándola varias veces con una jeringa de tuberculina con una aguja calibre 23. Sostenga la jeringa verticalmente sobre el suero y deje caer una gota de la suspensión en el centro.

6. Haga rotar la lámina (circunscribiendo a un círculo de 2") 150 a 160 veces por minuto durante 4 minutos.

7. Lea los resultados al microscopio a 50 diámetros, en la siguiente forma:

Negativo.....	El campo microscópico muestra partículas no agregadas muy pequeñas y uniformemente distribuídas.
Dudoso (±).....	El campo microscópico cubierto por numerosos agregados o grumos pequeños.
Dudoso (1+).....	Agregados ligeramente más grandes y menos abundantes.
Positivo (++).....	Grandes agregados con aclaramiento correspondiente del campo.
Positivo (+++).....	Agregados relativamente grandes diseminados en un campo claro.
Positivo (++++)....	Unos cuantos grumos grandes en un campo claro.

Preparación del Antígeno Estándar de Kahn

Cristalería y Equipo:

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

Reactivos:

1. Polvo de corazón de res:

El polvo de corazón de res puede ser adquirido (1) o preparado en el laboratorio en la siguiente forma:

(1) Obtenible en los Laboratorios Difco, Detroit, Mich. o en los Laboratorios Armour, Chicago, Ill.

a. Quite la grasa y el tejido conjuntivo de 3 ó más corazones de res.

b. Muela 3 ó 4 veces el tejido en un molino de carne.

c. Extienda una capa delgada en un plato de porcelana o de vidrio y séquela con una corriente de aire de uno o más ventiladores eléctricos durante 6 horas.

d. Rompa el material en pequeños pedazos y cúbralos con una gasa.

e. Continúe el secado hasta que los pequeños pedazos sean quebradizos.

f. Pulverice las partículas en un mortero o en un molino apropiado.

2. Eter:

Deberá emplearse éter anestésico estándar. Deberá evitarse el uso de éter que contenga pequeñas cantidades de alcohol.

3. Alcohol:

Use alcohol etílico con un contenido de alcohol no menor de 95%. Si es posible deberá ser preparado de alcohol etílico absoluto por la adición de la cantidad requerida de agua destilada determinada por pruebas con un hidrómetro de alcohol.

4. Colesterol:

Deberá emplearse colesterol Q. P. exento de cenizas, de alta calidad

Método de preparación del Extracto Alcohólico

1. Pese 100 grms. de polvo de corazón de res y colóquelos en un frasco de Erlenmeyer de 1 litro tapado herméticamente con un corcho recubierto con papel de estaño o con un tapón de vidrio.

2. Añada 400 c.c. de éter anestésico.

3. Tape el frasco y agítelo a frecuentes intervalos durante 10 minutos.

4. Coloque el papel filtro en un embudo Buchner ajustado al frasco filtro de brazo lateral por medio de un tapón de hule con una perforación.

5. Vierta el contenido del frasco de extracción de 1 litro en el embudo y filtre rápidamente por succión.

6. Pase el polvo de corazón de res húmedo a una hoja de papel filtro.

7. Fragmente el material en pequeños pedazos y póngalo de nuevo inmediatamente en el frasco de extracción de un litro.

8. Añada 300 c.c. de éter al frasco, tápelo y agítelo a intervalos frecuentes durante 10 minutos.

9. Vierta el contenido del frasco en el embudo, usando un papel filtro nuevo y filtre por succión.

10. Vuelva a pasar el polvo de corazón de res húmedo a una hoja de papel filtro.

11. Fragmente el material en pequeños pedazos y páselo inmediatamente al frasco de extracción.

12. Repita los pasos 8, 9 y 10 hasta un total de 4 extracciones etéreas.

13. Extienda el polvo de corazón de res en una hoja de papel filtro limpia y séquelo con la ayuda de una espátula hasta que el polvo esté exento de olor a éter.

14. Vierta el frasco en el que la extracción etérea fué hecha hasta que el olor a éter haya desaparecido.

15. Pese el polvo seco y exento de éter y póngalo de nuevo en el frasco.

16. Añada 5 c.c. de alcohol al 95% para cada gramo de polvo.

17. Tape el frasco con el tapón y agítelo intermitentemente durante 10 minutos.

18. Deje reposar durante 3 días a la temperatura ambiente (aproximadamente 21° C.) en la obscuridad.

19. Agite el frasco intermitentemente durante 10 minutos y filtre el contenido. Si es necesario vuelva a filtrar para eliminar todo el material particulado visible.

20. Guarde a temperatura ambiente en la obscuridad, como solución madre.

Colesterol del Extracto Alcohólico

1. Pese en una balanza analítica 6 mg. de colesterol para cada c.c. de extracto alcohólico de antígeno.

2. Pase el colesterol a un frasco con tapón de vidrio o a un frasco de Erlenmeyer de tamaño adecuado.

3. Añada la cantidad apropiada de extracto alcohólico medida con un cilindro graduado de tamaño adecuado.

4. Tape herméticamente el frasco y colóquelo en baño de maría caliente para apresurar la solución del colesterol agitando el frasco intermitentemente.

5. Después de que el colesterol se ha disuelto completamente deje enfriar el antígeno a temperatura ambiente y filtre a través de un papel exento de grasa.

Estandarización del Antígeno

El propósito de la estandarización es volver un antígeno recientemente preparado, comparable a un antígeno estándar de Kahn. Para obtenerla se hacen las siguientes maniobras.

1. **Determinación del Título.**—Determine la cantidad mínima de solución salina al 0.9% que debe ser añadida a 1 c.c. de antígeno para producir una suspensión de agregados que se disperse completamente con la adición de partes alícuotas designadas de solución salina.

2. **Determinación de Sensibilidad y Especificidad.**—Pruebe el antígeno, por lo que se refiere a su título, con sueros sifilítico y no sifilítico, empleando el antígeno estándar simultaneamente como un control.

3. **Corrección del Antígeno.**—Corrija el antígeno hasta que llene los requisitos estándar, cuando la sensibilidad y la especificidad no son idénticos a los del antígeno estándar.

Determinación del Título

1. Mida con una pipeta de 1 c.c. o de 2 c.c. (graduadas al 0.01 c.c.) 0.9, 1.1, 1.3, 1.5, 1.7 y 1.9 c.c., respectivamente, de solución salina al 0.9% en 6 frascos de antígeno.

2. Mida con una pipeta de 1.0 c.c. en cada uno de 6 viales similares 1 c.c. del antígeno colesterolizado al 0.6% que debe ser titulado (un control de antígeno estandarizado debería ser hecho al mismo tiempo al título indicado en la etiqueta).

3. Prepare las suspensiones de antígeno mezclando las cantidades de 1 c.c. de antígeno con las cantidades variables de solución salina. Vacíe la solución salina y tan rápidamente como sea posible (sin esperar a escurrir el tubo) vierta la mezcla de un vial al otro 12 veces. Deje la mezcla en reposo durante 30 minutos en vez del período habitual de 10 minutos.

4. Investigue la dispersibilidad en la solución salina, de los agregados lípidos presentes en las suspensiones antígeno-solución salina, en la siguiente forma:

   a. Prepare 7 series de 3 tubos de ensayo de Kahn cada una.

   b. Pipetée 0.05, 0.025 y 0.0125 c.c. de cada una de las suspensiones de antígeno (después de agitación completa) en el fon-

do de los tubos de las series, usando una pipeta de antígeno de 0.25 c.c.

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

c. Añada 0.15 c.c. de solución salina con una pipeta de 1 c.c., a cada uno de los 21 tubos.

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

e. Añada 1 c.c. de solución salina a los tubos conteniendo las cantidades de 0.05 c. c. de suspensión de antígeno y 0.5 c.c. a los tubos restantes. Agite la gradilla a mano para mezclar los ingredientes y observe si las mezclas son opalescentes o contienen agregados.

Un aspecto de titulación típica puede mostrar nebulosidades en la reacción de 3 tubos conteniendo la suspensión de antígeno que fué preparada con 0.9 c.c. y con 1.1 c.c. de solución salina. Estas suspensiones contienen agregados que no fueron redispersados completamente en la solución salina. Las reacciones conteniendo la suspensión de antígeno que fué mezclada con 1.3 c.c. de solución salina pueden ser opalescentes, exactamente como el control estándar de antígeno. Los otros tres análisis con suspensiones de antígeno conteniendo 1.5, 1.7 y 1.9 c.c. de solución salina pueden ser más claros que el control; en este caso el título del antígeno sería 1 c.c. de antígeno más 1.3 c.c. de solución salina, es decir, 1.3 c.c. es la menor cantidad de solución salina que, cuando es añadida a 1 c.c. de antígeno, produce agregados capaces de completar la dispersión con la mayor adición de solución salina. La siguiente tabulación muestra una titulación de antígeno típica. Los extremos normales de títulos para antígeno estándar pueden variar de 1 + 1.1, a 1 + 1.5.

TITULACIÓN DE ANTÍGENO TÍPICA.

Antígeno + solución salina al 0.9% (c.c.)	*Aspecto de la mezcla.*
1 + 0.9	Nebulosa, agregados no dispersables.
1 + 1.1	Agregados ligeramente nebulosos, finos, no dispersables.
1 + 1.3	Opalescente (título).
1 + 1.5	Ligeramente más clara.
1 + 1.7	Demasiado clara.
1 + 1.9	Casi clara como el agua.
Control	
1 + 1.4	Opalescente.

Las suspensiones de antígeno hechas con volúmenes progresivamente crecientes de solución salina, es decir, 0.9, 1.1, 1.3, 1.5, 1.7 y 1.9 c.c. habitualmente muestran un incremento progresivo correspondiente en la cantidad de las mezclas de suspensión de antígeno y de solución salina; raramente, sin embargo, una suspensión de antígeno mostrará una "titulación zona". Esto es, que puede aparecer, más allá del título, nebulosidad y agregados no dispersables, por ejemplo, en los tubos conteniendo 1.7 c.c. ó 1.9 c.c. de solución de sal. Este factor indica que este antígeno en particular tiene límites cortos para ser trabajado y mejor es no emplearlo para el uso general.

Nota: Después de que el título de un antígeno ha sido establecido, el siguiente paso es determinar si la sensibilidad y la especificidad del antígeno son comparables con las del antígeno estándar. Esto se logra analizando simultáneamente varios sueros con el antígeno en cuestión y el antígeno estándar.

Determinación de Sensibilidad y Especificidad:

1. Preparación de los sueros:

Una serie de sueros con reactividades graduadas pueden ser preparados de sueros mezclados positivo y negativo, filtrados en filtro Seitz, combinando proporciones elegidas de estos sueros de modo que el número deseado de especímenes reaccionando fuertemente y débilmente son obtenidos. Estos especímenes preparados pueden ser usados para todas las pruebas preliminares, pero solamente los sueros individuales seleccionados, son adecuados para la revisión final de la reactividad del antígeno. Todos los sueros deberían ser calentados antes de ser usados.

2. Análisis preliminar de antígeno recientemente preparado:

Prepare las suspensiones de antígeno con ambos antígenos de acuerdo con sus títulos respectivos. Después de que ambas suspensiones de antígeno han sido dejadas en reposo durante 10 minutos, practique los análisis cuando menos con 10 sueros, exactamente en la forma descrita en "Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn con Suero", (página 46). Si se obtienen reacciones idénticas con ambas suspensiones de antígenos deberá llevarse a cabo la revisión final abajo descrita.

3. Revisión final del antígeno recientemente preparado:

Obtenga cuando menos 50 sueros que muestren distintos grados de reactividad a la reacción de Kahn y 50 sueros con reacción negativa. Practique los análisis usando ambas suspensiones de antígeno simultáneamente, en la forma descrita en "Reacción Estándar (Cualitativa) de Kahn", (página 46).

Cada suero deberá ser analizado con ambos antígenos en la misma gradilla de modo que el factor tiempo sea constante. Deberán hacerse dos lecturas en cada caso en el que reacciones anotables son observadas durante la primera lectura. Las dos lecturas son necesarias, ya que algunos antígenos que producen primeras lecturas estándar pueden permitir que las partículas legibles se redispersen en una proporción distinta que la del antígeno estándar. En este caso el informe final de un espécimen dado podría ser menor o mayor que el obtenido con antígeno estándar. Si los resultados producidos por el nuevo antígeno son iguales a los del antígeno estándar, el antígeno recientemente preparado puede ser considerado como teniendo una reactividad estándar.

Corrección del Antígeno:

La sensibilidad del antígeno recientemente preparado puede ser mayor o menor que la del antígeno estándar. En cualquier caso puede llevarse a cabo la corrección de él hasta que llene los requisitos estándar. Los reactivos habitualmente necesarios para la confección del antígeno son analizados a continuación:

ESTANDARIZACIÓN DEL ANTÍGENO ESTÁNDAR DE KAHN

Reactividad del antígeno	*Método de ajuste*
Menos sensible que la estándar	1. Adición de alcohol colesterolizado. 2. Adición de reactivo sensibilizante. 3. Adición de reactivo sensibilizante más alcohol colesterolizado. 4. Adición de la "solución correctiva hiposensible para Bacto-Kahn". 5. Adición de antígeno hipersensible. 6. Diseminación de la cantidad de solución de sal en la suspensión del antígeno.
Más sensible que la estándar	1. Reducir la cantidad de colesterol. 2. Adición de alcohol colesterolizado. 3. Adición de antígeno hiposensible. 4. Aumento de la cantidad de solución de sal en la suspensión de antígeno. 5. Adición de "solución correctiva para hipersensible Bacto-Kahn". 6. Concentración de lípidos.

1. Preparación del alcohol colesterolizado:

Ponga 600 mg. de colesterol a 100 c.c. de alcohol al 95% en un frasco de Erlenmeyer o en una botella con tapón de cristal de 250 c.c.

Haga rotar el frasco en un baño de María caliente hasta que todo el colesterol esté disuelto. Fíltrelo cuando esté frío.

2. Preparación del reactivo sensibilizante:

a. Vuelva a filtrar el filtrado etéreo obtenido en la preparación del antígeno, para eliminar las huellas de polvo de músculo y evapore el éter con la ayuda de un ventilador eléctrico. Durante el período de evaporación pueden condensarse en el plato de evaporación unos cuantos c.c. de agua. Esta agua aparecerá en el fondo del plato de evaporación y se sugiere que sea eliminada con una pipeta capilar a medida que se forme para evitar la emulsificación de los lípidos. El residuo lípido es moreno, semitransparente y viscoso.

b. Cuando el volumen ha sido reducido a un punto en el cual ya no puede descubrirse el olor a éter, el residuo es pasado a un frasco adecuado con tapón de cristal y es pesado.

c. Un volumen de alcohol absoluto equivalente a 10 c.c. por gramo del residuo es añadido al frasco.

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

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

f. La mezcla es filtrada mientras está fría y el frasco conteniendo el filtrado claro es colocado en el incubador a 37° C. durante 24 horas.

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

h. El filtrado es colesterolizado con 6 mg. de colesterol por c.c. de acuerdo con la técnica habitual.

i. El extracto colesterolizado, conocido como reactivo sensibilizante, es filtrado y queda listo para su uso. Deberá ser guardado en la obscuridad a la temperatura ambiente.

3. Soluciones correctivas:

Solución correctiva para hipersensible Bacto-Kahn y solución correctiva para hiposensible Bacto-Kahn (2).

---

(2) Obtenibles en los Laboratorios Difco, Detroit, Mich.

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

a. Aumentando ligeramente la cantidad de solución salina en la suspensión de antígeno más allá de los requisitos del título.

Nota: Los antígenos ligeramente hipersensibles pueden ser llevados al nivel estándar de senbilidad, aumentando un poco la cantidad de solución salina en la suspensión de antígeno, más allá de los requisitos del título, siempre y cuando las reacciones negativas no sean demasiado claras. Por ejemplo:
Un antígeno ligeramente hipersensible requiriendo un título de 1 + 1.3 puede dar resultados comparables con antígeno estándar a un título de 1 + 1.35 ó 1 + 1.4.

b. Mezclando el antígeno hipersensible con un antígeno hiposensible de título bajo:

(1) Añada cantidades iguales de antígeno hipersensible e hiposensible (por ejemplo 10 c.c. de cada uno) en un pequeño frasco y mezcle bien.

(2) Practique la titulación (de acuerdo con "Determinación del Título", página 69).

(3) Prepare análisis comparativos preliminares, al título determinado, usando como control un antígeno estándar.

(4) Si los resultados son comparables, la revisión final (página 71) puede ser llevada a cabo.

(5) Si la reactividad del antígeno no es igual a la del antígeno estándar pruebe diferentes proporciones de los dos antígenos.

(6) La revisión final (página 71) deberá ser hecha después de que el lote completo del antígeno haya sido corregido.

c. Reduciendo la cantidad de colesterol del 0.6% habitual al 0.5% ó 0.4%:

(1) A un frasco de ½ onza añada 10 c.c. de antígeno colesterolizado al 0.6% y 2 c.c. de antígeno no colesterolizado, haciendo un antígeno colesterolizado al 0.5%. A otro frasco de ½ onza añada 8 c.c. de antígeno colesterolizado al 0.6% y 4 c.c. de antígeno no colesterolizado, haciendo un antígeno colesterolizado al 0.4%.

(2) Titule estas 2 muestras (de acuerdo con "Determinación del Título" página 69).

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

(4) Si cualquiera de los antígenos colesterolizados al 0.4% ó al 0.5% dan resultados comparables con el antígeno estándar, practique análisis adicionales y ajuste la cantidad total de antígeno hasta contener la cantidad apropiada de colesterol.

(5) Vuelva a revisar una muestra del lote completo, después de que haya sido corregido, antes de declararlo antígeno estándar.

d. Concentrando los lípidos en el antígeno:

Los antígenos hipersensibles, que requieren mayor corrección que un ajuste del título, pueden ser corregidos ocasionalmente por concentración de los lípidos.

(1) En un plato de evaporación pequeño, mida 1 c.c. de antígeno hipersensible en estado no colesterolizado.

(2) Evapore hasta secar por medio de un ventilador eléctrico.

(3) Disuelva el residuo en 10 c.c. de antígeno colesterolizado. El antígeno modificado así formado contiene 10% más de extractos lípidos que el antígeno original.

(4) Titule el antígeno (de acuerdo con "Determinación del Título" página 69).

(5) Pruebe este antígeno con 10 sueros, la mayoría de los cuales se sabe que dan reacciones débilmente positivas, empleando antígeno estándar como control.

(6) Si el antígeno modificado, en el cual el aumento en concentración de lípidos es 10%, da los mismos resultados con sueros que da el antígeno estándar, la cantidad total de antígeno hipersensible puede ser ajustada y sometida a la revisión final (página 71).

e. Por la adición de solución correctiva al antígeno:

La adición de la solución correctiva para hipersensibles Bacto-Kahn del 1% al 5%, puede ser suficiente para la corrección de antígenos hipersensibles hasta llegar a la sensibilidad estándar.

f. Por dilución con alcohol colesterolizado:

Véa "Corrección del antígeno menos sensible que el estándar" sección b, abajo indicada. La técnica descrita es también aplicable a la corrección del antígeno más sensible que el estándar.

5. La corrección de antígenos menos sensibles que el estándar puede ser lograda:

a. **Disminuyendo la cantidad de solución salina en la suspensión de antígeno, abajo de los requisitos del título:**
Los antígenos que son solamente ligeramente hiposensibles pueden ser llevados al nivel estándar de sensibilidad, disminuyendo la cantidad de solución de sal en la suspensión de antígeno 0.05 c.c. ó 0.1 c.c., siempre y cuando las reacciones negativas sean de opalescencia estándar.

b. **Por dilución de antígeno con alcohol colesterolizado:**

(1) En un frasco de ½ onza añada 10 c.c. del antígeno hiposensible (colesterolizado al 0.6%) y 1 c.c. de alcohol colesterolizado al 0.6%; en otro frasco de ½ onza añada 10 c.c. de antígeno hiposensible colesterolizado al 0.6% y 2 c.c. de alcohol colesterolizado al 0.6%, haciendo así diluciones al 10% y al 20%, respectivamente.

(2) Titule estos 2 antígenos (de acuerdo con "Determinación del Título", página 69).

(3) Practique análisis comparativos con sueros débilmente positivos usando antígeno estándar, simultáneamente, como control.

(4) Si ninguna de las diluciones con alcohol colesterolizado al 10% ó al 20% lleva el antígeno a la sensibilidad estándar, intente otras diluciones que no excedan del 30%.

c. **Por la adición de solución correctiva al antígeno:**

La adición de solución correctiva para hiposensibles Bacto-Kahn del 1 al 5%, puede ser suficiente para corregir los antígenos hiposensibles hasta una sensibilidad estándar.

d. **Por la adición de reactivo sensibilizante al antígeno:**

Algunos antígenos hiposensibles pueden ser llevados al nivel estándar de senbilidad por la adición de una pequeña cantidad de reactivo sensibilizante, como 0.2 a 0.7%. En algunos casos el reactivo sensibilizante en adición a la dilución con alcohol colesterolizado es necesario.

e. **Mezclando antígeno hiposensible con antígeno hipersensible:**

Este método es esencialmente el mismo descrito en la sección 4 (b) (página 74), en la corrección de un antígeno hipersensible por mezcla con uno hiposensible.

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

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

1. Antígenos que muestran títulos "en declive":

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

TITULACIÓN DE ANTÍGENO "EN DECLIVE"

Antígeno + solución salina al 0.9% (c.c.)	*Resultados de la Titulación*
1 + 0.9	Nebuloso; agregados.
1 + 1.1	Ligeramente nebuloso; agregados pequeños.
1 + 1.3	Opalescente (título); no hay agregados.
1 + 1.5	Un poco más claro que lo debido; no hay agregados.
1 + 1.7	Demasiado claro; no hay agregados.
1 + 1.9	Claro como el agua; no hay agregados.

2. Antígenos que muestran títulos "fijos":

Estos antígenos muestran imágenes de titulación de claridad similar al aumento en las cantidades de solución salina, empleadas en la separación de suspensiones de antígeno. La siguiente tabulación muestra una imagen de titulación "fija".

TITULACIÓN DE ANTÍGENO "FIJA"

Antígeno + solución salina al 0.9% (c.c.)	*Resultados de la Titulación*
1 + 0.9	Nebuloso; agregados.
1 + 1.1	Ligeramente nebuloso; agregados pequeños.
1 + 1.3	Huellas de nebulosidad; agregados dudosos.
1 + 1.5	Opalescente (título), no hay agregados.
1 + 1.7	Opalescente (igual); no hay agregados.
1 + 1.9	Opalescente (igual); no hay agregados.

Los antígenos que tienen títulos en declive, así como los que tienen títulos fijos, pueden ser corregidos hasta la misma sensibilidad pero, sin embargo, pueden poseer características diferentes. Algunos antígenos con título fijo muestran una tendencia a la precipitación marcada a tempera-

turas bajas y son considerados como no adecuados para su uso. Sólo aquellos antígenos con títulos en declive pueden ser considerados como estándar.

3. Cambios en los títulos de los antígenos:

El envejecimiento prolongado (1 año o más) pueden tener efectos perjudiciales en algunos lotes de antígeno estándar de Kahn. Una sensibilidad aumentada y una especificidad reducida pueden resultar del uso de un antígeno que dé reacciones negativas nebulosas, ya que para lograr resultados correctos es esencial obtener reacciones negativas francas. Por lo tanto, un antígeno que empieza a desarrollar esta característica o que tiene sensibilidad reducida después de haber sido almacenado por mucho tiempo, no deberá ser usado. El reajuste de estos antígenos puede ser logrado por la determinación de puntos finales, en una nueva titulación o por la corrección por uno de los métodos antes citados.

Estandarización del Antígeno Sensibilizado:

El antígeno sensibilizado es producido aumentando la sensibilidad del antígeno estándar de Kahn. El siguiente método de estandarización está basado en el uso de "reactivo sensibilizante" preparado en la forma antes descrita. La solución correctiva hiposensitiva de Bacto-Kahn puede ser substituída por el reactivo sensibilizante. El reactivo sensibilizante es empleado con una fluctuación de aproximadamente 1% a 2.5%, mientras que la "solución correctiva" puede requerir del 2% al 5%. Cualquiera de estos reactivos puede ser empleado en combinación con alcohol colesterolizado.

1. En un frasco de ½ onza añada 10 c.c. de antígeno estándar, 0.25 c.c. de reactivo sensibilizante colesterolizado al 0.6% y 2.5 c.c. de alcohol colesterolizado. En otro frasco de ½ onza ponga 10 c.c. de antígeno estándar, 0.2 c.c. de reactivo sensibilizante colesterolizado al 0.6% y 2 c.c. de alcohol colesterolizado al 6%.

2. Titule estas dos muestras utilizando volúmenes crecientes de solución salina en las suspensiones de antígeno, es decir, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1 y 2.2 c.c. Lleve a cabo la titulación en la misma forma descrita en "Determinación del Título" (página 69).

3. Practique análisis comparativos con sueros débilmente positivos, usando como control, antígeno sensibilizado estándar, en la forma descrita en "Reacción Presuntiva de Kahn con Suero" (página 55).

4. Practique análisis cuando menos con 100 sueros adicionales, si uno de los antígenos modificados es comparable al control de antígeno sensibilizado. Si las series revisadas muestran resultados comparables,

el nuevo antígeno es considerado como antígeno sensibilizado estándar para uso en la reacción presuntiva.

5. Haga combinaciones si ninguno de los dos antígenos modificados se ajusta a los requisitos del antígeno estándar sensibilizado, ajustando las cantidades de reactivo sensibilizante y de alcohol colesterolizado.

Bibliografía

1. KAHN, R. L.: Technique of standard Kahn test and of special Kahn procedures. Rev. and enl. ed. University of Michigan Press, pp. 55, June 1945. The Kahn test; a practical guide, Williams and Wilkins, Baltimore, xii, 201, 1928. Serology in syphilis control: Principles of sensitivity and specificity. ibid, x, 206, 1942.

2. WHEELER, A. H.; BRANDON, E. M.; KAHN, R. L.: The effect of lipids on Kahn antigen. I. Reduction of sensitivity by addition of lecithin. Am. J. Clin. Path., 17:117-129, Feb. 1947. II. Increase of sensitivity by the addition of cephalin, ibid. 17:130-142, 1947.

3. WHEELER, A. H.; BRANDON, E. M.: Effect of lipids on Kahn antigen. III. Increasing sensitivity of Kahn standard antigen to the level of Kahn sensitized antigen by the addition of alcoholic extract of soy bean lecithin. Am. J. Clin. Path, 17:770-776, Oct. 1947.

4. KAHN, R. L.; MCDERMOTT, E. B.; MARCUS, S.; WHEELER, A. H.; BRANDON, E. M.: Kahn reactions with cardiolipin antigen compared with Kahn antigen, with a note on a microflocculation procedure with cardiolipin antigen. Univ. Hosp. Bull., (Univ. of Mich.), 12:81-84, Sept. 1946.

5. KAHN, R. L.; MCDERMOTT, E. B.: Kahn recations with cardiolipin antigen compared with Kahn antigen. II. With a note on a microflocculation procedure with cardiolipin antigen. Am. J. Clin. Path., 18:364-374, May. 1948.

6. KAHN, R. L.: Personal communication.

REACCIONES DE KLINE

Equipo y Cristalería

Equipo General

1. Rotador, tipo Boerner (1) ó Fisher-Kline (2).
2. Anilladora de parafina (3).
3. Juego de moldes (4) consistente en un molde de acero (3-1/8 × 2-3/16 × 1/8 de pulgada, con dos de 1-9/16 pulgadas de diámetro) y dos discos de metal (1-5/16 pulgadas de diámetro × 3/16 de pulgada de espesor) con tornillos en el centro.
4. Soportes para láminas. Hechos de algún material conveniente para acomodar tres o cuatro láminas de 2 × 3 pulgadas.
5. Agujas hipodérmicas, calibre 22 y 26 con bisel limado.

Cristalería

1. Pipetas de 0.2 c.c., graduadas a la punta en 1/100 c.c.
2. Pipetas capilares de vidrio.
3. Tubos de centrífuga, fondo redondo, 3 × 1 pulgadas.
4. Frascos, redondos de 30 c.c. de capacidad con tapones de cristal.
5. Láminas de vidrio de 3 × 2 pulgadas.
6. Jeringas de vidrio, hipodérmicas, de 1.0 ó 2.0 c.c.

REACCIONES ESTANDAR DE KLINE

Reactivos

1. Antígeno:

El antígeno para la prueba estándar de Kline se compone de cardiolipina (0.2 por ciento) y lecitina purificada (1.8—2.0 por ciento) en

(1) Obtenible en Arthur H. Thomas Co., 230 S. Seventh, Philadelphia, Pa.
(2) Obtenible en Fisher Scientific Co., 711-723 Forbes Street, Pittsburgh, Pa.
(3) Obtenible en Eberbach and Son Co., Ann Arbor, Mich.
(4) Obtenible en La Motte Chemical Products, Towson 4, Baltimore, Md.

alcohol etílico absoluto. Este reactivo deberá ser hecho con componentes estandarizados químicamente y deben ser estandarizados serológicamente por comparación con un antígeno de reactividad estándar. Guárdese en el refrigerador.

2. Solución de colesterol:

Disuelva 1.0 gramo de colesterol (Pfanstiehl, exento de cenizas, precipitado por alcohol) en 100 c.c. de alcohol etílico absoluto y guárdese en frascos con tapón de cristal a la temperatura ambiente.

3. Agua destilada:

El agua destilada apropiada para las pruebas de Kline deberá tener un mínimo de iones positivos u otros electrólitos y el pH deberá ser 6.0 aproximadamente.

4. Solución de cloruro de sodio (0.85 por ciento):

Añada la cantidad necesaria de cloruro de sodio (850 mg.) seco y de calidad reactiva, a 100 c.c. de agua recientemente destilada. Esta solución deberá prepararse el día que se vaya a usar.

REACCIONES DE KLINE CON SUERO

Preparación del Suero

1. Separe los sueros de los coágulos por centrifugación y pipeteo o decantado.

2. Caliente los sueros en el baño de María durante 30 minutos a 56° C. Cuando sea necesario repetir el examen del suero en otro día, el suero deberá ser recalentado a 56° durante 5 minutos.

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

Preparación de las Láminas con Anillos de Parafina

1. Limpie las láminas de vidrio de 3 × 2 pulgadas con jabón Bon-Ami.

2. Usando una máquina de mano para hacer anillos de parafina o una eléctrica, coloque 12 anillos de parafina (14 mm. de diámetro) en cada lámina. Se puede usar parafina o una mezcla de dos partes de parafina y una parte de vaselina, calentada a 120° C. Se debe ejercer cuidado para que los anillos sean del tamaño especificado más arriba.

Preparación de la Emulsión de Antígeno

1. Pipetée 0.85 c.c. de agua destilada en el fondo de un frasco de 30 c.c. de capacidad y con tapón de cristal.

2. Añada 1.0 c.c. de la solución de colesterol al 1 por ciento, dejando gotear muy despacio de una pipeta la solución de colesterol, mientras que con la otra mano se le da un movimiento giratorio vigoroso al frasco, el cual es sostenido en ángulo sobre una superficie plana.

3. Continúe la rotación del frasco durante 20 segundos más.

4. Añada con una pipeta de 0.2 c.c., 0.1 c.c. de antígeno dejándolo escurrir del lado del cuello del frasco.

5. Tape el frasco y agite vigorosamente durante 1 minuto con un movimiento de arriba hacia abajo.

6. Añada 2.45 c.c. de la solución de cloruro de sodio al 0.85 por ciento al frasco rápidamente y agite con menos fuerza durante 30 segundos. La emulsión está ya lista para usarse, y si se coloca en el refrigerador, se podrá usar por 48 horas.

Reacciones Preliminares

1. Revise el rendimiento de la aguja hipodérmica ([5]) (calibre 22 ajustada a una jeringa de vidrio) o pipeta capilar y haga los ajustes necesarios de manera que se obtengan aproximadamente 125 gotas (0.008 c.c.) por centímetro cúbico de la emulsión de antígeno.

2. Termine las pruebas usando controles de sueros positivo, negativo y solución salina, como se describe en "Reacciones Cualitativas con Suero".

3. Se observarán grumos de partículas de antígeno en el suero positivo. El suero control negativo y control con solución salina deberán mostrar dispersión completa de las partículas de antígeno y el número óptimo de partículas por campo microscópico.

Reacciones Cualitativas con Suero

1. Pipetée 0.05 c.c. del suero calentado dentro de un anillo parafinado de la lámina de vidrio.

---

(5) El Dr. Kline prefiere la aguja calibre 26, pero en el Venereal Disease Research Laboratory han estado usando la aguja calibre 22. Lo más importante es el tamaño de la gota, de manera que se puede usar cualquier calibre de aguja que dé la cantidad correcta de la emulsión de antígeno.

2. Añada una gota (0.008 c.c.) de la emulsión de antígeno a cada suero.

3. Imprima un movimiento de rotación a las láminas sobre una superficie plana durante 4 minutos.

Nota: Si la rotación se hace a mano, se circunscribirá a un círculo de 1 pulgada y 180 veces por minuto. Si se usa el rotador tipo Boerner, (A. H. Thomas Co.) deberá ajustarse a 180 r.p.m. El rotador Fisher-Kline tiene mayor velocidad y menor amplitud.

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

4. Examine las reacciones al microscopio usando un aumento de 100 ×.

5. Informe de la siguiente manera los resultados observados.

a. Reacciones típicas:

Negativa.....	Partículas de antígeno dispersas, no hay grumos.
Positiva débil (± ó 1 +).....	Grumos pequeños de partículas de antígeno.
Positiva (2+ ó 3+).....	Grumos medianos de partículas de antígeno.
Fuertemente positiva (4 +)	Grumos grandes de partículas de antígeno.

b. Reacciones atípicas:

Las reacciones atípicas se caracterizan por grumos irregulares y plumosos en los cuales predominan los grumos pequeños. Se deberá repetir las pruebas en los sueros que den reacciones atípicas, en diluciones al 1:2 hasta 1:64 como se describe en "Reacciones Cuantitativas con Suero". El resultado será positivo si se obtiene una reacción positiva con una o más diluciones del suero.

Reacciones Cuantitativas con Suero

1. Añada 0.5 c.c. de la solución de cloruro de sodio al 0.85 por ciento a cada uno de 6 ó más tubos.

2. Añada 0.5 c.c. del suero calentado al primer tubo y mezcle.

3. Pase 0.5 c.c. del primer tubo al segundo y mezcle.

4. Continúe pasando 0.5 c.c. de cada tubo al siguiente, y mezcle hasta que el último tubo contenga 1.0 c.c.

5. Ponga 0.05 c.c. de cada dilución del suero en cada anillo parafinado en la lámina de vidrio.

6. Añada una gota de la emulsión de antígeno (0.008) a cada dilución del suero.

7. Dé movimiento de rotación a la lámina durante 4 minutos.

8. Léa y anote las reacciones como se describe en "Reacciones Cualitativas con Suero".

9. Informe los resultados en términos de la más alta dilución que produce una reacción positiva (2 +, 3 +, ó 4 +).

EJEMPLO:

Diluciones del Suero						*Informe*
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
4	3	1	—	—	—	Positivo - dilución al 1:4
4	4	4	2	—	—	Positivo - dilución al 1:16
4	4	4	4	2	—	Positivo - dilución al 1:32

Determinación de las Unidades de Reagina

Si la última reacción positiva en la titulación es de 2+, el número de unidades de reagina en el suero es el mismo que el de la dilución. Si la última reacción positiva es más fuerte que 2+, se necesitará hacer titulaciones adicionales para determinar la dilución en la que la última reacción positiva es de 2+. El número de unidades de reagina en un suero es el mismo que el de la dilución en la que la última reacción positiva es de 2+.

Las diluciones para determinar el título y las unidades de reagina en un suero deberán hacerse siempre con solución salina, y no con suero negativo.

EJEMPLO 1:

1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
4+	4+	4+	2+	Negativo

El título es 1:16 porque la última reacción es de 2+; el número de unidades de reagina es también 16.

EJEMPLO 2:

1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	Negativo

En este ejemplo el título es de 1:128. Para determinar el número de las unidades de reagina, se lleva a cabo una titulación adicional entre 1:128 y 1:256 para buscar la última dilución en la cual la prueba da una reacción de 2+. Esto se hace diluyendo 0.2 c.c. sobrante de la dilución al 1:8 con 0.6 c.c. de solución salina fisiológica (=0.8 c.c. de 1:32) y además diluyendo 0.1 c.c. de la dilución al 1:32 con 0.4 c.c. de solución salina en un tubo, 0.1 c.c. de la dilución al 1:32 con 0.5 c.c. de solución salina en un segundo tubo; y finalmente, 0.1 c.c. de la dilución al 1:32 con 0.6 c.c. de solución salina en el tercer tubo.

Si las reacciones son:	1:160	1:192	1.224
	4+	2+	Negativo

entonces el número de unidades de reagina es de 192.

REACCIONES DE KLINE CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

Preparación del Líquido Cefalorraquídeo

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

2. Analice cada líquido cefalorraquídeo para investigar la presencia de azúcar:

   a. Pipetée 5 c.c. de solución Benedict en un tubo de ensayo.

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

   c. Saque el tubo del baño de María. La reducción del cobre no deberá presentarse durante este período de calentamiento.

   d. Añada 0.5 c.c. de líquido cefalorraquídeo. Agite el tubo para mezclar su contenido.

   e. Lleve nuevamente el tubo al agua hirviendo durante 5 minutos.

   f. Saque el tubo del baño de María y examínelo en busca de precipitado que indique la presencia de azúcar. Los líquidos cefalorraquídeos que dan reacción negativa para el azúcar no son satisfactorios para su análisis.

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

Preparación de Láminas con Anillo Doble

1. Limpie con Bon Amí, láminas de vidrio de 3 × 2″.

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

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

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

Preparación de la Emulsión de Antígeno

1. Pipetée 0.6 c.c. de solución de colesterol al 1% en el fondo de un tubo de centrífuga grande con fondo redondo (1″ de diámetro).

2. Añada rápidamente 0.4 c.c. de agua destilada quitando el dedo de la pipeta y soplando hasta la última gota mientras se imprime un movimiento de rotación vigoroso al tubo sobre una superficie plana.

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

4. Añada 0.1 c.c. de antígeno (cardiolipina-lecitina) y haga rotar al tubo vigorosamente durante 1 minuto.

5. Añada 1.4 c.c. de solución de cloruro de sodio al 0.85% e imprima un movimiento de rotación al tubo sobre una superficie plana durante 30 segundos.

6. Centrifugue el tubo con la emulsión de antígeno a 1,100 (6) r.p.m. durante cinco minutos.

7. Decante el líquido turbio sobrenadante.

8. Añada 0.6 c.c. de solución de cloruro de sodio al 0.85% al sedimento e imprima un movimiento de rotación vigoroso al tubo durante 30 segundos para suspender uniformemente las partículas de antígeno.

9. Pase la emulsión de antígeno a un tubo de 13 × 100 mm. con tapón. Si esta emulsión es guardada en el refrigerador, puede ser usada durante 48 horas después de preparada.

---

(6) Se necesitará experimentar para determinar el tiempo y la velocidad de la centrifugación para obtener un sedimento con el número óptimo de partículas. El sedimento deberá ser en tal cantidad que cuando sea nuevamente suspendido en 0.6 c.c. de solución salina, una gota (0.008 c.c.) de la emulsión en 0.3 c.c. del líquido cefalorraquídeo, contenga el número óptimo de partículas de antígeno por campo microscópico.

Reacciones Preliminares

1. Revise la salida de la aguja hipodérmica calibre 26 (conectada a una jeringa de vidrio) o de la pipeta capilar. Deberán hacerse ajustes de modo que se obtengan 125 gotas aproximadamente (0.008 c.c. por gota) por cada c.c. de emulsión de antígeno.

2. Complete los análisis con controles de líquidos cefalorraquídeos positivo, negativo y solución salina en la forma descrita en "Reacciones Cualitativas con Líquido Cefalorraquídeo".

3. Se observarán grumos de partículas de antígeno en el líquido cefalorraquídeo positivo. Los controles de líquido cefalorraquídeo negativo y de solución salina deberán mostrar dispersión completa de las partículas de antígeno y el número óptimo de partículas por campo microscópico.

Reacciones Cualitativas con Líquido Cefalorraquídeo

1. Coloque el número necesario de láminas con anillo doble, en un soporte, mientras son calentados los líquidos cefalorraquídeos.

2. Pipetée 0.3 c.c. de líquido cefalorraquídeo caliente, en una cámara anillada. Los controles de líquido cefalorraquídeo postivo y negativo deberán ser incluídos.

3. Añada una gota (0.008 c.c.) de emulsión de antígeno al líquido cefalorraquídeo en cada cámara.

4. Haga rotar las láminas en una superficie plana con fuerza moderada durante 30 segundos para distribuir la emulsión de antígeno.

5. Mueva el soporte de la lámina hacia adelante y hacia atrás rápidamente (aproximadamente 3 movimientos completos por segundo) en una distancia lineal de 1/4 a 1/8", durante 8 minutos.

6. Examine las reacciones al microscopio a 100 × de aumento e informe los resultados observados de acuerdo con la siguiente descripción. Para facilitar la lectura, la lámina puede ser inclinada.

Negativa	**Partículas de antígeno dispersas, no hay grumos.**
Débilmente positiva (± ó 1+)	**Partículas de antígeno en pequeños grumos bien definidos.**
Positiva (2+ ó 3+)	**Partículas de antígeno en grumos de tamaño mediano.**
Fuertemente positiva (4+)	**Partículas de antígeno en grumos grandes.**

Reacciones Cuantitativas con Líquido Cefalorraquídeo

1. Prepare diluciones de líquido cefalorraquídeo al 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc., usando líquido cefalorraquídeo negativo (no solución salina) como diluyente.

2. Analice cada dilución de líquido cefalorraquídeo en la forma descrita en "Reacciones Cualitativas con Líquido Cefalorraquídeo".

3. Informe los resultados en términos de la mayor dilución que produce una reacción positiva (2+, 3+ ó 4+) en la forma descrita en "Reacciones Cuantitativas con Suero" (página 84).

REACCIONES DE KOLMER

Equipo y Cristalería

Equipo General

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

Cristalería

1. Tubos de ensayo Pyrex de diámetro exterior 15 × 85 mm.
2. Tubos Pyrex para centrífuga, de 15 c.c. graduados.
3. Tubos Pyrex con cuello, de 50 c.c. para centrífuga.

Preparación de los Sueros

1. Separe los sueros de los coágulos sanguíneos por centrifugación y pipeteo o decantación.

2. Caliente el suero a 56° C. durante 20 a 30 minutos. Los sueros previamente calentados deberán ser recalentados durante 5 minutos a 56° C. el día del análisis.

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

Nota: Si se desea obtener reacciones de fijación del complemento de sensibilidad máxima, será necesario eliminar las hemolisinas naturales anti-carnero de los sueros. Esto puede ser logrado en la siguiente forma:

a. Pipetée un c.c. de cada suero en un tubo pequeño (12 × 75 mm.) y colóquelo en el refrigerador durante 15 ó más minutos.

b. Añada una gota de glóbulos rojos de carnero lavados y comprimidos a cada suero y mezcle bien.

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

d. Centrifugue todos los tubos y separe los sueros por decantación. Evite arrastrar el residuo celular de las paredes y del fondo de los tubos.

e. Estos sueros son calentados a 56° C. durante 20 a 30 minutos. Los sueros absorbidos, previamente calentados, deberán ser recalentados durante 5 minutos.

Preparación de los Líquidos Cefalorraquídeos

1. Centrifugue y decante todos los líquidos cefalorraquídeos para eliminar los restos celulares y particulados.

2. Caliente todos los líquidos cefalorraquídeos recibidos por correo o almacenados durante 3 días o más, a 56° C. durante 15 minutos para eliminar las substancias anticomplementarias termolábiles.

3. Los líquidos cefalorraquídeos recientemente extraídos son analizados sin calentamiento preliminar.

Reactivos

Solución Salina

1. Pese 8.5 grms. de cloruro de sodio seco (ACS) y 0.1 grms. de sulfato de magnesia para cada litro de solución salina. Estas sales pueden ser pesadas y distribuídas en tubos de ensayo tapados con corcho para evitar el pesado diario. Sin embargo, deberá prepararse una solución salina fresca para usarla en cada tanda de análisis.

2. Disuelva las sales en agua recientemente destilada y filtre en los frascos, que deberán tener tapones de vidrio o de algodón cubierto con gasa.

3. Coloque en el refrigerador una cantidad de solución salina suficiente para diluir el complemento que va a ser usado en la reacción de fijación del complemento, y deje reposar el resto a temperatura ambiente.

Suspensión de Glóbulos Rojos de carnero

1. Filtre a través de una gasa, una cantidad adecuada de sangre preservada de carnero a unos tubos de centrífuga de fondo redondo; (véase "Colección y Preservación de Sangre de Carnero" página 149). La sangre de carnero recientemente colectada deberá ser refrigerada durante 48 horas antes de ser usada.

2. Añada a cada tubo 2 ó 3 volúmenes de solución salina.

3. Centrifugue los tubos con una fuerza suficiente para sedimentar los glóbulos en 5 minutos. (I. E. C. centrífuga Nº 1 a 2.000 r.p.m.).

4. Separe por succión a través de una pipeta capilar el líquido sobrenadante, quitando la capa superior de glóbulos blancos.

5. Llene el tubo con solución salina y resuspenda los glóbulos por inversión y agitación suave del tubo.

6. Vuelva a centrifugar los tubos y repita este proceso hasta un total de tres lavados. Si al tercer lavado el líquido sobrenadante no es incoloro, los glóbulos son demasiado frágiles y no deberán ser usados.

7. Después de separar el líquido sobrenadante del tercer lavado, los glóbulos son vertidos o lavados en tubos de centrífuga de 15 c.c. y centrifugados a la misma velocidad usada antes, durante 10 minutos, con el objeto de comprimir firme y uniformemente los glóbulos.

8. Léa el volumen de glóbulos comprimidos en el tubo de la centrífuga y separe con cuidado el líquido sobrenadante.

9. Prepare una suspensión de glóbulos de carnero al 2%, pasando los corpúsculos a un frasco con 49 volúmenes de solución salina. Agite el frasco para asegurar una suspensión uniforme de los glóbulos.

EJEMPLO:

2.1 c.c. (glóbulos comprimidos) × 49 = 102.9 c.c. (solución salina necesaria).

10. Pipetée 15 c.c. exactamente de la suspensión de glóbulos al 2%, en un tubo de centrífuga graduado de 15 c.c. y centrifugue a la velocidad antes usada durante 10 minutos. Una parte alícuota de 15 c.c. de suspensión de glóbulos preparada en forma adecuada producirá 0.3 c.c. ± 0.01 c.c. de glóbulos comprimidos.

Nota: Cuando el volumen de glóbulos comprimidos queda fuera de los límites tolerables arriba establecidos, la concentración de la suspensión de glóbulos deberá ser ajustada. La cantidad de solución salina que debe ser quitada o añadida a la suspensión de glóbulos para hacer el ajuste, es determinada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Lectura en el tubo de centrífuga (15 c.c.)}}{\text{0.3 c.c.}} \times \text{Volumen de la suspensión de glóbulos} = \text{Volumen corregido de la suspensión de glóbulos}$$

EJEMPLO 1:

Volumen de la suspensión de glóbulos ..... 100 c.c.
Lectura en el tubo de la centrífuga (15 c.c.) ..... 0.27 c.c.

$$\frac{\text{0.27 c.c.}}{\text{0.3 c.c.}} \times \text{100 c.c.} = \text{90 c.c.}$$

Por lo tanto 10 c.c. de solución salina deberán ser quitados de cada 100 c.c. de suspensión de glóbulos. La solución salina puede ser separada centrifugando una parte alícuota de la suspensión de glóbulos y sacando con una pipeta el volumen deseado de solución salina que debe ser desechado.

EJEMPLO 2:

Volumen de la suspensión de glóbulos ..... 100 c.c.
Lectura en el tubo de la centrífuga (15 c.c.) ..... 0.33 c.c.

$$\frac{0.33 \text{ c.c.}}{0.3 \text{ c.c.}} \times 100 \text{ c.c.} = 110 \text{ c.c.}$$

Por lo tanto deberán añadirse 10 c.c. de solución salina para cada 100 c.c. de suspensión de glóbulos. Una suspensión de glóbulos ajustada deberá ser revisada por centrifugación de una porción de 15 c.c.

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

Dilución del Antígeno

1. Coloque la cantidad requerida de solución salina en un frasco y añada el antígeno gota a gota mientras se agita el frasco continuamente. La cantidad necesitada puede ser calculada por el número de tubos conteniendo antígeno en el análisis y en las titulaciones. El factor de dilución es anotado en la etiqueta del frasco de antígeno. La dosis para el análisis constituye 0.5 c.c. del antígeno diluído.

EJEMPLO:

	Antígeno *c.c.*	Solución Salina *c.c.*
(Si el título del antígeno es a 1:600)	0.2	120
	0.3	180
(Si el título del antígeno es a 1:1000)	0.2	200
	0.3	300

La dilución del antígeno puesto en un frasco tapado se deja a la temperatura ambiente.

Diluciones de Hemolisina

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

Solución salina	94.0 c.c.
Fenol (al 5% en solución salina)	4.0 c.c.
Hemolisina glicerinada (50%)	2.0 c.c.

La solución de fenol deberá ser bien mezclada en la solución salina antes de añadir la hemolisina glicerinada. Esta solución se conserva bien a la temperatura del refrigerador pero deberá ser desechada cuando contenga precipitado.

2. Las diluciones de hemolisina al 1:1.000 ó mayores son preparadas diluyendo partes alícuotas de la solución 1:100.

Suero Complemento

1. El suero de cobayo exento de glóbulos puede ser obtenido centrifugando los tubos con sangre y decantando el suero de los coágulos, cuando se acostumbra en el laboratorio sangrar a los cobayos el día anterior al que son practicadas las reacciones de fijación del complemento. Los sueros de 3 cobayos o más deberán ser mezclados y llevados al refrigerador. (Véa "Preparación y Preservación del Complemento", página 110).

2. El suero-complemento deshidratado deberá ser llevado a su volumen original disolviéndolo en la cantidad prescrita de solución amortiguada o agua destilada y guardándolo en el refrigerador.

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

Solución de Clara de Huevo

Nota: Cualquiera de las soluciones de clara de huevo aquí descritas es un componente necesario para la reacción de fijación de complemento de Kolmer a menos que sean usadas combinaciones predeciblemente satisfactorias de antígeno-suero de cobayo (ver "Análisis Previo del Complemento" página 111).

1. Separe la clara de la yema de los huevos.

2. Quite las partículas pesadas y filtre la clara de los huevos a través de varias capas de gasa.

3. Mida la cantidad de clara de huevo filtrada y añada un volumen igual de solución salina para preparar una solución de clara de huevo al 50%;

o bien

Mida la cantidad de clara de huevo y añada nueve volúmenes de solución salina para preparar una solución de clara de huevo al 10%.

Después que estos reactivos han sido preparados pueden montarse las titulaciones de complemento y hemolisina.

Titulaciones del Complemento y de la Hemolisina

1. Practique simultáneamente estas dos titulaciones en la misma gradilla.

2. Coloque 10 tubos (numerados del 1 al 10) en un lado de la gradilla para la titulación de la hemolisina y 8 tubos (numerados del 1 al 8) en el otro lado para la titulación del complemento. Añada 2 tubos más a la gradilla para la solución de hemolisina al 1:1,000 y el otro para la dilución del complemento al 1:30.

3. Prepare una dilución de hemolisina al 1:1,000 colocando 4.5 c.c. de solución salina en un tubo de ensayo y añadiendo 0.5 c.c. de solución madre de hemolisina al 1:100. Mezcle bien.

4. Pipetée 0.5 c.c. de solución de hemolisina al 1:1,000 en los 5 primeros tubos de la titulación de hemolisina.

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

Tubo	*Solución Salina (c.c.)*	*Tubo*	*Solución Salina (c.c.)*
1	Ninguna	6	0.5
2	0.5	7	0.5
3	1.0	8	0.5
4	1.5	9	0.5
5	2.0	10	0.5

6. Proceda en la siguiente forma:

Tubo Nº	Proceso	Dilución final de hemolisina
1	Ninguno	1:1000
2	Mezcle. Deseche 0.5 c.c.	1:2000
3	Mezcle. Pase 0.5 c.c. al tubo 6. Deseche 0.5 c.c.	1:3000
4	Mezcle. Pase 0.5 c.c. al tubo 7. Deseche 1.0 c.c.	1:4000
5	Mezcle. Pase 0.5 c.c. al tubo 8. Deseche 1.5 c.c.	1:5000
6	Mezcle. Pase 0.5 c.c. al tubo 9.	1:6000
7	Mezcle. Pase 0.5 c.c. al tubo 10.	1:8000
8	Mezcle. Deseche 0.5 c.c.	1:10.000
9	Mezcle. Deseche 0.5 c.c.	1:12.000
10	Mezcle. Deseche 0.5 c.c.	1:16.000

7. Prepare una dilución de complemento al 1:30 añadiendo 0.2 c.c. de suero de cobayo a 5.8 c.c. de solución salina.

8. Pipetée 0.3 c.c. de complemento al 1:30 en cada uno de los 10 tubos de la titulación de **hemolisina.**

9. Añada las siguientes cantidades de complemento al 1:30 a los tubos de titulación de **complemento.**

Tubo	*Complemento 1:30 (c.c.)*	*Tubo*	*Complemento 1:30 (c.c.)*
1	0.2	5	0.4
2	0.25	6	0.45
3	0.3	7	0.5
4	0.35	8	Ninguno

10. Añada 0.5 c.c. de dilución de antígeno a cada uno de los primeros 7 tubos de la titulación del complemento.

11. Añada 1.7 c.c. de solución salina a cada uno de los 10 tubos de la titulación de hemolisina.

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

Tubo	*Solución Salina (c.c.)*	*Tubo*	*Solución Salina (c.c.)*
1	1.3	5	1.1
2	1.3	6	1.1
3	1.2	7	1.0
4	1.2	8	2.5

13. Añada 0.5 c.c. de suspensión de glóbulos de carnero al 2% a cada tubo de titulación de hemolisina.

14. Agite cada tubo de titulación de hemolisina para asegurar una distribución uniforme de los glóbulos y coloque la gradilla conteniendo las 2 titulaciones en el baño de María a 37° C. durante 1 hora.

En este momento la titulación de complemento y la titulación completada de hemolisina están en la siguiente forma:

Cuadro 1.—*Dilución del Complemento (primer período)*

Tubo Nº	Complemento 1:30 *(c.c.)*	Dilución de Antígeno *(c.c.)*	Solución Salina *(c.c.)*
1	0.2	0.5	1.3
2	0.25	0.5	1.3
3	0.3	0.5	1.2
4	0.35	0.5	1.2
5	0.4	0.5	1.1
6	0.45	0.5	1.1
7	0.5	0.5	1.0
8	Ninguno	Ninguno	2.5

Cuadro 2.—*Titulación de la Hemolisina (Completa)*

Tubo Nº	Dilución de Hemolisina 0.5 *(c.c.)*	Complemento 1:30 *(c.c.)*	Solución Salina *(c.c.)*	Suspensión de corpúsculos al 2% *(c.c.)*
1	1:1000	0.3	1.7	0.5
2	1:2000	0.3	1.7	0.5
3	1:3000	0.3	1.7	0.5
4	1:4000	0.3	1.7	0.5
5	1:5000	0.3	1.7	0.5
6	1:6000	0.3	1.7	0.5
7	1:8000	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. Saque la gradilla del baño de María y lea la titulación de hemolisina.

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

La hemolisina para la titulación del complemento y la reacción propiamente dicha es diluída de modo que dos unidades están contenidas en 0.5 c.c.

16. Prepare una cantidad de hemolisina diluída, conteniendo dos unidades por 0.5 c.c., suficiente para la titulación del complemento de acuerdo con la siguiente descripción.

Dilución conteniendo 1 unidad por 0.5 c.c.	Dilución conteniendo 2 unidades por 0.5 c.c.	Para preparar 2-unidades de hemolisina diluída mezcle	
		Solución de hemolisina al 1:100 (c.c.)	y Solución Salina (c.c.)
1:4000	1:2000	0.3	5.7
1:5000	1:2500	0.2	4.8
1:6000	1:3000	0.2	5.8
1:8000	1:4000	0.15	5.85
1:10.000	1:5000	0.1	4.9
1:12.000	1:6000	0.1	5.9
1:16.000	1:8000	0.1	7.9

17. Añada 0.5 c.c. de hemolisina diluída (conteniendo dos unidades de hemolisina) a cada uno de los primeros 7 tubos de la titulación del complemento.

18. Añada 0.5 c.c. de suspensión de glóbulos de carnero al 2% a los 8 tubos de la titulación del complemento. La adición de hemolisina y de glóbulos a la titulación del complemento deberá ser completada sin retraso, de preferencia dentro de los 5 minutos posteriores al momento en que la gradilla sea sacada del baño de María.

19. Agite cada tubo de la titulación del complemento para asegurar una distribución uniforme de los glóbulos y llévelo de nuevo al baño de María a 37° C. durante una hora. La titulación del complemento completa es mostrada en el cuadro 3.

Cuadro 3.—*Titulación del complemento (completa)*

Tubo N°	Complemento 1:30	Antígeno dosis	Solución Salina		Hemolisina	Suspensión de Glóbulos al 2%	
	c.c.	c.c.	c.c.		c.c.	c.c.	
1	0.20	0.5	1.3	Baño de María a 37° C. durante una hora.	0.5	0.5	Baño de María a 37° C. durante una hora.
2	0.25	0.5	1.3		0.5	0.5	
3	0.30	0.5	1.2		0.5	0.5	
4	0.35	0.5	1.2		0.5	0.5	
5	0.40	0.5	1.1		0.5	0.5	
6	0.45	0.5	1.1		0.5	0.5	
7	0.50	0.5	1.0		0.5	0.5	
8	Ninguno	Ninguno	2:5		Ninguno	0.5	

20. Retire la gradilla del baño de María y lea la titulación del complemento.

La menor cantidad de complemento que da una hemólisis brillante completa es la unidad exacta. La unidad completa es 0.05 c.c. mayor que

la unidad exacta. Para las reacciones de fijación del complemento, el complemento es diluído de modo que 1.0 c.c. contiene 2 unidades completas.

EJEMPLO:

	c.c.
Unidad exacta	0.3
Unidad completa	0.35
Dosis (2 unidades completas)	0.7

La dilución de complemento que debe ser empleada en la reacción propiamente dicha puede ser calculada dividiendo 30 $\times$ la dosis. Ejemplo:

$$\frac{30}{0.7} = 43$$ ó una dilución al 1:43 de suero de cobayo.

El cuadro siguiente da ejemplos adicionales:

Unidad Exacta c.c.	Unidad Completa c.c.	Dos Unidades Completas c.c.	Dilución para usarse	Preparación: Suero Complemento c.c.		Preparación: Solución Salina c.c.
0.3	0.35	0.7	1:43	1	+	42
0.35	0.4	0.8	1:37	1	+	36
0.4	0.45	0.9	1:33	1	+	32
0.45	0.50	1.0	1:30	1	+	29

Ocasionalmente son encontrados sueros-complemento hiperactivos que dan titulaciones indicando dos unidades completas por c.c. en diluciones mayores que 1:43. Estos complementos deberán ser diluídos al 1:43 para lograr reacciones satisfactorias. Los sueros-complemento hipoactivos que requieren diluciones menores de 1:30 son considerados como no satisfactorios.

Nota: Los tubos de las titulaciones del complemento o de la hemolisina que muestren hemólisis completa pueden ser retirados y colocados en el refrigerador para su uso posterior como solución de hemoglobina **para las lecturas estándar.** (Véa página 107).

REACCIONES DE FIJACION DEL COMPLEMENTO

El método cuantitativo regular empleando cinco cantidades de suero o de líquido cefalorraquídeo, con controles, puede ser usado cuando se desean resultados cuantitativos.

El método simplificado usando una sola dosis de suero o de líquido cefalorraquídeo con controles es igualmente efectivo para la separación de reactores positivos. El procedimiento simplificado opera con un ahorro considerable de reactivos y de trabajo, en comparación con el método cuantitativo y por lo tanto es más adaptable a la rutina de los grandes laboratorios de análisis.

Ambas reacciones antes citadas pueden ser hechas con la mitad del volumen. Las cantidades de complemento, antígeno y otros reactivos necesitados, son en esta forma reducidos a la mitad. Sin embargo, puede sacrificarse cierta exactitud en la operación por el uso de estas cantidades reducidas, ya que los efectos relativos de los errores en la medición están aumentados. La hemolisina y el complemento son titulados a volumen completo en la forma descrita para la reacción regular. La práctica de las reacciones a mitad de volumen es idéntica a los métodos regulares excepto que se usa la mitad de los volúmenes, líquido cefalorraquídeo y reactivos.

Reacciones Regulares Simplificadas

1. Prepare tubos de ensayo en gradillas de alambre de modo que haya dos tubos para cada suero, sueros controles positivo y negativo y líquido cefalorraquídeo que vayan a ser analizados. Numere la primera hilera de tubos que correspondan al suero y líquido cefalorraquídeo en análisis. Se incluyen tubos de ensayo adicionales para controles de los reactivos especificados.

2. Pipetée 0.5 c.c. de solución salina a cada tubo de la segunda hilera.

3. Añada las siguientes cantidades de solución salina a los cuatro tubos de control.

	c.c.
Control de antígeno (para reacciones con suero)	0.2
Control del antígeno (para reacciones con líquido cefalorraquídeo	0.5
Sistema de control hemolítico	1.0
Control de los glóbulos	2.5

4. Pipetée 0.2 c.c. de cada suero en análisis a los tubos 1 y 2.

5. Pipetée 0.5 c.c. de cada líquido cefalorraquídeo en análisis a los tubos 1 y 2.

6. Añada 0.2 c.c. de solución de clara de huevo al 50% (1) a cada tubo de las reacciones de líquidos cefalorraquídeos y a los controles de antígeno para suero y líquido cefalorraquídeo.

---

(1) El suero complemento para las reacciones del líquido cefalorraquídeo debe ser diluído en solución de clara de huevo al 10%, a menos que el complemento sea previamente analizado, o son añadidos a cada tubo 0.2 c.c. de solución de clara de huevo al 50% en la forma descrita en el párrafo 6 antes citado.

7. Añada 0.5 c.c. de la dilución de antígeno al primer tubo de cada análisis, sea de suero o de líquido cefalorraquídeo y a los dos tubos controles de antígeno.

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

9. Prepare el complemento diluído durante este intervalo. La cantidad necesitada es equivalente a 1 c.c. para cada tubo de la reacción, más un ligero exceso.

Nota: El volumen de suero-complemento que debe ser diluído es determinado por la cantidad de complemento diluído necesario para el análisis propiamente dicho y por las titulaciones observadas. Dividiendo el número de c.c. de complemento diluído necesitado por el factor de dilución de la titulación (2 unidades completas), dará el número de c.c. de suero-complemento necesario. Los cálculos pueden ser hechos de acuerdo con la tabla siguiente:

Titulación de complemento 2 unidades completas	Complemento diluído necesario *(c.c.)*	Suero-complemento requerido *(c.c.)*	Solución Salina fría requerida *(c.c.)*
1:43	43	1	42
1:43	215	5	210
1:37	37	1	36
1:30	210	7	203

10. Añada 1 c.c. de complemento diluído (1) (conteniendo 2 unidades completas) a todos los tubos de las reacciones con suero, incluyendo el tubo de control del antígeno (para reacciones con suero).

11. Añada 1 c.c. de complemento diluído (1) (conteniendo 2 unidades completas) a todos los tubos de las reacciones con líquidos cefalorraquídeos, incluyendo el tubo de control del antígeno (para reacciones con líquidos cefalorraquídeos).

12. Añada 1 c.c. de complemento diluído al tubo de control del sistema hemolítico.

13. Mezcle el contenido de los tubos agitando bien la gradilla y colocándola durante 15 a 18 horas en el refrigerador de 6° a 8° C.

14. Prepare el volumen de hemolisina diluída necesaria para la reac-

(1) Véase la nota al pie de la página Nº 101.

ción propiamente dicha calculando 0.5 c.c. (conteniendo 2 unidades) para cada tubo.. Prepare un ligero exceso.

La fórmula siguiente puede ser usada para calcular una solución de hemolisina al 1:100 y diluyente requerido para preparar el volumen necesario de hemolisina diluída.

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

EJEMPLOS:

Título de hemolisina 2 unidades en 0.5 c.c.	Dilución de hemolisina necesitada *(c.c.)*	Hemolisina al 1:100 requerida *(c.c.)*	Solución Salina requerida *(c.c.)*
1:3000	30	1	29
1:4000	120	3	117
1:2500	25	1	24
1:2500	250	10	240

15. Retire cada gradilla de tubos del refrigerador y colóquela en el baño de María a 37° C. durante 10 minutos.

16. Retire cada gradilla del baño de María y añada a todos los tubos 0.5 c.c. de hemolisina excepto al tubo de control de los glóbulos.

17. Añada 0.5 c.c. de suspensión de glóbulos de carnero al 2% (preparada el día anterior) a todos los tubos. La suspensión de glóbulos al 2% deberá ser agitada ocasionalmente para asegurar la dispersión uniforme de los glóbulos durante el período en que este reactivo es añadido a los análisis de fijación del complemento.

18. Mezcle bien el contenido de los tubos agitando cada gradilla antes de volverla al baño de María a 37° C. para la segunda incubación. El tiempo necesario para la segunda incubación, generalmente 20 a 30 minutos, deberá ser 10 minutos más de lo necesario para hemolizar los controles de antígeno de sistema hemolítico.

19. Retire cada gradilla de tubos del baño de María al final del segundo período de incubación. Anote la hemólisis observada en la forma descrita en "Preparación de los Estándares de Lectura" y "Lectura e Informe" (página 107) excepto en aquellos casos en que se note inhibición de la hemólisis en el tubo de control. Todos los sueros y líquidos cefalorraquídeos que muestren inhibición de la hemólisis en el tubo de control

deberán ser llevados nuevamente al baño de María a 37° C. durante un período suficiente para completar una hora de incubación secundaria. Al final de este período, estas reacciones son retiradas del baño de María y anotadas las lecturas de los tubos (incluyendo los tubos de control).

Cuadro 4.—*Reacciones regulares simplificadas con suero y con líquido cefalorraquídeo.*

Tubo Nº		Solución salina (c.c.)	Clara de huevo (50%)[1] c.c.	Antígeno c.c.	2 unidades completas de complemento c.c.	2 unidades de hemolisina c.c.	Suspensión y glóbulos al 2% c.c.
	Suero (c.c.)						
1.....	0.2	Ninguno	Ninguno	0.5	1.0	0.5	0.5
2.....	0.2	0.5	Ninguno	Ninguno	1.0	0.5	0.5
	Líquido cefalorraquídeo (c.c.)						
1.....	0.5	Ninguno	[1] 0.2	0.5	[2] 1.0	0.5	0.5
2.....	0.5	0.5	[1] 0.2	Ninguno	[2] 1.0	0.5	0.5
Controles							
Antígeno (suero).....		0.2	[1] 0.2	0.5	[2] 1.0	0.5	0.5
Antígeno (líquido cefalorraquídeo).....		0.5	[1] 0.2	0.5	[2] 1.0	0.5	0.5
Sistema hemolítico....		1.0	Ninguno	Ninguno	1.0	0.5	0.5
Corpúsculos.....		2.5	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	0.5

Agite bien la gradilla. Déjela a temperatura ambiente por 10 a 30 minutos.

Agite bien la gradilla. Incubación primaria de 15 a 18 horas de 6° a 8° C., seguida por 10 minutos a 37° C. en baño de María.

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

[1] Puede ser omitida si se usa complemento previamente analizado o si el complemento es diluído en solución de clara de huevo al 10%.

[2] Complemento diluído en solución de clara de huevo al 10% a menos que se use complemento previamente analizado o se añada solución de clara de huevo al 50%.

Reacciones Regulares Cuantitativas

1. Coloque los tubos de ensayo en gradillas de alambre, destinando seis tubos para cada suero y líquido cefalorraquídeo que deba ser analizado, arreglados de tal modo que la hilera del frente contenga el tubo 1,

la segunda hilera el tubo 2, etc., de cada espécimen. Incluya los tubos para control de sueros positivo y negativo y para controles de reactivos.

2. Pipetée las siguientes cantidades de solución salina en los seis tubos, para cada suero, principiando con el tubo 1 en la hilera del frente: 0.9, 0.5, 0.5, 0.5, 2.0 y 0.5 c.c.

3. Pipetée 0.5 c.c. de solución salina en los tubos 2, 3, 4, 5, y 6 de cada reacción con líquido cefalorraquídeo.

4. Pipetée las cantidades indicadas de solución salina en cada uno de los siguientes tubos de control de reactivos.

	Solución Salina
Control de antígeno	0.5 c.c.
Control hemolítico	1.0 c.c.
Control de glóbulos	2.5 c.c.

5. **Para cada suero:**

Añada 0.6 c.c. de suero inactivado al tubo 1.
Mezcle y pase 0.5 c.c. al tubo 6 (control) y al tubo 2.
Mezcle el contenido del tubo 2 y pase 0.5 c.c. al tubo 3.
Mezcle el contenido del tubo 3 y pase 0.5 c.c. al tubo 4.
Mezcle el contenido del tubo 4 y pase 0.5 c.c. al tubo 5.
Mezcle el contenido del tubo 5 y deseche 2.0 c.c.

6. A cada líquido cefalorraquídeo:

Añada 0.5 c.c. del líquido cefalorraquídeo a los tubos 1, 2 y 6.
Mezcle el contenido del tubo 2 y pase 0.5 c.c. al tubo 3.
Mezcle el contenido del tubo 3 y pase 0.5 c.c. al tubo 4.
Mezcle el contenido del tubo 4 y pase 0.5 c.c. al tubo 5.
Mezcle el contenido del tubo 5 y deseche 0.5 c.c.

7. Añada a cada tubo de suero y de líquido cefalorraquídeo de las reacciones cuantitativas con suero y con líquido cefalorraquídeo y al tubo de control del antígeno, 0.2 c.c. de solución de clara de huevo al 50%. (2)

8. Añada 0.5 c.c. de antígeno diluído a los primeros cinco tubos de cada reacción (suero y líquido cefalorraquídeo) y al tubo de control del antígeno. Agite la gradilla para mezclar bien.

9. Deje las gradillas en reposo a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.

---

(2) Puede ser omitida si se usa complemento previamente analizado o si el complemento es diluído en solución de clara de huevo al 10%.

10. Termine los análisis en la forma indicada en los párrafos 9 al 19 de la técnica para la práctica de las "Reacciones Regulares Simplificadas" (página 101).

Cuadro 5.—*Reacciones cuantitativas regulares con suero y con líquido cefalorraquídeo.*

Tubo Nº		Clara de huevo (50%)[1] c.c.	Antígeno c.c.		2 unidades completas[2] de complemento c.c.		2 unidades de hemolisina c.c.	Suspensión de glóbulos (al 2%) c.c.	
	Suero (en 0.5 c.c.)								
1.....	0.2	[1] 0.2	0.5	Agite bien la gradilla. Déjela a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.	[2] 1.0	Agite bien la gradilla. Incubación primaria de 15 a 18 horas de 6° a 8° C. seguida por 10 minutos a 37° C. en baño María.	0.5	0.5	Agite bien la gradilla. Incubación secundaria en baño de María a 37° C.
2.....	0.1	[1] 0.2	0.5		[2] 1.0		0.5	0.5	
3.....	0.5	[1] 0.2	0.5		[2] 1.0		0.5	0.5	
4.....	0.025	[1] 0.2	0.5		[2] 1.0		0.5	0.5	
5.....	0.005	[1] 0.2	0.5		[2] 1.0		0.5	0.5	
6.....	0.5 (control)	[1] 0.2	Ninguno		[2] 1.0		0.5	0.5	
	Líquido cefalorraquídeo (en 0.5 c.c.)								
1.....	0.5	[1] 0.2	0.5		[2] 1.0		0.5	0.5	
2.....	0.25	[1] 0.2	0.5		[2] 1.0		0.5	0.5	
3.....	0.125	[1] 0.2	0.5		[2] 1.0		0.5	0.5	
4.....	0.0625	[1] 0.2	0.5		[2] 1.0		0.5	0.5	
5.....	0.03125	[1] 0.2	0.5		[2] 1.0		0.5	0.5	
6.....	0.2 (control)	[1] 0.2	Ninguno		[2] 1.0		0.5	0.5	
Controles reactivos									
Antígeno, 0.5 c.c. solución salina		[1] 0.2	0.5		[2] 1.0		0.5	0.5	
Hemolítico, 1.0 c.c. solución salina		Ninguna	Ninguno		[2] 1.0		0.5	0.5	
Glóbulos, 2.5 c.c. solución salina		Ninguna	Ninguno		Ninguno		Ninguna	0.5	

[1] Puede ser omitida si se usa complemento previamente analizado o si el complemento es diluído en solución de clara de huevo al 10%.

[2] Complemento diluído en solución de clara de huevo al 10% a menos que se use complemento previamente analizado o se añada solución de clara de huevo al 50%.

Preparación de los Estándares de Lectura

1. Caliente los tubos de solución de hemoglobina (guardada de la titulación) en el baño de María a 56° C. durante 5 minutos.

2. Prepare una dilución al 1:6 de suspensión de glóbulos al 2%, añadiendo 5 c.c. de solución salina a 1 c.c. de suspensión al 2%.

3. Prepare los estándares de lectura mezclando la solución de hemoglobina y la suspensión de glóbulos en las preparaciones dadas en el cuadro 6.

Cuadro 6

1:6 Suspensión de glóbulos (c.c.)	Solución de Hemoglobina (c.c.)	Fijación de complemento equivalente	
		Porcentaje	Registro
3.0	0.0	100	4+
1.5	1.5	50	3+
0.75.....	2.25	25	2+
0.3	2.7	10	1+
0.15.....	2.85	5	±
.....	3.0	0	—

Lectura e Informe

1. Todos los controles de suero y de líquido cefalorraquídeo deberán mostrar hemólisis completa.

2. Estime las lecturas individuales de los tubos por comparación con los estándares de lecturas al final del período de incubación secundaria (10 minutos después de que los tubos de control de antígeno estén hemolizados) y anote el grado de fijación del complemento observado, excepto para aquellos antígenos que muestren inhibición de la hemólisis en el tubo de control.

3. Lea los tubos que se hayan llevado de nuevo al baño de María a 37° C. durante 1 hora completa de incubación secundaria, estimando y anotando el grado de fijación del complemento de cada tubo y del tubo de control, por comparación con los estándares de lectura.

4. Informe los resultados de las reacciones regulares simplificadas de acuerdo con el cuadro 7.

Cuadro 7.—*Informe de las Reacciones Simplificadas.*

Lectura del tubo de análisis	Lectura del tubo de control	Informe
4+	—	Positivo
3+	—	Positivo
2+	—	Positivo
1+	—	Positivo
±	—	Dudoso
—	—	Negativo
4+	4+	Anticomplementario
4+	3+	Anticomplementario
4+	2+	Dudoso
4+	1+	Positivo
3+	3+	Anticomplementario
3+	2+	Anticomplementario
3+	1+	Dudoso
3+	±	Dudoso
2+	2+	Negativo
2+	1+	Negativo
2+	±	Negativo
1+	1+	Negativo
±	±	Negativo

5. Informe los resultados de las reacciones cuantitativas regulares de acuerdo con el cuadro 8 cuando los tubos de control muestren hemólisis completa al final del período de incubación secundaria.

6. Informe los resultados de los análisis cuantitativos regulares de acuerdo con el cuadro 9, cuando sea necesaria una hora completa de incubación a 37° C.

Cuadro 8.—*Informe de la Reacción Cuantitativa.*

Grado de fijación del complemento	**Interpretación**	**Informe (Ejemplos)**
Fijación completa en el 1er. tubo...	**Positiva....**	**Positivo (4 3 1 — —).** **Positivo (4 — — — —).** **Positivo (4 4 4 4 4).** **Positivo (4 4 3 2 —).**
Fijación parcial en el segundo tubo (10% ó más)	**Positiva....**	**Positivo (3 1 — — —).** **Positivo (1 — — — —).** **Positivo (2 1± — —).**
Fijación parcial en el primer tubo (5%)	**Dudosa.....**	**Dudoso (± — — — —)**
Hemólisis completa en todos los tubos	**Negativa...**	**Negativa (— — — — —).**

Cuadro 9.—*Informe de la Reacción Cuantitativa.*

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

Lectura del tubo de análisis	Lectura del tubo de control	Informe
4 4 4 1 —	4+	Anticomplementario
4 4 3 — —	2+	Positivo
4 4 1 — —	1+	Positivo
4 4 1 — —	±	Positivo
3 2 — — —	±	Positivo
4 4 1 — —	3+	Dudoso
3 2 — — —	1+	Dudoso
2 1 — — —	±	Dudoso
3 — — — —	±	Dudoso
1 — — — —	±	Negativo
1 — — — —	1+	Negativo
2 — — — —	1+	Negativo
2 — — — —	2+	Negativo

7. Las reacciones cuantitativas también pueden ser informadas en unidades Kolmer, de acuerdo con la misma fórmula empleada en la reacción cuantitativa con suero de Kahn, en donde S = 4D. La potencia del suero o del líquido cefalorraquídeo es entonces igual a 4 veces la mayor dilución que da una reacción positiva. En la siguiente tabulación se ofrecen ejemplos.

INFORME DE LA REACCIÓN CUANTITATIVA DE KOLMER

Reacciones positivas (4+, 3+, 2+ ó 1+)	*Informe en Unidades Kolmer* *Unidades*
Primer tubo solo, con (1+)	1
Primer tubo solo, con (2+)	2
Primer tubo solo, con (3+)	3
Primer tubo solo, con (4+)	4
Primeros dos tubos	8
Primeros tres tubos	16
Primeros cuatro tubos	32
Todos los cinco tubos (suero)	160 (o más)
Todos los cinco tubos (líquido cefalorraquídeo)	64 (o más)

Preservación de los Glóbulos de Carnero

1. Recoja la sangre del carnero en solución estéril de citrato de sodio al 3.8%. (Ver "Colección y Preservación de la Sangre de Carnero" página 149).

2. Guarde la sangre citratada en el refrigerador cuando menos durante 48 horas antes de usarla.

Preparación y Preservación del Complemento

Preparación

1. Elija tres o más cobayos grandes y sanos.

2. Saque con aguja y jeringa 5 c.c. de sangre del corazón y colóquela en tubos individuales identificados por número.

3. Después de que la sangre haya coagulado a temperatura ambiente, despegue el coágulo del tubo con un aplicador de madera y refrigere durante una hora cuando menos.

4. Centrifugue y si se desea el análisis previo del suero complemento, retire sólo la cantidad de suero necesario para el análisis previo. (Véa "Análisis previo del Complemento".)

5. Refrigere el suero con el coágulo hasta que hayan sido obtenidos los resultados del análisis previo.

6. Mezcle los sueros de todos los tubos (o los de los sueros hallados satisfactorios en el análisis previo), vuelva a centrifugar y preserve.

O bien

7. Si los animales van a ser sangrados totalmente, el análisis previo podrá ser hecho sacando 2 c.c. de sangre del corazón, identificando el tubo de sangre con el animal de que ha sido obtenida y haciendo el análisis previo en la forma prescrita.

8. Para sangrar totalmente a los cobayos. Aturda al animal con un golpe en la cabeza, para anestesiarlo, corte las venas yugulares externas y recoja la sangre en cajas de Petri o en tubos de centrífuga de 50 c.c.

9. Deje coagular durante una hora a temperatura ambiente.

10. Despegue el coágulo de las paredes del recipiente y refrigere durante una o dos horas.

11. Decante y filtre el suero a través de una gasa, centrifugue, mezcle el suero claro y preserve.

Preservación

Método 1. Deshidrate al vacío el suero-complemento congelado por los métodos crioquímicos o de liofilización.

Método 2. Añada al suero-complemento la siguiente solución a partes iguales:

Acetato de sodio	12 grms.
Acido bórico	4 grms.
Agua destilada estéril	100 c.c.

Para usar, diluya 1 c.c. del suero-complemento preservado en 14 c.c. de solución salina para preparar una dilución al 1:30.

Método 3. Añada 1.0 grm. de cloruro de sodio para cada 10 c.c. de suero de cobayo.

Método 4. Congele el suero complemento y guárdelo congelado hasta el día en que sea usado.

Análisis Previo del Complemento

KOLMER

Nota: Cuando se usa un complemento al que se le ha hecho una prueba preliminar, se puede afirmar que producirá una combinación satisfactoria con el antígeno en la prueba de fijación del complemento de Kolmer. Cuando no es práctico hacer la prueba preliminar, entonces se debe emplear la solución de la clara de huevo como se describe en las técnicas para líquido cefalorraquídeo y para la prueba cuantitativa en suero.

1. Determine dos unidades de hemolisina haciendo una titulación de hemolisina como se describe en "Titulaciones de Complemento y Hemolisina" (página 96) empleando cualquier suero de cuy que demuestre una actividad complementaria aceptable.

2. Coloque los tubos en las gradillas de metal dejando seis tubos para cada suero-complemento que se vaya a analizar. Los sueros de cuyes que vayan a constituir un lote deberán ser probados individualmente antes de mezclarlos. El lote de suero-complemento deshidratado deberá ser probado con anterioridad también. Numere cada juego de tubos del 1 al 6.

3. Prepare una dilución al 1:30 de cada suero-complemento añadiendo 0.2 c.c. de suero a 5.8 c.c. de solución salina, mézclense.

4. Pipetée las siguientes cantidades de la dilución del suero-complemento al 1:30 dentro de cada tubo designado.

Tubo Nº 1	0.8 c.c.	Tubo Nº 4	0.8 c.c.
Tubo Nº 2	0.6 c.c.	Tubo Nº 5	0.6 c.c.
Tubo Nº 3	0.4 c.c.	Tubo Nº 6	0.4 c.c.

5. Añada 0.5 c.c. del antígeno diluído a los tubos números 1, 2 y 3.

6. Añada las cantidades siguientes de solución salina a cada tubo designado.

Tubo Nº 1	0.7 c.c.	Tubo Nº 4	1.2 c.c.
Tubo Nº 2	0.9 c.c.	Tubo Nº 5	1.4 c.c.
Tubo Nº 3	1.1 c.c.	Tubo Nº 6	1.6 c.c.

7. Agite la gradilla para mezclar bien y coloque en el refrigerador de 15 a 18 horas a una temperatura de 6 a 8 grados C.

8. Saque la gradilla del refrigerador y colóquela en el baño de María a 37° C. durante 10 minutos.

9. Sáquela del baño de María y añada 0.5 de la hemolisina diluída, conteniendo 2 unidades, a cada tubo.

10. Añada 0.5 c.c. de la suspensión de glóbulos de carnero al 2% a cada tubo.

11. Agite la gradilla para mezclar los contenidos en los tubos y vuelva a colocarla en el baño de María a 37° C. durante 1 hora.

12. Informe por medio de cruces, el grado de hemólisis observado como se describe en "Preparación de los Estándares de Lectura" (página 107).

13. El suero de cuy que da una hemólisis completa en los seis tubos es satisfactorio para usarlo con el antígeno que se va a usar en la prueba. El suero que demuestra una inhibición de hemólisis igual en los tubos de antígeno y en aquellos que no contienen antígeno, puede considerarse como bueno para usarse si se encuentra que posee una actividad hemolítica suficiente, por la titulación subsiguiente del complemento. Cuando una inhibición mayor de hemólisis es notada en los tubos que contienen antígeno que en aquellos que no contienen, esto indica que la combinación antígeno-complemento no es satisfactoria.

14. Cuando la combinación antígeno-complemento no es satisfactoria, haga cualquiera de los siguientes procesos:

1. Análisis preliminar de otros lotes de suero.

2. Análisis preliminar con otro lote antígeno.

3. Use el suero-complemento y el antígeno analizados, agregando solución de clara de huevo al líquido cefalorraquídeo y a las reacciones cuantitativas con suero.

Segundo Análisis de los Sueros Anticomplementarios

(Método de Sachs modificado)

1. Caliente 0.5 c.c. de suero en baño de María a 56° C. durante 15 minutos. Si el suero ha sido previamente inactivado, vuelva a calentar durante 5 minutos.

2. Añada 4.1 c.c. de ácido clorhídrico exactamente titulado N/300 al suero e invierta varias veces. Deje reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

3. Centrifugue durante 10 minutos. Separe y guarde el líquido sobrenadante y deseche el sedimento.

4. Añada 0.4 c.c. de solución de cloruro de sodio al 10% al líquido sobrenadante. No es necesario neutralizar.

5. Prepare dos hileras de cinco tubos de ensayo cada una y numere del 1 al 5. La segunda hilera debe contener los controles del suero.

6. Pipetée 0.5 c.c. de solución salina en los tubos 3 y 4 y 2.0 c.c. en el tubo 5 de ambas hileras.

7. A ambas hileras:

Añada 1.0 c.c. de suero tratado al tubo 1.
Añada 0.5 c.c. de suero tratado a los tubos 2 y 3.
Mezcle el contenido del tubo 3 y pase 0.5 c.c. al tubo 4.
Mezcle el contenido del tubo 4 y pase 0.5 c.c. al tubo 5.
Mezcle el contenido del tubo 5 y deseche 2.0 c.c.

Los cinco tubos de cada hilera contienen respectivamente 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 y 0.0025 c.c. de suero.

8. Añada 0.2 c.c. de solución de clara de huevo al 50% ([3]) a cada uno de los cinco tubos de ambas hileras.

9. Añada 0.5 c.c. de dilución de antígeno a cada tubo de la primera hilera.

10. Añada 0.5 c.c. de solución salina a cada tubo de la segunda hilera.

11. Agite la gradilla con los tubos para mezclar y deje reposar a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.

---

(3) Si se usa complemento previamente analizado o si el complemento es diluído en solución de clara de huevo al 10%, puede omitirse la adición de solución de clara de huevo al 50%.

12. Añada 1.0 c.c. de complemento diluído [3] a todos los tubos de ambas hileras.

13. Agite la gradilla para mezclar y coloque en el refrigerador durante 15 a 18 horas de 6° a 8° C.

14. Complete la reacción en la forma descrita en "Reacciones Regulares Simplificadas" (página 101).

15. Anote el grado de hemólisis tanto en los tubos de análisis como en los de control.

16. Todos los tubos de la hilera posterior deberán mostrar hemólisis completa. Sin embargo, los primeros y segundos tubos que contienen 0.1 c.c. y 0.05 c.c. de suero, respectivamente, pueden mostrar una ligera inhibición de la hemólisis. Con sueros negativos los tubos correspondientes de la hilera del frente muestran el mismo grado de inhibición de la hemólisis y si el grado es ligero puede darse un informe negativo. Con los sueros positivos la inhibición de la hemólisis es mucho más notable en los tubos de la hilera del frente. Informe las reacciones como positivas, dudosas o negativas.

Segunda Reacción con Líquidos Cefalorraquídeos Anticomplementarios

1. Caliente el líquido cefalorraquídeo a 56° C. durante 15 minutos.

2. Prepare dos hileras de cinco tubos de ensayo cada una y numere del 1 al 5.

3. Pipetée 0.5 c.c. de solución salina en los tubos 2, 3, 4 y 5 de ambas hileras.

4. A ambas hileras:

Añada 0.5 c.c. de líquido cefalorraquídeo a los tubos 1 y 2.
Mezcle el contenido del tubo 2 y pase 0.5 c.c. al tubo 3.
Mezcle el contenido del tubo 3 y pase 0.5 c.c. al tubo 4.
Mezcle el contenido del tubo 4 y pase 0.5 c.c. al tubo 5.
Mezcle el contenido del tubo 5 y deseche 0.5 c.c.

5. Añada 0.2 c.c. de solución de clara de huevo al 50% [3] a cada uno de los cinco tubos de cada hilera.

6. Añada 0.5 c.c. de la dilución del antígeno a cada tubo de la primera hilera.

7. Añada 0.5 c.c. de solución salina a cada tubo de la segunda hilera.

---

(3) Ver la llamada N° 3 en la página 113.

8. Agite la gradilla con los tubos, para mezclar y deje reposar a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.

9. Añada 1.0 c.c. de complemento diluído ([3]) a todos los tubos de ambas hileras; agite la gradilla para mezclar, colocándola en el refrigerador durante 15 a 18 horas de 6° a 8° C. y complete la reacción en la forma descrita en "Reacciones Regulares Simplificadas" (página 101).

10. Interprete las reacciones de acuerdo con los siguientes ejemplos:

Primera hilera:	4 4 4 1 —	Positiva
Segunda hilera:	4 1 — — —	
Primera hilera:	4 3 2 — —	Positiva
Segunda hilera:	4 1 — — —	
Primera hilera:	4 1 — — —	Positiva
Segunda hilera:	1 — — — —	
Primera hilera:	4 4 2 — —	Negativa
Segunda hilera:	4 2 1 — —	
Primera hilera:	3 2 — — —	Negativa
Segunda hilera:	3 1 — — —	

Preparación del Antígeno de Kolmer

1. Pese 30 grms. de polvo de corazón de res. ([4])

2. Coloque el polvo en un frasco con tapón de vidrio o de corcho cubierto con papel de estaño.

3. Añada 100 c.c. de acetona químicamente pura.

4. Tape el frasco herméticamente y mezcle bien el contenido por agitación.

5. Guarde a temperatura ambiente durante 2 días, agitándolo un poco cada día.

6. Filtre a través de un papel filtro exento de grasa, exprimiendo ligeramente el tejido. Deseche el filtrado.

7. Pase el residuo a un frasco con tapón de cristal, añada 100 c.c. de acetona químicamente pura, tápelo herméticamente, mezcle bien y guárdelo a temperatura ambiente durante 2 días, agitándolo un poco cada día.

8. Filtre a través de un papel filtro exento de grasa, exprimiendo ligeramente el tejido. Deseche el filtrado.

---

(3) Ver la llamada N° 3 en la página 113.

(4) Obtenible en los Laboratorios Difco. Inc., Detroit, Mich.

9. Seque el residuo al aire hasta que quede exento de acetona y llévelo nuevamente a un frasco limpio con tapón de cristal.

10. Añada 200 c.c. de éter, tape herméticamente, mezcle bien, y guarde a temperatura ambiente durante 3 días agitándolo un poco diariamente.

11. Filtre a través de un papel filtro exento de grasa exprimiendo ligeramente el tejido, deseche el filtrado.

12. Seque el residuo al aire hasta que quede exento de éter y póngalo de nuevo en un frasco limpio.

13. Añada 100 c.c. de alcohol etílico absoluto, químicamente puro.

14. Tape el frasco herméticamente y mezcle bien su contenido por agitación.

15. Guárdelo a temperatura ambiente durante 5 días agitándolo cada día.

16. Filtre a través de un papel filtro exento de grasa exprimiendo ligeramente el tejido.

17. Mida el filtrado y filtre a través del tejido una cantidad suficiente de alcohol etílico absoluto para llevar el volumen del filtrado a 100 c.c.

18. Pese 0.4 grms. de colesterol y disuélvalos en 10 c.c. de éter.

19. Añada la solución de éter a los 100 c.c. de filtrado de alcohol.

20. Agite bien y colóquelo en el baño de María a 55° C. durante una hora para ayudar a la solución.

21. Deje en reposo a temperatura ambiente durante 2 días agitándolo un poco cada día.

22. Filtre a través de un papel filtro exento de grasa.

23. Guarde el antígeno a temperatura ambiente en la obscuridad y en un frasco herméticamente tapado.

Titulación del Antígeno

No es necesario hacer las titulaciones para determinar la actividad hemolítica y anticomplementaria del antígeno para la reacción de Kolmer (preparado en la forma descrita en este Manual). Sin embargo, es necesario determinar la potencia antigénica de cada lote de antígeno. Esto puede ser hecho en la siguiente forma:

1. Prepare una dilución de antígeno al 1:80 añadiendo gota a gota 0.1 c.c. de antígeno a 7.9 c.c. de solución salina en un pequeño frasco que es agitado.

2. Prepare otras cinco diluciones de antígeno mezclando solución salina y dilución de antígeno de acuerdo con las siguientes cantidades.

Tubo Nº	*Dilución de Antígeno*		*Solución Salina*		*Dilución final del antígeno*
1	4 c.c. 1:80				1:80
2	4 c.c. 1:80	+	4 c.c.	=	1:160
3	4 c.c. 1:160	+	4 c.c.	=	1:320
4	4 c.c. 1:320	+	4 c.c.	=	1:640
5	4 c.c. 1:640	+	4 c.c.	=	1:1280
6	4 c.c. 1:1280	+	4 c.c.	=	1:2560

3. Mezcle varios sueros medianamente postivos previamente calentados y prepare las diluciones en la forma siguiente:

Tubo Nº	*Suero (c.c.)*		*Solución salina (c.c.)*		*Dilución final del suero*
1	1.0	+	4.0	=	1:5
2	0.5	+	4.5	=	1:10
3	0.5	+	9.5	=	1:20
4	2 (1:20)	+	2.0	=	1:40
5	1 (1:20)	+	4.0	=	1:100

4. Prepare 30 tubos de ensayo (15 × 85 mm.) en cinco hileras de seis tubos cada una.

5. Añada sueros diluídos en la forma indicada en el cuadro 10

6. Añada antígeno diluído en la forma indicada en el cuadro 10.

7. Prepare un tubo de control de suero conteniendo 0.5 c.c. de suero 1:5 y 0.5 de solución salina y también un tubo de control de sistema hemolítico conteniendo 1.0 c.c. de solución salina.

8. Añada 1.0 c.c. de complemento diluído (conteniendo 2 unidades completas) a cada uno de los 32 tubos.

9. Agite suavemente los tubos y colóquelos entre 6° y 10° C. durante 15 a 18 horas y posteriormente a 37° C. (al baño de María) durante 10 minutos.

10. Retire los tubos del baño de María y añada 0.5 c.c. de hemolisina (2 unidades) y 0.5 c.c. de suspensión de glóbulos al 2% a cada tubo.

11. Mezcle por agitación suave y lleve de nuevo los tubos al baño de María a 37° C. durante una hora.

12. Retire los tubos del baño de María y apunte los grados de hemólisis anotados en la forma ilustrada en el cuadro 8. Los controles del sistema hemolítico y el suero deberán mostrar hemólisis completa.

Cuadro 10

Suero diluído (0.5 c.c.)	Antígeno diluído en cantidades de 0.5 c.c.					
	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
1:100	—	—	2+	—	—	—
1:40	—	1+	4+	4+	2+	1+
1:20	1+	4+	4+	4+	4+	1+
1:10	3+	4+	4+	4+	4+	2+
1:5	4+	4+	4+	4+	4+	3+

Nota: La dosis óptima de antígeno que debe ser empleada en las reacciones de Kolmer es de 0.5 c.c. de la dilución que dé una reacción de 4+ con la menor cantidad de suero. Si dos diluciones de antígeno dan reacciones iguales la dilución que debe usarse puede ser un promedio entre las dos. Si tres diluciones de antígeno son igualmente reactivas, la dilución media puede ser la óptima.

Antes de usar un antígeno nuevo es aconsejable practicar una serie de análisis comparativos, (cualitativo y cuantitativo) con sueros débilmente y fuertemente reactivo y negativo y con un antígeno de reactividad demostrada.

Antígenos Cardiolipina-Lecitina-Colesterol

El doctor Kolmer (1) indica que los siguientes antígenos pueden ser empleados en las reacciones de Kolmer en dosis de 0.5 c.c. de la dilución al 1:150.

Antígeno	Cardiolipina *Porcentaje*	Lecitina purificada *Porcentaje*	Colesterol *Porcentaje*
1	0.03	0.05	0.3
2	0.03	0.05	0.6
3	0.03	0.05	0.9
4	0.06	0.05	0.6
5	0.06	0.05	0.9
6	0.0175	0.0875	0.3

"En términos generales un antígeno preparado con 0.03% de cardiolipina, 0.05% de lecitina y 0.6% de colesterol es preferida como mezcla de máxima sensibilidad consistente y especificidad, en las reacciones con suero y con líquidos cefalorraquídeo".

Estos antígenos son usados en las reaciones de Kolmer en la misma forma que el antígeno regular de extracto de corazón de res.

Bibliografía

1. Kolmer, J. A.; Lynch, E. R.: Cardiolipin antigens in the Kolmer complement fixation test for syphilis. J. Ven. Dis. Inform, 29: 166-172, June 1948.

REACCIONES DE MICRO-FLOCULACION DE MAZZINI

Equipo y Cristalería

Equipo General

1. Máquina rotatoria.
2. Aparato para hacer anillos. Puede usarse el anillador de Fischer usando parafina con punto de fusión de 56° y 62° C.
3. Soportes para láminas. Hechos de algún material conveniente para acomodar de una a cuatro láminas de 2 × 3 pulgadas.
4. Agujas hipodérmicas, Calibre 25.

Cristalería

1. Láminas de vidrio de 2 × 3 pulgadas, con anillos de parafina de 15 mm. de diámetro interior, para examinar los sueros.
2. Frascos con tapón de vidrio, redondos de 30 c.c.
3. Láminas de vidrio con concavidades de 2 mm. de profundidad por 16 mm. de diámetro, para los exámenes de los líquidos cefalorraquídeos.
4. Jeringa, tipo Luer de 5 c.c.

Reactivos

1. Antígeno Mazzini colesterolizado. (Ver "Preparación del Antígeno Colesterolizado de Mazzini", pág. 127).
2. Solución salina al 1 por ciento amortiguada, pH 6.3 a 6.4:
   a. Preparar la solución de acuerdo con la siguiente fórmula:

Cloruro de sodio (Q.P.)	2.025 gramos
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.050
Fosfato disódico ($Na_2HPO_4 + 12\ HO$)	0.425
Agua bidestilada	250.0
Acido clorhídrico N/1	0.8
Formol (Merck)	0.25

   b. Se filtra la solución y se verifica el pH.

Preparación de los Sueros

1. Separe los sueros de los coágulos por centrifugación y pipeteo o decantado.

2. Caliente los sueros en el baño de María durante 30 minutos a 56° C. Los sueros deberán ser recalentados durante 10 minutos si se va a repetir el examen después de 4 horas del primer período de calentamiento.

3. Volver a centrifugar cualquier muestra a la cual se le hayan formado partículas visibles durante el calentamiento.

Reacción Cualitativa de Mazzini con Suero

1. Prepare el antígeno en la forma siguiente:

   a. Pipetée 3 c.c. de la solución salina amortiguada en el fondo de un frasco de 30 c.c.

   b. Con una pipeta de 1 c.c. graduada hasta la punta, mida 0.4 c.c. del antígeno colesterolizado.

   c. Sostenga el frasco con la mano izquierda e imprímale un movimiento rotatorio rápido, al mismo tiempo que llevando la pipeta con la mano derecha, se vacía con rapidez el antígeno directamente sobre la solución salina (el antígeno es soplado con la pipeta).

   d. Mezcle absorbiendo y soplando la suspensión con la pipeta dos o tres veces.

   e. Deje madurar la suspensión a la temperatura ambiente durante 3 horas. Después de este período de madurez la suspensión puede usarse en el trabajo del día.

   f. Agite la suspensión de antígeno suavemente con movimiento de abajo hacia arriba varias veces.

   g. Pase la suspensión a una jeringa de 5 c.c. con una aguja calibre 25.

2. Determine el ángulo a que debe sostenerse la jeringa para dar una gota de 0.01 c.c. de la suspensión.

3. Ejecute pruebas preliminares con controles en la siguiente forma:

   a. Coloque la lámina de vidrio con anillos de parafina en un soporte para láminas.

b. Pipetée 0.05 c.c de suero positivo, suero negativo y solución salina amortiguada dentro de cada anillo de parafina.

c. Añada una gota de la suspensión de antígeno (0.01 c.c.) a cada suero y a la solución salina.

d. Haga rotar en la máquina rotatoria durante 4 minutos.

Nota: Cuando la rotación se hace manualmente, se circunscribe a un círculo de dos pulgadas, 120 veces por minuto. Cuando se usa un rotador mecánico tipo Boerner, la velocidad equivalente es de 180 rotaciones por minuto.

e. Examine las reacciones al microscopio usando un aumento de 100 ×. El suero control positivo deberá mostrar una floculación completa de la suspensión del antígeno. El suero control negativo y solución salina deberán mostrar dispersión completa de la suspensión de antígeno y la presencia de un número óptimo de partículas de antígeno por campo.

4. Ejecute las pruebas con los sueros de la siguiente manera:

a. Coloque una lámina de vidrio con anillos de parafina en un soporte para láminas.

b. Pipetée 0.05 c.c. de cada suero dentro de cada anillo.

c. Añada una gota de la suspensión de antígeno (0.01 c.c.) a cada suero.

d. Haga rotar en la máquina rotatoria durante 4 minutos.

e. Lea cada reacción microscópicamente, y anote el grado de floculación de acuerdo con el siguiente cuadro:

Reacciones Típicas	Reacciones Atípicas
Negativa.....Ausencia de grumos. 1+.....Grumos muy pequeños. 2+.....Grumos pequeños. 3+.....Grumos de tamaño mediano. 4+.....Grumos grandes.	Notar las reacciones atípicas que están caracterizadas por partículas irregulares y agregados de varios tamaños en los cuales predominan los grumos pequeños y las partículas libres de antígeno.

f. Añada una segunda gota de la suspensión de antígeno a cada prueba que dé reacción de 1+, 2+ ó reacción atípica.

g. Haga rotar la lámina otra vez durante 4 minutos.

h. Examine microscópicamente. Si la reacción es más intensa después de haberle añadido la segunda gota de la suspensión de antígeno, anote el resultado más intenso. Pero si la reacción es la misma o más débil después de haberle agregado la segunda gota de la suspensión de antígeno, entonces se anota el resultado de la reacción original.

i. Repita la prueba en cada suero de reacción zonal que deje de dar reacción positiva con la segunda gota de la suspensión de antígeno, de la siguiente manera:

1) Pipetée 0.5 c.c. de solución salina amortiguada en cada uno de 5 tubos (numerados de 1 a 5).

2) Añada 0.5 c.c. de suero calentado al tubo 1 y mezcle.
Pase 0.5 c.c. del tubo 1 al tubo 2 y mezcle.
Pase 0.5 c.c. del tubo 2 al tubo 3 y mezcle.
Pase 0.5 c.c. del tubo 3 al tubo 4 y mezcle.
Pase 0.5 c.c. del tubo 4 al tubo 5 y mezcle.

3) Pipetée 0.05 c.c. de cada dilución de suero en la lámina con anillos de parafina.

4) Añada una gota de la suspensión de antígeno (0.01 c.c.) a cada dilución de suero.

5) Haga rotar la lámina durante 4 minutos.

6) Lea microscópicamente y anote los resultados como se describe en "Reacciones Típicas".

j. Informe los resultados de la siguiente manera:

Lectura	*Informe*
Negativo	Negativo.
1+	Dudoso.
2+	Dudoso.
3+	Positivo.
4+	Positivo.
Reacción Atípica	Positivo o dudoso (obtenido en cualquiera de los dos métodos suplementarios indicados).

Reacción Cuantitativa de Mazzini con Suero

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

a. Pipetée 0.5 c.c. de solución salina amortiguada en cada uno de 6 (o más) tubos. (La solución de sal no amortiguada al 0.9% es usada en Veneral Disease Research Laboratory.)

b. Añada 0.5 c.c. de suero calentado al primer tubo y mezcle.

c. Pase 0.5 c.c. de suero diluído del primero al segundo tubo y mezcle.

d. Continúe pasando y mezclando de un tubo al siguiente hasta que todas las diluciones hayan sido hechas. Deje la pipeta con la que se hizo la mezcla en el último tubo.

2. Pipetée 0.05 c.c. de cada dilución de suero en el anillo de parafina respectivo en una lámina de vidrio.

3. Añada una gota de suspensión de antígeno (suspensión de antígeno usada para la Reacción Cualitativa de Mazzini con Suero. (Véa página 122) a cada suero diluído sobre la lámina.

4. Haga rotar la lámina en un rotador mecánico durante 4 minutos.

5. Lea y anote las reacciones en la misma forma que para las reacciones cualitativas.

6. Informe los resultados de acuerdo con la mayor dilución de suero que da una reacción positiva (3+ ó 4+).

EJEMPLO:

Dilución de Suero						*Informe*
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
4	4	4	2	—	—	Positivo, dilución 1:8
4	3	1	—	—	—	Positvio, dilución 1:4
4	4	4	4	1	—	Positivo, dilución 1:16

REACCION CUALITATIVA DE MAZZINI CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

Equipo Adicional al Requerido para las Reacciones con Suero

1. Secador de aire caliente y soporte de acero con pinzas. Un secador ordinario para el cabello es satisfactorio y poco costoso.

2. Láminas de vidrio. Todas estas láminas de vidrio deberán tener concavidades, las cuales no deberán ser menores de 16 mm. de diámetro y 2 mm. de profundidad.

3. Cajas de Petri.

4. Pipetas de 0.2 c.c. graduadas en centésimos.

Preparación del Líquido Cefalorraquídeo

1. Analice el líquido cefalorraquídeo tan pronto como sea posible después de haberlo recogido. Los líquidos cefalorraquídeos sanguinolentos o muy contaminados no son satisfactorios para el examen. Los líquidos cefalorraquídeos son examinados sin calentamiento prèvio.

2. Centrifugue el líquido cefalorraquídeo recientemente extraído, a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos.

3. Decante a un tubo limpio el líquido sobrenadante.

Práctica de la Reacción Cualitativa de Mazzini con Líquido Cefalorraquídeo

1. Prepare una solución de ácido acético al 6%.

2. Pipetée exactamente 0.01 c.c. de ácido acético al 6% con una pipeta de 0.2 c.c. graduada en centésimos, en un lado de tantas concavidades de una lámina de vidrio como líquidos cefalorraquídeos vayan a ser examinados.

3. Deposite 0.1 c.c. de líquido cefalorraquídeo (con una pipeta de 1 c.c.) en el lado opuesto de la concavidad en la que el ácido ha sido puesto.

4. Mezcle uniformemente el ácido y el líquido cefalorraquídeo sobre la superficie de la concavidad con un aplicador de madera.

5. Haga rotar el soporte de la lámina sobre una superficie plana con un movimiento circular durante 1 minuto aproximadamente.

6. Añada una gota de la suspensión del antígeno (suspensión del antígeno usada para la Reacción Cualitativa de Mazzini con Suero). (Véa página 122) a cada mezcla de líquido cefalorraquídeo-ácido acético.

7. Haga rotar el soporte de la lámina a mano durante 10 minutos a 120 r.p.m. o en un rotador mecánico durante 10 minutos a 180 r.p.m.

8. Léa e informe las reacciones en la misma forma descrita para la "Reacción Cualitativa de Mazzini con Suero" (Véa página 122).

9. Informe las reacciones positivas (3+ y 4+) sin hacer más análisis. Los líquidos céfalorraquídeos que producen reacciones negativas o dudosas (1+ y 2+) son analizados nuevamente después de concentración por el uso del secador de aire caliente.

10. Preparación del líquido cefalorraquídeo concentrado:
    a. Coloque aproximadamente, 30 c.c. de agua fría en una placa de Petri.

b. Pipetée 1.5 c.c. de líquido cefalorraquídeo en el fondo de un vaso de precipitado de 50 c.c.

c. Coloque el vaso en el centro de la caja de Petri conteniendo el agua.

d. Ajuste el secador en el soporte de acero y colóquelo a una distancia de 2 cm. arriba del vaso con la manecilla del secador marcando aire caliente.

e. Evapore el flúido hasta el volumen de 0.2 c.c. a 0.3 c.c. Esto se logra en 6 a 8 minutos.

11. Proceda a analizar el líquido cefalorraquídeo concentrado, exactamente en la misma forma usada en el líquido cefalorraquídeo no tratado.

12. Lea y anote las reacciones observadas en términos de positiva, dudosa o negativa.

13. Informe la reacción obtenida con líquido cefalorraquídeo concentrado.

REACCION CUANTITATIVA DE MAZZINI CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

1. Prepare diluciones en serie de líquido cefalorraquídeo (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc.), en la forma descrita en "Reacción Cuantitativa de Mazzini con Suero" (párrafo 1, página 124).

2. Analice cada dilución en la forma indicada para la reacción cualitativa de Mazzini con líquido cefalorraquídeo (véa página 125).

3. Léa y anote la reacción observada con cada dilución del líquido cefalorraquídeo.

4. Informe las reacciones observadas en términos de la mayor dilución que dé una reacción cuantitativa de Mazzini con suero (véa página 124).

Preparación del Antígeno Colesterolizado de Mazzini
Preparación del Extracto de Antígeno

Reactivos

1. Polvo deshidratado de corazón de res. (1)
2. Polvo de yema de huevo. Este puede ser comprado en cualquier empresa mayorista digna de confianza.

---

(1) Obtenible en los Laboratorios Difco Inc., Detroit, Mich.

3. Eter. Puede ser usado cualquier éter anestésico de alta calidad.

4. Acetona, calidad reactiva.

5. Alcohol etílico absoluto.

Procedimiento

1. Pese 20 grms. de polvo deshidratado de corazón de res y 10 grms. de yema de huevo en polvo.

2. Coloque los polvos en un frasco, con tapón de vidrio, de 500 c.c. y añada 200 c.c. de éter anestésico.

3. Tape herméticamente el frasco y agítelo con un agitador mecánico durante 5 minutos o a mano durante 15 minutos.

4. Filtre a través de un papel filtro de tejido mediano, exento de grasa, de 24 cms. Recoja y guarde todos los filtrados usando un papel filtro nuevo para cada filtración.

5. Repita la extracción y la filtración cuatro veces más, usando 100 c.c. de éter en cada vez.

6. Después de la última extracción, extienda el polvo húmedo sobre una hoja limpia de papel filtro.

7. Deje secar el polvo a temperatura ambiente hasta que quede exento de olor a éter.

8. Pase el polvo seco a un frasco de 500 c.c. con tapón de vidrio.

9. Añada 80 c.c. de alcohol absoluto y agite en un agitador mecánico durante 4 horas o deje en reposo a temperatura ambiente durante 3 días, agitando tres veces al día durante cinco minutos.

10. Filtre a través de un papel filtro exento de grasa de 24 cms. y de textura media, a un frasco de boca amplia, de 100 c.c., con tapón de vidrio. Deseche el polvo.

11. Coloque los filtrados etéreos combinados en un plato de evaporación, grande (8.5" de diámetro).

12. Coloque el plato en el baño de María a 55° ó 56° C. y evapore el éter hasta que no suban ya las burbujas a la superficie del líquido. Al mismo tiempo caliente 100 c.c. de acetona de 55° a 56° C. en el baño de María.

13. Vierta la acetona rápidamente en los extractos etéreos concentrados.

14. Agite bien con una espátula de acero e inmediatamente decante en dos tubos de centrífuga de 50 c.c.

15. Centrifugue a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos.

16. Decante la acetona y deseche.

17. Añada 10 c.c. de acetona fresca a cada tubo. Agite con una varilla de vidrio e invierta cada tubo unas cuantas veces con la palma de la mano sobre la boca del tubo.

18. Decante y deseche la acetona.

19. Recoja los lipoides insolubles en acetona con una espátula y añádalos al extracto alcohólico obtenido en la maniobra 10.

20. Coloque el frasco en el baño de María de 55° a 56° C. durante 30 minutos. Agite suavemente a intervalos frecuentes.

21. Enfríe el frasco en el refrigerador durante 30 minutos.

22. Filtre a través de papel filtro exento de grasa, de tejido fino. Separe por filtración cualquier precipitado que pueda aparecer durante el reposo. La cepa de extracto de antígeno está ya lista para su titulación.

Titulación del Antígeno

Determinación de la Proporción Optima Lipoide-Colesterol

1. Coloque 5 tubos de ensayo 13 × 100 mm. en una gradilla y numérelos del 1 al 5.

2. Pipetée 0.1 c.c. de la solución madre de extracto de antígeno directamente al fondo de cada tubo.

3. Pipetée 0.9 c.c. de alcohol colesterolizado al 1.0% en el primer tubo, 1.4 c.c. en el segundo tubo, 1.9 c.c. en el tercer tubo, 2.4 c.c. en el cuarto tubo y 2.9 c.c. en el quinto tubo. Mezcle bien los contenidos de cada tubo. Estos representan las proporciones de la salución madre-colesterol de 1:10, 1:15, 1:20, 1:25 y 1:30.

4. Tome cinco frascos de 30 c.c. y rotúlelos 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, y 1:30, respectivamente.

5. Prepare las suspensiones de cada una de las cinco proporciones exactamente en la forma descrita en "Reacción Cualitativa de Mazzini con Suero" (página 122).

6. Deje reposar las suspensiones a temperatura ambiente durante 3 horas.

7. Al terminar la titulación preliminar del antígeno deberán hacerse análisis para determinar la proporción óptima final, analizando las proporciones de lipoide a colesterol entre 1:10 y 1:15 o entre 1:15 y 1:20, etc.

Ensayo de las Suspensiones

1. Agite suavemente cada suspensión, del fondo de la botella al tapón varias veces.

2. Pase cada suspensión a una jeringa de 5 c.c. ajustada a una aguja de calibre 25. Analice 30 sueros que se supongan normales con cada uno de los cinco antígenos, exactamente en la forma descrita en "Reacción Cualitativa de Mazzini con Suero" (Página 122).

3. Deseche sin hacer más análisis aquellas proporciones de antígeno que muestren cualquier grado de floculación con estos sueros.

4. Elija para análisis posteriores, con sueros reactivos, aquellas proporciones en las que el examen microscópico muestre partículas muy finas completamente dispersadas sin la menor huella de floculación.

Determinación de la Calidad Antígena de la Suspensión.

1. Elija cuando menos tres sueros débilmente positivos.

2. Analice cada suero con cada una de las proporciones que dieron reacciones satisfactorias con sueros negativos.

3. Examine al microscopio. Mientras más alta sea la proporción lipoide-colesterol, más sensible será la reacción y mayores los floculados.

4. Para obtener sensibilidad máxima, elija como título la preparación más alta que no cause ningún grado de floculación en presencia de sueros negativos.

5. Si se desea una suspensión de antígeno menos sensible se escogerá una proporción más baja.

6. Prepare una cantidad suficiente de antígeno colesterolizado para las necesidades aproximadas de un mes.

REACCIONES DE REIN-BOSSAK

REACCION DE FLOCULACION EN LAMINA DE REIN-BOSSAK (Nº 1)

Equipo y Cristalería

Equipo General

1. Rotador tipo Boerner.
2. Anillador (para parafina) operado a mano o tipo eléctrico.
3. Soporte de madera o de metal para sostener de 1 a 4 láminas de 2 × 3″.
4. Agujas hipodérmicas calibre 25, biseladas, que rindan aproximadamente 120 gotas por centímetro cúbico cuando la jeringa y la aguja sean sostenidas verticalmente.

Cristalería

1. Frascos de 30 cc. (1 onza), cilíndricos, con tapón de vidrio o con tapón de corcho cubierto con papel de estaño.
2. Lámina de vidrio de 2 × 3″ con 12 anillos de parafina de 14 milímetros de diámetro aproximadamente.
3. Tubos de centrífuga 3 × 1″ con el fondo redondo.
4. Jeringas de vidrio de 1 ó 2 c.c. de capacidad.

Reactivos

1. Antígenos:

Una solución de cardiolipina-lecitina conteniendo 0.2 por ciento de cardiolipina y aproximadamente 1.3 por ciento de lecitina purificada en alcohol absoluto, estandarizada previamente frente a un antígeno similar de reactividad conocida. Guárdese en la obscuridad a temperatura ambiente.

2. Solución salina al 0.9%:

Disuelva 9 grms. de cloruro de sodio de calidad reactiva en 1.000 c.c. de agua destilada.

3. Agua destilada (pH aproximadamente 6.0):
Hierva y enfríe a temperatura ambiente antes de usar.

4. Solución de colesterol al 1%:

Disuelva un gramo de colesterol (Pfanstiehl- exento de ceniza) en 100 c.c. de alcohol absoluto.

Preparación de los Sueros

1. Separe el suero del coágulo por medio de centrifugación y pipeteo o decantación.

2. Caliente en baño de María a 56° C. durante 30 minutos. Enfríe hasta temperatura ambiente antes de usar. Los sueros que se conservan hasta el día siguiente deberán ser nuevamente calentados durante 10 minutos.

Preparación de la Emulsión de Antígeno

1. Pipetée 0.8 c.c. de agua destilada (hervida y enfriada a temperatura ambiente) en un frasco cilíndrico de 30 c.c.

2. Sostenga el frasco con el fondo hacia la mesa y al mismo tiempo que le imprime un movimiento de rotación rápido vierta directa y rápidamente sobre el agua destilada 0.9 c.c. de colesterol al 1% con una pipeta de 1 c.c.

3. Continúe la rotación durante 15 segundos.

4. Mida 0.1 c.c. de antígeno cardiolipina-lecitina con una pipeta de 0.1 c.c. ó 0.2 c.c.

5. Añada el antígeno al frasco soplando el contenido de la pipeta.

6. Tape el frasco y sacúdalo vigorosamente durante un minuto golpeando rápidamente el fondo del frasco contra la palma de la mano.

7. Añada 2.5 c.c. de solución salina al 0.9%.

8. Sacuda el frasco con fuerza moderada durante 1 minuto.

9. Pase 3.0 c.c. de antígeno emulsionado a un tubo de centrífuga de fondo redondo de 3 × 1".

10. Coloque el tubo conteniendo la emulsión de antígeno en el baño de María a 56° C. durante 15 minutos.

11. Saque el tubo que contiene la emulsión, del baño de María y centrifugue a 1,800 r.p.m. durante 15 minutos en una centrífuga IEC Nº 1.

12. Saque el tubo de la centrífuga e inviértalo rápidamente para desechar el líquido turbio sobrenadante.

13. Limpie las paredes del tubo con un pedazo de gasa o de algodón para quitar el exceso de líquido.

14. Añada 3.0 c.c. de solución salina al 0.9%.

15. Resuspenda el sedimento por medio de agitación suave.

Reacción Cualitativa con Suero

1. Pipetée 0.05 c.c. del suero calentado en un anillo de lámina de vidrio anillada con parafina.

2. Añada una gota (aproximadamente 1/120 c.c.) de la emulsión de antígeno al suero.

3. Haga rotar durante 4 minutos en un rotador tipo Boerner a 180 r.p.m.

4. Haga el examen microscópico inmediatamente después de la rotación.

5. Informe el grado de floculación observada, en la siguiente forma:

Lectura	*Informe*
No hay grumos	Negativo
Grumos muy pequeños	±
Grumos pequeños	1+
Grumos de tamaño mediano	2+
Grumos medianamente grandes	3+
Grumos grandes	4+

Las reacciones ±, 1+ y 2+ son anotadas como "débilmente positivas"; las reacciones 3+ y 4+ son anotadas como "positivas".

Reacciones Zonales

Las reacciones atípicas son caracterizadas por unos cuantos grumos irregulares entremezclados con partículas no floculadas. Vuelva a analizar los sueros que den reacciones atípicas en la siguiente forma:

1. Pipetée 0.5 c.c. de solución salina al 0.9% en cinco tubos (numerados del 1 al 5).

2. Añada 0.5 c.c. de suero calentado al tubo 1 y mezcle.
   Pase 0.5 c.c. del tubo 1 al tubo 2 y mezcle.
   Pase 0.5 c.c. del tubo 2 al tubo 3 y mezcle.

Pase 0.5 c.c. del tubo 3 al tubo 4 y mezcle.
Pase 0.5 c.c. del tubo 4 al tubo 5 y mezcle.

3. Analice cada dilución de suero en la misma forma descrita en Práctica de la Reacción Cualitativa (página 126).

4. Haga la lectura microscópica e informe el análisis que dió la reacción más fuerte obtenida en cualquiera de las 5 diluciones.

Reacción Cuantitativa con Suero

1. Prepare diluciones del suero en serie (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc., en la forma antes descrita para las "Reacciones Zonales".

2. Analice cada dilución de suero en la forma descrita bajo "Reacción Cualitativa con Suero" (página 133).

3. Infórmese como punto cuantitativo final la dilución más alta que haya dado una reacción 4+. Estos resultados son reportados en "diluciones (2) en la forma que a continuación se ilustra:

EJEMPLO:

	Diluciones del Suero						*Informe*
Suero no diluido	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	*Diluciones*
4	4	4	4	2	1	—	8
4	4	4	4	4	—	—	16
4	—	—	—	—	—	—	1

Bibliografía

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

2. HARRIS, A.: Quantitative serologic tests for syphilis. I. A. standar method of reporting. J. Ven. Dis. Inform., 28:249-252, Nov. 1947.

REACCIONES VDRL

REACCIONES DE FLOCULACION EN LAMINA VDRL (1, 2)

Equipo y Cristalería

Equipo general

1. Rotador mecánico.
2. Anillador.
3. Jeringa tipo Luer de 1 ó de 2 c.c.
4. Agujas hipodérmicas calibre 23, de bisel largo o calibre 22 con bisel regular.

Cristalería

1. Láminas de 2 × 3" con anillos de parafina con diámetro interior de 14 a 15 mm.
2. Frascos con tapón de vidrio o con tapón de rosca (recubierto con papel de estaño o vinylite), redondos, de 30 c.c.
3. Jeringa tipo Luer de 1 o de 2 c.c.

Preparación del Antígeno

El antígeno para esta prueba es una solución alcohólica que contiene 0.03% de cardiolipina, 0.9% de colesterol y suficiente lecitina purificada para producir un reactivo estándar. Cada lote de antígeno debe ser estandarizado serológicamente por comparación adecuada con un antígeno de reactividad conocida (1, 2).

El antígeno es proporcionado en frascos de color café con tapón de rosca (recubierto con lámina de estaño o vinylite) y es guardado a la temperatura ambiente. Los componentes de este antígeno quedan en solución a temperaturas normales de modo que cuando se nota cualquier precipitado indica cambios debidos a factores tales como la evaporación o la adición de materiales conducidos por las pipetas. Los antígenos que contengan precipitados deben ser rechazados.

Preparación del Suero

El suero claro, obtenido por la centrifugación de sangre total coagulada es, calentado a 56° C. durante 30 minutos o de 60° a 62° C. durante 3 minutos antes de ser analizado. Todos los sueros son analizados al ser sacados del baño de María y aquellos que se hallan con partículas de impurezas son nuevamente centrifugados. Los sueros que deban ser analizados después de 4 horas de haber sido calentados, deberán ser nuevamente calentados a 56° C. durante 10 minutos.

Preparación de la Solución Salina

La solución salina amortiguada que contiene uno por ciento de cloruro de sodio es preparada en la siguiente forma:

Formol neutro calidad reactivo c.c.	0.5
Fosfato disódico ($Na_2HPO_4 + 12\ H_2O$), grams.	0.093
Fosfato monopotásico (KH_2PO_2), grms.	0.170
Cloruro de sodio, A. C. S., grms.	10.0
Agua destilada c.c.	1,000.0

Esta solución da lecturas en el potenciómetro de pH 6.0 ± 0.1 y es guardada en frascos con tapón de rosca o con tapón de vidrio.

Una solución salina al 0.9 por ciento se prepara añadiendo 900 mg. de cloruro de sodio seco por 100 c.c. de agua destilada.

Preparación de las Láminas de Vidrio

Las láminas nuevas se limpian con jabón Bon Ami, el cual se quita con un paño suave después de seco. A las láminas usadas previamente se les quita la parafina, se lavan con jabón, enjuagándolas hasta que queden libres de jabón y se tratan entonces como las láminas nuevas.

Las láminas de vidrio son manejadas por sus bordes mientras se les lava para evitar impresiones dactilares grasosas sobre las superficies en que se va a hacer el análisis. El suero se extiende dentro de los círculos en láminas limpias. Cuando el suero no se extienda es una indicación de que la lámina no está limpia y por lo tanto no debe ser usada.

Los anillos de parafina son hechos pasando parafina calentada a las láminas por medio de moldes de metal. (1)

(1) Los anilladores de mano o automáticos de tipo eléctrico pueden ser conseguidos en A. H. Thomas and Co., Philadelphia, Pa.

Preparación de la Emulsión de Antígeno

1. Pipetée 0.4 c.c. de solución salina amortiguada en el fondo de un frasco redondo de 30 c.c. con tapón de vidrio o de rosca.

2. Añada 0.5 c.c. de antígeno (de la mitad de una pipeta de 1 c.c. graduado hasta la punta) directamente sobre la solución salina mientras se imprime un movimiento de rotación suave pero continuo de la botella sobre una superficie plana.

Nota: El antígeno es añadido gota a gota pero rápidamente de modo que se permita la salida de ½ c.c. de antígeno en 6 segundos. La punta de la pipeta deberá quedar en el tercio superior del frasco y la rotación no deberá ser suficientemente fuerte para mojar la pipeta con la solución salina.

3. Sople la última gota de antígeno de la pipeta sin que la pipeta toque la solución salina.

4. Continúe la rotación de la botella durante 10 segundos más.

5. Añada 4.1 c.c. de solución salina amortiguada de una pipeta de 5 c.c.

6. Tape el frasco y agite vigorosamente durante 10 segundos aproximadamente.

7. La emulsión del antígeno está lista para su uso y puede ser usada durante un día. Esta cantidad (5 c.c.) es suficiente para 250 análisis serológicos aproximadamente.

Puede prepararse el doble de esta cantidad de emulsión de antígeno de una vez, en un frasco de 30 c.c., usando cantidades dobles de antígeno y de solución salina. Una pipeta de 10 c.c. deberá ser usada en este caso para medir un volumen de 8.2 c.c. de solución salina. Si se necesitan cantidades mayores de emulsión de antígeno deberá ser preparada más de una mezcla. Estas partes alícuotas pueden ser reunidas para los análisis.

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

El número de partículas de antígeno por campo microscópico es determinado por el tamaño de la gota de emulsión de antígeno usado. Por esta razón la aguja que se usa debe ser revisada cada día.

La emulsión del antígeno es vertida con una aguja hipodérmica calibre 22 bisel regular o con una de calibre 23 de bisel largo, insertada a una jeringa de 1 ó 2 c.c. La emulsión se deja en el frasco cuando no se usa. De 1c.c. de la emulsión de antígeno deben ser obtenidas 60 gotas;

esto puede ser logrado sosteniendo la jeringa de modo que el bisel de la aguja quede hacia abajo y la superficie de goteo horizontal (figura 1). A medida que el ángulo en que se sostiene la jeringa es aumentado la superficie de goteo disminuye y por lo tanto el tamaño de la gota disminuye también. Cualquiera que sea el método que se use para añadir el antígeno, es de importancia capital que la cantidad apropiada (1/60 c.c.) sea usada en cada análisis.

Con práctica se podrá añadir rápidamente la emulsión de antígeno, pero se tendrá cuidado en ejercitarse para obtener gotas del mismo tamaño. Cuando se guarde el antígeno, antes de volverlo a usar, deberá mezclarse suavemente la emulsión de antígeno imprimiendo un movimiento de rotación al frasco y llenando y vaciando la jeringa.

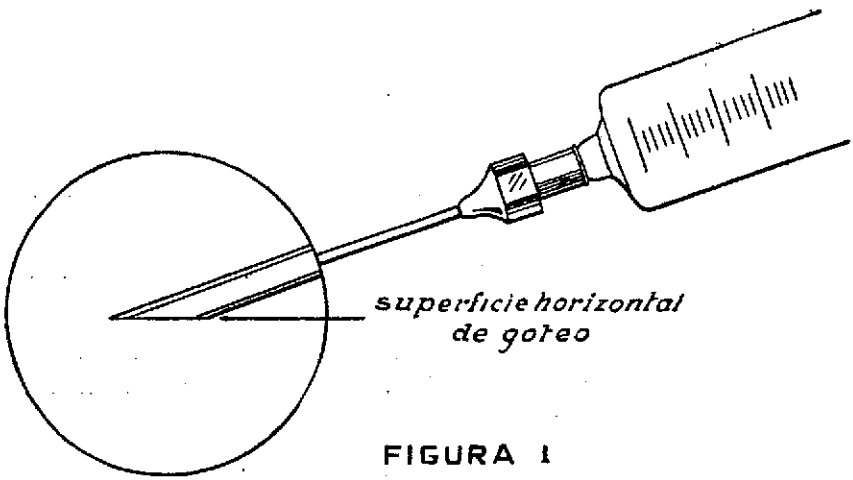


FIGURA 1

Análisis Preliminar de la Emulsión de Antígeno

Cada preparación de emulsión de antígeno deberá ser primero examinada analizando sueros conocidos positivos y negativos. Esto puede ser logrado añadiendo una gota de emulsión de antígeno a 0.05 c.c. de cada suero y completando el análisis como se describe en "Reacción Cualitativa con Suero" (página 139). Estos análisis deberán dar resultados típicos positivo y negativos respectivamente y las dimensiones y el número de partículas de antígeno por campo microscópico en el suero negativo deberán ser óptimos.

Si las partículas de antígeno en el suero negativo parecen ser demasiado grandes, la razón podrá ser habitualmente hallada en la forma de preparar la emulsión del antígeno. Una emulsión de antígeno no satisfactoria no deberá ser usada.

Reacción Cualitativa con Suero

1. Pipetée 0.05 c.c. de suero calentado, a un anillo de la lámina de vidrio, anillada con parafina.

2. Añada una gota (1/60 de c.c.) de emulsión de antígeno a cada suero.

3. Haga la rotación de las láminas durante 4 minutos. (Si la rotación es hecha a mano sobre una superficie plana, este movimiento deberá circunscribirse aproximadamante a un círculo de 2" de diámetro y 120 veces por minuto (2).

4. Las reacciones son leídas inmediatamente después de la rotación.

Nota: Siempre se incluyen controles conocidos de suero positivo, ligeramente positivo y negativo.

Lectura e Informe de los Resultados de las Reacciones

Las reacciones son leídas microscópicamente con objetivo a seco débil a 100 diámetros de aumento. Las partículas de antígeno aparecen con la forma de bastones cortos a este aumento. El agregado de estas partículas en grumos grandes o pequeños es interpretado como grados de positividad.

Lectura	*Informe*
No hay grumos o sólo hay ligera floculación.	Negativo (N).
Pequeños grumos	Débilmente positivo (DP).
Grumos medianos y grandes	Positivo (P).

Solo se deberá usar los términos "Positivo", "Débilmente Positivo" y "Negativo" para informar los resultados de este análisis.

Las reacciones zonales debidas a un exceso del componente reactivo del suero son reconocidas por grumos irregulares y pérdida de los bordes característicos de los grumos. La reacción positiva habitual es caracterizada por la presencia de grumos pequeños y grandes de tamaño bastante uniforme. La experiencia permitirá la diferenciación que debe hacerse entre este tipo de reacciones y el aspecto zonal en el que los grumos grandes o pequeños puedan estar entremezclados con partículas libres del antígeno.

---

(2) El rotador tipo Boerner vendido por A. H. Thomas and Co., Philadelphia, Pa., e instalado a 180 r. p. m., puede también ser usado para este análisis.

En esos casos o siempre que se sospeche una reacción de tipo zonal, el suero en cuestión deberá ser diluído al 1:5 y 1:25 y nuevamente analizado. La reacción máxima producida por cualquiera de estas diluciones si es mayor que la obtenida con suero no diluído es reportada en el resultado del análisis. Las diluciones pueden ser preparadas colocando 0.4 c.c. de solución salina en cada uno de dos tubos, añadiendo 0.1 c.c. de suero calentado al tubo 1, mezclando bien y pasando 0.1 c.c. al tubo 2.

Reacción Cuantitativa con Suero

Las reacciones cuantitativas son practicadas en diluciones en serie, de suero en solución salina, de las cuales cada dilución es tratada como si fuera un suero individual y analizada en la forma descrita en "Reacción Cualitativa con Suero" (pág. 139).

La solución salina al 0.9 por ciento recientemente preparada es usada para estas diluciones. Las diluciones del suero son preparadas poniendo 0.5 c.c. de solución salina en cada uno de 6 ó más tubos. Al tubo 1 se le añade 0.5 c.c. de suero calentado, se mezcla bien y se pasan 0.5 c.c. al tubo 2. Se continúa esta operación hasta que el 6º ó el último tubo contenga 1 c.c. En esta forma se obtienen diluciones al 1:2, 1:4, 1:8 1:16, etc. Cada dilución de suero es analizada en la forma descrita en "Reacción Cualitativa con Suero" (página 139).

Lectura e Informe de la Reacción Cuantitativa

1. Las reacciones son leídas microscópicamente a 100 diámetros en la forma descrita para el procedimiento cualitativo.

2. Los resultados son informados en términos de la mayor dilución de suero que produce una reacción POSITIVA (NO LIGERAMENTE POSITIVA), de acuerdo con el ejemplo siguiente:

Diluciones del suero						*Informe*
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
P	P	P	D.P.	N	N	Positivo, dilución 1:8 u 8 dils (3).
P	D.P.	N	N	N	N	Positvo, dilución 1:2 ó 2 dils (3).
D.P.	N	N	N	N	N	Positivo, (1) solo sin diluir o 1 dil (3).

(1) La reacción positva obtenida con suero no diluído.

Nota: En condiciones de alta temperatura y humedad baja, como se presentan a veces durante los meses de verano en algunas

áreas, la emulsión de antígeno deberá ser guardada en el refrigerador. Para evitar que la superficie se seque en estas condiciones, las pruebas deberán ser hechas y leídas tan rápidamente como sea posible.

REACCION DE FLOCULACION VDRL EN TUBOS (4)

Equipo General:

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

2. Una lámpara fluorescente o de tipo cuello de ganso para la lectura.

Antígeno

Antígeno para prueba de floculación en lámina VDRL (ver "Preparación del Antígeno" página 135).

Preparación de las soluciones salinas

1. Se prepara una solución salina amortiguada al 1.0 por ciento como para la prueba de floculación en lámina VDRL ("véase Preparación de la Solución Salina", página 136).

2. La solución de cloruro de sodio no amortiguada al 1 por ciento es preparada añadiendo 1 grm. de cloruro de sodio seco a cada 100 c.c. de agua destilada.

Preparación del suero

El suero claro obtenido por centrifugación de sangre total coagulada, es calentado a 56°C durante 30 minutos o de 60° a 62° durante 3 minutos antes de ser analizado. Todos los sueros son examinados al ser sacados del baño de María y aquellos que tienen partículas de impurezas son nuevamente centrifugados.

Los sueros que deban ser analizados más de 4 horas después de haber sido calentados deberán ser calentados nuevamente a 56°C durante 10 minutos.

Preparación de la Emulsión de Antígeno

1. Prepare la emulsión de antígeno en la forma descrita para las reacciones de floculación en lámina VDRL (véase pág. 135).

2. Añada 4 partes de solución de cloruro de sodio al 1 por ciento a 1 parte de la emulsión del análisis en lámina VDRL. Mezcle bien y déjelo en reposo durante 5 minutos o más (no más de 2 horas) antes de usarlo. Esta solución será mencionada como emulsión diluída de antígeno.

Reacción Cualitativa con Suero

1. Pipetée 0.5 c.c. de suero calentado en un tubo de ensayo de 12 X 75 mm. (diámetro exterior).

2. Añada 0.5 c.c. de emulsión de antígeno a cada suero.

3. Agite los tubos en un agitador de Kahn durante 5 minutos.

4. Centrifugue todos los tubos durante 10 minutos a una fuerza equivalente a 2,000 r. p. m., en una centrífuga IEC Nº 1 ó 1,700 r. p. m., en una centrífuga Nº 2.

5. Lleve los tubos al agitador de Kahn y agite **exactamente** durante 1 minuto.

Lectura e Informe de la Reacción Cualitativa

1. Lea las reacciones **tan pronto como el 2º período de agitación haya terminado,** sosteniendo los tubos cerca de la pantalla de una lámpara de lectura frente a un fondo negro y aproximadamante al nivel de los ojos. Una lámpara fluorescente de escritorio o una lámpara tipo cuello de ganso con un foco azul es una fuente de luz satisfactoria para la lectura.

2. Anote los resultados en la siguiente forma:

Positivo ..... Agregados visibles en un medio claro o ligeramente turbio. Todas las reacciones que están en los límites en los que el observador tenga dudas en relación con la floculación visible deberán ser informadas como negativas.

Negativo ..... No hay floculación o agregación visible de las partículas del antígeno. Aspecto ligeramente turbio o granuloso, aparición del moaré cuando se hace agitación suave.

Nota: Los sueros turbios o hemolizados pueden originar que cuando los análisis sean terminados la lectura sea demasiado turbia para la lectura macroscópica. El líquido de estos tubos puede ser examinado microscópicamente. Los informes positivos pueden ser dados cuando sean descubiertas microscópicamente grandes masas de partículas de antígeno, cuando el suero analizado está exento de partículas al mismo aumento microscópico.

Las reacciones zonales debidas a un exceso de componente reactivo del suero pueden aparecer como muy débiles y en algunos casos negativos. Cuando se sospecha una reacción zonal deberá hacerse otro análisis usando 0.1 c.c. de suero calentado y 0.4 c.c. de solución salina, en lugar de los 0.5 c.c. de suero original. Si se obtiene un resultado positivo con la cantidad más pequeña de suero, deberá informarse como positivo.

Reacción Cuantitativa con Suero

1. Pipetée 0.5 c.c. de solución salina al 0.9 por ciento recientemente preparada en cada uno de 6 ó más tubos de ensayo (12 X 75 mm.).

2. Añada 0.5 c.c. de suero calentado al primer tubo y mezcle.

3. Pase 0.5 c.c. del primer tubo al segundo y mezcle.

4. Continúe pasando 0.5 c.c. de cada tubo al tubo siguiente y mezclando hasta que se haya llegado al último tubo.

5. Deseche 0.5 c.c. del último tubo.

6. Añada 0.5 c.c. de emulsión de antígeno diluída a cada tubo y proceda en la forma descrita en "Reacción Cualitativa con Suero". (Pág. 139).

Lectura e Informe de la Reacción Cuantitativa

La mayor dilución de suero que produce una reacción definitivamente positiva es informada como el punto final de reactividad de acuerdo con el siguiente ejemplo:

Diluciones del suero						*Informe*
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
P	P	P	P	N	N	Positivo, dilución 1:16 ó 16 dils (3).
P	P	N	N	N	N	Positivo, dilución 1:4 ó 4 dils (3).
N	N	N	N	N	N	Potisivo[1], solo sin diluir ó 1 dil (3).

P = Positivo
N = Negativo

REACCION VDRL CON LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (5)

Equipo General

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

Antígeno

1. Antígeno para la reacción en lámina VDRL (véa "Preparación del Antígeno", página 135).

Preparación de Soluciones Salinas

1. La solución salina al 1.0 por ciento se prepara como para la reacción de floculación en lámina VDRL (véa página 135).

2. Solución de cloruro de sodio al 10%.

---

(1) La reacción positiva obtenida con suero no diluído.

a. Disuelva 10 gramos de cloruro de sodio seco (químicamente puro) en 100 c.c. de agua destilada.

Preparación del Líquido Cefalorraquídeo

1. Centrifugue y decante cada líquido cefalorraquídeo. Los líquidos cefalorraquídeos visiblemente contaminados o que contienen sangre no resultan satisfactorios para la prueba.

2. Caliente el líquido cefalorraquídeo a 56° C. durante 15 minutos. Déjelo enfriar a la temperatura ambiente antes de analizarlo.

Preparación de la Emulsión de Antígeno Sensibilizado

1. Prepare la emulsión de antígeno como se describe para la reacción de floculación en lámina VDRL (véa "Preparación de Emulsión de Antígeno", página 137).

2. Añada un volumen de solución de cloruro de sodio al 10% a un volumen de la emulsión de antígeno de la reacción de emulsión en láminas VDRL.

3. Mezcle bien y deje reposar por lo menos durante 15 minutos, pero no más de dos horas, antes de usarse.

Reacción Cualitativa con Líquido Cefalorraquídeo

1. Pipetée 1 c.c. de líquido cefalorraquídeo calentado en un tubo de ensayo de 13 X 100 mm. Incluya controles positivos y negativos del líquido cefalorraquídeo para cada análisis.

2. Añada 0.2 c.c. de emulsión de antígeno sensibilizada a cada líquido cefalorraquídeo. Vuelva a suspender la emulsión de antígeno sensibilizada inmediatamente antes de usarla, invirtiendo el frasco varias veces.

3. Agite las gradillas con tubos en un agitador mecánico de Kahn durante 15 minutos.

4. Centrifugue todos los tubos durante 5 minutos a una fuerza equivalente a 1.800 r. p. m., en una centrífuga IEC Nº 1 ó a 1.600 r. p. m., en una Nº 2.

5. Lleve los tubos nuevamente al agitador de Kahn y agite **exactamente** durante 2 minutos.

Lectura e Informe de la Reacción Cualitativa

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

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

2. Informe los resultados en la siguiente forma:

Positivo.....Agregados definitivamente visibles suspendidos en un medio acuoso claro o turbio.

Negativo.....No hay agregado, dispersión completa de las partículas, aspecto turbio o ligeramente granuloso.

Reacciones Cuantitativas con Líquido Cefalorraquídeo

1. Preparar las diluciones del líquido cefalorraquídeo en la siguiente forma:

a. Pipetée 1 c.c. de solución de cloruro de sodio al 0.9 por ciento en cada uno de 5 ó más tubos.

b. Añada 1 c.c. de líquido cefalorraquídeo calentado al tubo 1, mezcle bien y pase 1.0 c.c. al tubo 2.

c. Continúe mezclando y pasando de un tubo al siguiente hasta que el último contenga 2.0 c.c. Deseche 1.0 c.c. del último tubo. Las proporciones respectivas de las diluciones son: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc.

2. Analice cada dilución de líquido cefalorraquídeo en la forma descrita en "Análisis Cualitativo del Líquido Cefalorraquídeo".

Lectura e Informe del Análisis Cuantitativo

1. Cada tubo es leído en la forma descrita en "Reacción Cualitativa del Líquido Cefalorraquídeo".

2. Informe los resultados del análisis en términos de la dilución más alta del líquido cefalorraquídeo que produce una reacción positiva. El término "dils" que expresa el mismo punto final de reactividad en la dilución, puede ser aplicado.

EJEMPLO:

Dilución del Líquido Cefalorraquídeo					*Informe*
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
P	P	P	N	N	Positivo, dilución 1:8 u 8 dils (3).
P	P	P	P	N	Positivo, dilución 1:16, ó 16 dils (3).
N	N	N	N	N	Positivo[1], solo sin diluir, o 1 dil (3).

N = Reacción Negativa.
P = Reacción Positiva.

(3) Reacción positiva con líquido cefalorraquídeo no diluído en la reacción cualitativa.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS EN EL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (6)

Equipo y Cristalería

Equipo

1. Colorímetro fotoeléctrico equipado con un filtro azul de aproximadamente 420 mm. de longitud de onda.
2. Celdillas para el colorímetro fotoeléctrico con capacidad para 5.0 c.c.

Cristalería

1. Tubos de ensayo, 13 × 100 mm. (diámetro exterior).

Reactivos

1. Solución al 10% de ácido tricloracético:

   Disuelva 10 grms. de ácido tricloracético (Q. P.) en 100 c.c. de agua destilada. Filtre en un frasco con tapón de vidrio y guarde a temperatura ambiente.

2. Suero estándar:
   Seleccione suero exento de gran contaminación bacteriana o hemólisis y determine la concentración de proteína total por análisis de Kjeldahl.

Preparación del Líquido Cefalorraquídeo

Centrifugue el líquido cefalorraquídeo y decante. Los líquidos cefalorraquídeos que contienen gran contaminación bacteriana o sangre no son satisfactorios para su análisis.

Práctica del Análisis

1. Pipetée 2.5 c.c. de líquido cefalorraquídeo en un tubo de ensayo de 13 × 100 mm.

2. Añada 2.5 c.c. de solución al 10% de ácido tricloracético.

3. Invierta el tubo 2 veces para mezclar su contenido. Evite la formación de espuma.

4. Deje reposar el tubo durante 10 minutos a 37° C. en el baño de María.

Nota: Datos no publicados indican que la precipitación de la proteína por la solución de ácido tricloracético es influenciada por va-

riantes de temperatura, por lo tanto, se recomienda el uso del baño de María a 37° C.

5. Vuelva a invertir el tubo y vierta el líquido en la celdilla del colorímetro fotoeléctrico.

6. Determine el porcentaje de transmisión luminosa para el líquido, usando un testigo de agua a 100% de transmisión.

7. Convierta la transmisión del líquido a miligramos por ciento de proteína total con referencia a la carta de calibración.

Nota: Los líquidos cefalorraquídeos que contienen altas concentraciones de proteína deberán ser diluídos con solución de cloruro de sodio al 0.9 por ciento antes de ser analizado de modo que se obtengan valores de trasmisión luminosa mayores de 30 por ciento. Los valores obtenidos en la carta de calibración son entonces multiplicados por el factor de dilución.

Preparación de la Carta de Calibración

1. Prepare soluciones de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 miligramos por ciento de proteína de un suero estándar.

EJEMPLO: Si el contenido de proteína del suero (Kjeldahl) es de 7,325 miligramos por ciento para hallar el factor de dilución para 60 miligramos por ciento estándar, divida 7,325: 60.

$$\frac{7{,}325}{60} = 122, \text{ ó sea el factor de dilución.}$$

Por lo tanto, una parte de suero es diluído con 121 partes de solución de cloruro de sodio al 0.9 por ciento para hacer una solución estandar a 60 miligramos por ciento.

2. Analice cada solución estándar en la misma forma descrita para el líquido cefalorraquídeo.

3. Represente los valores de trasmisión luminosa así obtenidos en papel semilogarítmico.

4. Dibuje una línea que una a los puntos sobre la gráfica.

5. También puede prepararse una carta de conversión que muestre el valor de proteína para cada lectura posible de transmisión luminosa.

Bibliografía

1. HARRIS, A.; ROSENBERG, A. A.; RIEDEL, L. M.: A microflocculation test for syphilis using cardiolipin antigen. Preliminary Report. J. Ven. Dis. Inform., 27: 169-174, July 1946.

2. Harris, A.; Rosenberg, A. A.; Del Vecchio, E.: The VDRL slide flocculation test for syphilis. M. A. supplementary report. J. Ven. Dis. Inform., 29: 72-75, March 1948.

3. Harris, A.; Quantitative serologic tests for syphilis. I. A. standard method of reporting. J. Ven. Dis. Inform., 28: 249-252, Nov. 1947.

4. Harris, Ad.; Rosenberg; A. A.; Del Vecchio, E. R.: A macroflocculation test for syphilis using cardiolipin-lecithin antigen. J. Ven. Dis. Inform., 29: 313-316, October 1948.

5. Rosenberg, A. A.; Harris, A.; Harding, V. L.: A macroflocculation spinal fluid test employing cardiolipin-lecithin antigen. J. Ven. Dis. Inform., 29: 359-361, Dec. 1948.

6. Bossak, H. N.; Rosenberg, A. A.; Harris, A.: A quantitative turbidimetric method for the determination of spinal fluid protein. J. Ven. Dis. Inform., 30: 100-103, April 1949.

APENDICE

RECOLECCION Y PRESERVACION DE SANGRE DE CARNERO

El método que a continuación se expresa para recolectar y preservar sangre de carnero ha sido usado en el Venereal Disease Research Laboratory durante varios años con resultados satisfactorios.

Equipo y Cristalería

1. Matraz Erlenmeyer de 2 litros para el sangrado, ajustado con un tapón de hule Nº 10 con 2 perforaciones; filtro embudo (1" de diámetro y con vástago de 2½"); tubos de hule y de vidrio y aguja hipodérmica calibre 13 (figura 1).

2. Equipo consistente en tubos de hule, pinza, frasco-ampolla para el llenado y tubo filtro de hule (figura 2).

Reactivo

1. Solución de citrato de sodio al 3.8 por ciento:
   Disuelva 3.8 grms. de citrato de sodio (ACS) para cada 100 c.c. de agua destilada. 60 c.c. de esta solución son necesarios para cada 50 c.c. de sangre de carnero, recolectada.

Ajuste del frasco de sangrado

1. Marque con un lápiz graso en el Erlenmeyer de 2 litros una señal en los 880 c.c. de volumen. Esto servirá para la colección de 400 c.c. de sangre en 480 c.c. de solución citratada. Pueden ser calculadas proporciones más pequeñas.

2. Vierta 480 c.c. de solución de citrato de sodio al 3.8 por ciento dentro del frasco.

3. Corte un pequeño pedazo de tela de alambre y colóquelo en el embudo. Sujete un pedazo de gasa sobre la boca del embudo como se muestra en la figura 1a.

4. Ajuste el matraz de sangrado en la forma mostrada en la figura 1, insertando el tapón del aparato de sangrado en el frasco y sujetándolo con cuerdas.

5. Esterilice toda la unidad a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Recolección de la Sangre

1. Inmovilice al carnero en posición de pie.

2. Levante la cabeza del carnero hasta que su nariz y el centro del cuello formen una línea recta.

3. Voltee la cabeza del carnero ligeramente y corte la lana en el área de la punción.

4. Aplique presión digital sobre el hueso del cuello para causar la dilatación de la vena yugular externa.

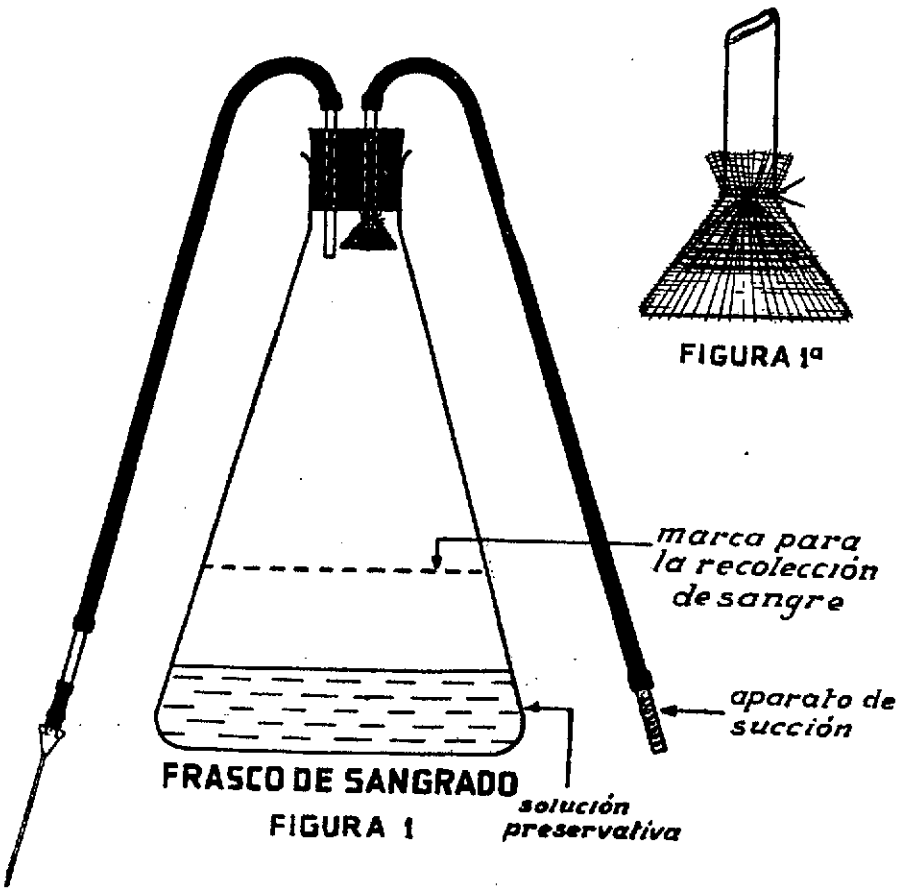


FIGURA 1

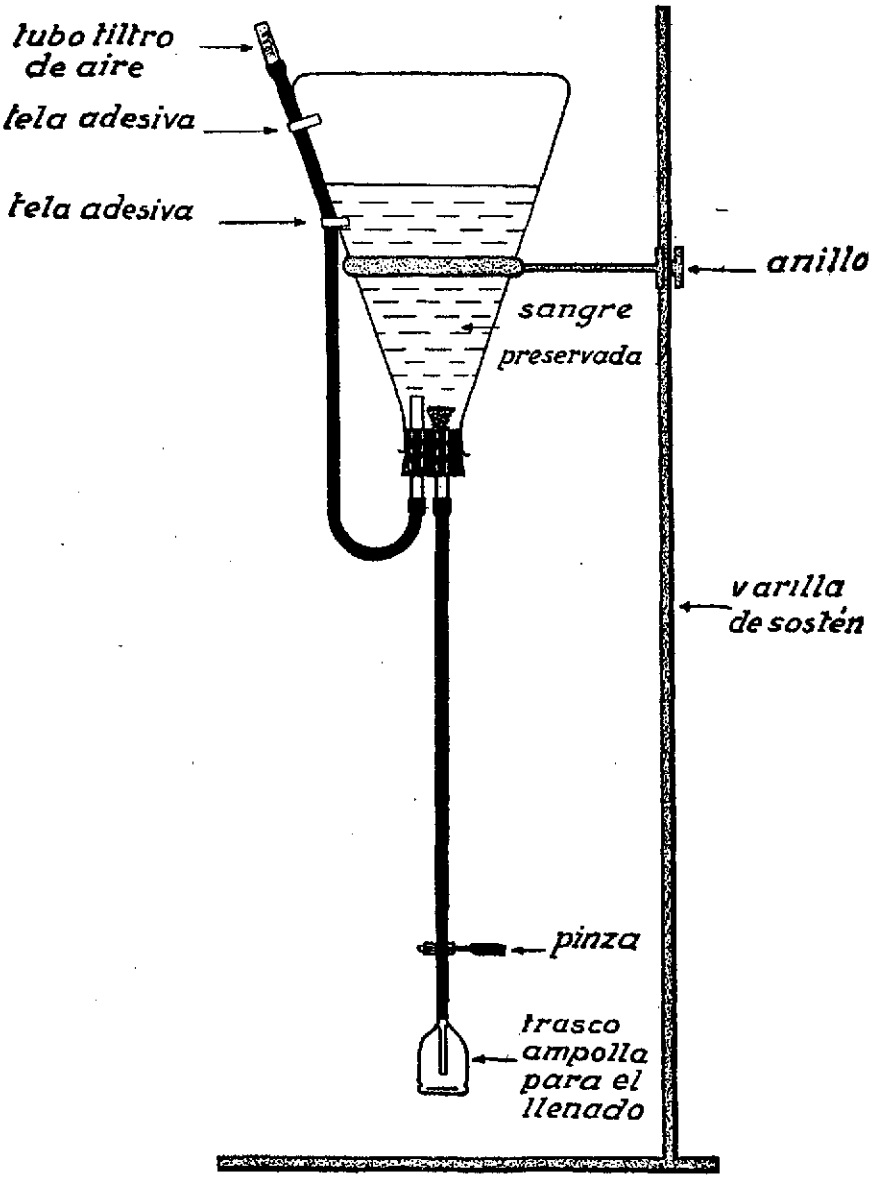
5. Esterilice el área directamente colocada sobre la vena, con solución débil de yodo o con alcohol al 70 por ciento.

6. Aplique la presión digital inmediatamente abajo del punto en el que se va a hacer la punción e inserte la aguja estéril en la piel y después en la vena.

7. Mueva el frasco contínuamente durante la recolección de sangre y después, durante 5 minutos para evitar la coagulación.

8. Deje enfriar la sangre a la temperatura ambiente.

9. Vuelva a colocar el aparato de vidrio para la succión con el frasco-ampolla previamente esterilizado en la forma que se muestra en la fi-



APARATO DE DISTRIBUCION

FIGURA 2

gura 2. Reemplace la aguja hipodérmica con un pedazo de tubo de vidrio estéril llenado con algodón estéril sin apretar el algodón (tubo filtro de aire, figura 2).

10. Invierta y suspenda el frasco en la forma mostrada en la figura 2.

11. Vierta asépticamente la sangre en botellas estériles con tapón de hule y guárdelas en el refrigerador.

12. Saque la mezcla de sangre de esos frascos con una jeringa y con una aguja estériles a medida que se requiera.

Nota: La sangre de carnero de buena calidad recolectada y guardada en la forma descrita es satisfactoria para su uso por un período de más de 3 meses.

Bibliografía

1. PORTNOY, J.; BOSSAK, H. N.; HARRIS, A.: Preservation of sheep red cells for complement-fixation tests. I. An improved method. J. Ven Dis. Inform., 28: 137-141, July 1947.
2. BOSSAK, H. N.: An apparatus for the aseptic collection and dispensing of sheep blood. Am. J. Clin. Path., 19: 496-498, May 1949.

PREPARACION DE LA HEMOLISINA (GLOBULOS ROJOS DE CARNERO)

El siguiente método para la producción de hemolisina de glóbulos rojos de carnero en los conejos ha sido usado con éxito durante varios años en el Venereal Disease Laboratory:

1. Elija conejos grandes y sanos. El color del pelaje no es importante, pero las venas son localizadas más fácilmente en los albinos.

2. Prepare suspensiones de glóbulos de carnero lavando los glóbulos rojos del carnero con 8 a 10 volúmenes de solución salina al 0.9 por ciento, 2 a 3 veces y resuspendiendo los glóbulos hasta la concentración deseada en solución salina al 0.9 por ciento.

3. Inocule a cada conejo, con la suspensión de glóbulos de carnero lavados, por la vena marginal de la oreja 6 veces de acuerdo con el siguiente esquema. Las inyecciones son practicadas con intervalos de 3 a 4 días, generalmente los lunes y viernes de cada semana.

Inyección 1 ..... 2 c.c. de suspensión de células al 10%
Inyección 2 ..... 4 c.c. de suspensión de células al 10%
Inyección 3 ..... 5 c.c. de suspensión de células al 10%
Inyección 4 ..... 5 c.c. de suspensión de células al 10%
Inyección 5 ..... 5 c.c. de suspensión de células al 20%
Inyección 6 ..... 5 c.c. de suspensión de células al 20%

Nota: Cada conejo es inoculado subcutáneamente con 0.5 c.c. de suspensión de glóbulos de carnero para ser usada ese día, 15 a 30 minutos antes de que la inyección intravenosa sea practicada.

La suspensión de glóbulos para la inyección intravenosa es calentada a la temperatura ambiente o a la temperatura del cuerpo e inyectada lentamente con una aguja calibre 25.

4. Las pruebas de sangrado son hechas 7 a 9 días después de la última inyección, perforando la vena marginal de la oreja con un estilete y recolectando en un pequeño tubo aproximadamente un c.c. de sangre.

5. El suero es separado de las sangres para la prueba por centrifugación después de que la coagulación haya terminado.

6. Cada suero de conejo es titulado en busca de su contenido en hemolisina por el método descrito en la técnica de fijación de complemento de Kolmer (página 100).

7. Desangre a los conejos que tengan una unidad de titulación hemolisina, a la dilución de 1:5,000 o mayor.

8. Separe los sueros de las sangres coaguladas, reúnalos y mézclelos y presérvelos por medio de la adición de un volumen igual de glicerina.

USO DEL MERTIOLATO COMO PRESERVATIVO

Los especímeces suero o de líquido cefalorraquídeo muy contaminados no son satisfactorios para los análisis serológicos para investigar sífilis. Los efectos de la contaminación bacteriana casual de los líquidos orgánicos sobre los resultados serológicos no son previsibles.

Aun cuando el líquido cefalorraquídeo es obtenido usualmente con un cuidado razonable, por lo que se refiere a esterilidad, muchos líquidos remitidos por correo a los laboratorios centrales, especialmente durante los meses calurosos del año, muestran evidencias de gran contaminación bacteriana a su llegada. La eliminación de bacterias en los líquidos cefalo rraquídeos contaminados por medio de centrifugación o de filtración, sólo es parcialmente efectiva, ya que algunos de los productos del metabolismo bacteriano son solubles y los cambios en los componentes del líquido cefalorraquídeo original no pueden ser corregidos o compensados.

El uso de mertiolato como agente bacteriostático para la preservación del líquido cefalorraquídeo ha sido reportado (1). Este compuesto (etil-mercuritiosalicilato de sodio [1]) inhibe el crecimiento bacteriano sin intervenir en el mecanismo de los análisis serológicos usuales para investigar sífilis, ya sea a través de la acción química o de la introducción de un factor diluyente.

La serie de tubos conteniendo mertiolato puede ser preparada en la siguiente forma:

1. Prepare la cantidad necesaria de solución de mertiolato el día en que vaya a ser usada, por adición de 1 grm. de polvo de mertiolato para 100 c.c. de agua destilada. No use las tinturas o soluciones comercialmente preparadas.

2. Pipetée 1 c.c. de solución acuosa de mertiolato al 1 por ciento en el fondo de tubos de 13 X 100 mm.

3. Coloque los tubos en un desecador al vacío sobre cloruro de calcio a temperatura ambiente y protegidos de la luz. La deshidratación termina habitualmente en 24 horas si se obtiene un vacío adecuado.

4. Prepare corchos parafinados sumergiendo los corchos en parafina caliente, pero no humeante, durante 1 minuto y quite el exceso de los corchos, rodándolos sobre una tela mientras están calientes.

5. Saque los tubos del desecador y tápelos herméticamente con los corchos parafinados.

6. Guarde los tubos en la obscuridad y podrán ser usados durante varios meses.

La concentración de mertiolato obtenido cuando se añaden de 2 a 8 c.c. de líquido cefalorraquídeo a estos tubos es suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano durante el transporte.

Los tubos más pequeños (12 X 75 mm.) preparados en esta forma y que contienen un miligramo de mertiolato son adecuados para el envío de 2 c.c. a 4 c.c de suero.

Bibliografía

1. Harris Ad; Mahoney, J. F.: Merthiolate as an effective bacteriostatic agent in spinal fluid specimens. Ven. Dis. Inform., 25: 46, Feb. 1944.

(1) Obtenible en Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind.

INFORME DE LOS RESULTADOS SEROLOGICOS CUANTITATIVOS

Los métodos para informar los resultados de los análisis cuantitativos han sido escogidos por los serólogos autores de cada análisis. La terminología usada para informar estos resultados no es similar para todos los métodos; por esta razón un método sencillo de informes que pueda ser aplicado a todos los análisis cuantitativos de floculación y fijación del complemento, utilizando diluciones de suero de líquido cefalorraquídeo es presentado (1).

El informe cuantitativo no es similar para los distintos y múltiples análisis para investigar sífilis, aun en aquellos casos en donde se use un término común como es el de "unidades". Las unidades de un procedimiento de análisis pueden no tener una relación constante con las unidades de otro, por este motivo los hallazgos idénticos en 2 ó más análisis pueden resultar, en informes de valores numéricos, diferentes. Esto puede ser visto comparando los distintos informes que pueden proceder del resultado de un solo análisis cuantitativo cuando se aplican distintos métodos de informe.

Para ilustrar este punto se usará una situación hipotética en la cual un espécimen dé reacciones positivas en diluciones al 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 y reacciones dudosas a la dilución 1:32 y a mayores diluciones, los resultados son negativos en cada uno de cuatro métodos de análisis. Si se usan las técnicas de Kahn, Kolmer, Eagle y Kline, los resultados serán en las proporciones de 64, 64, 24 y 16, respectivamente.

Las diferencias en los títulos informados en estos casos son atribuíbles a los métodos diferentes de cálculo e interpretación, aplicados a los resultados observados. Es más deseable que las variaciones de títulos en los análisis cuantitativos serológicos para investigar sífilis reflejen los cambios en la reactividad del espécimen, ya que estos análisis son practicados con el único propósito de cuantificar el componente reactivo de los sueros o de los líquidos cefalorraquídeos. Cualquier método de informe fácilmente comprensible, aplicable a todas las técnicas de análisis de este tipo serviría para el útil propósito de disminuir la confusión que en ocasiones se origina, para la aplicación clínica de estos resultados de laboratorio.

Una presentación sencilla en términos numéricos de la mayor dilución en que la muestra analizada produjo una reacción positiva en el análisis designado, se presenta como el tipo más lógico de informe serológico cuantitativo. Esta forma de informar, ahora prescrita por algunos técnicos, es aplicable a otros procedimientos de dilución. Sin embargo, es necesario que el valor de estos informes sea acompañado por alguna palabra

o frase explicativa de modo que pueda ser diferenciada del término serológico variable de "unidades".

Se sugiere, por lo tanto, que las reacciones serológicas cuantitativas sean informadas en términos de la mayor dilución, en la cual la muestra analizada produce una reacción positiva y que el término "dils", que es una contracción de la palabra "diluciones", sea usado para identificar este punto final de dilución reactiva. Con este propósito el punto final de reactividad sería el de los resultados descritos como "positivos" por la técnica usada. Por estos medios las reacciones de intensidad idéntica recibirían el mismo informe en términos de "dils" aún cuando se empleen distintos métodos de análisis.

Una anotación de "16 dils", anexado al informe de un análisis serológico cuantitativo para investigar sífilis, indicaría que la muestra analizada produjo reacciones positivas en diluciones hasta 1:16 incluída, pero no mayor que ésta. Una muestra que reaccione positivamente sólo en forma no diluída sería informado como reactor a "1 dil". En la siguiente Tabla se presenta una comparación estre éste y otros métodos de informar.

Muestra 1 **Reacción: Positiva en dilución de 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16; dudosa en dilución de 1:32; negativa a mayores diluciones.**			**Muestra 2** **Reacción: Positiva en dilución de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32; dudosa en dilución de 1:64, negativa en mayor dilución.**		
Reacciones	**Informes**		**Reacciones**	**Informes**	
	Método técnico	**Método Recomendado**		**Método técnico**	**Método Recomendado**
		Dils			*Dils*
Kahn.....	**64 unidades ....**	**16**	**Kahn.....**	**128 unidades ...**	**32**
Kolmer....	**64 unidades ....**	**16**	**Kolmer....**	**128 unidades ...**	**32**
Eagle.....	**Título de reagina 24, o dilución positiva a 1:24 ..**	**16**	**Eagle.....**	**Título de reagina 48, o dilución positiva a 1:48 ..**	**32**
Kline.....	**16 unidades ....**	**16**	**Kline.....**	**32 unidades ...**	**32**
Mazzini...	**Dilución positiva a 1:16 .....**	**16**	**Mazzini...**	**Dilución positiva a 1:32 .....**	**32**

El método aquí recomendado para informar los resultados de los análisis serológicos cuantitativos para investigar sífilis es sencillo, ya que el valor numérico indica la mayor dilución a la cual se halló que la muestra producía una reacción positiva y porque el término "dils" indicará al mé-

dico que reciba el informe serológico, que sólo fué considerado el factor dilución.

Sin embargo, pueden presentarse varios argumentos contra el uso de este método de informe; uno de estos puede ser el de que un punto final o de estimación de la reactividad más fino sería deseable y que podría ser logrado usando factores interpolantes entre las reacciones positiva y dudosa. Otro es el de que cada zona de dilución representa 4 valores de lectura, es decir, 1+, 2+, 3+ y 4+, de modo que el número informado debería ser 4 veces el punto final de dilución.

La precisión de las "reacciones de exactitud", como es empleado, en el análisis de especímenes diluídos en serie, es limitada. Para informar los resultados obtenidos en esta forma en una serie de divisiones muy pequeñas sólo aumenta la falta absoluta de reproductibilidad inherente a los procedimientos de análisis serológicos. El multiplicar el factor de dilución por 4 también puede llevar a la falsa impresión de niveles relativos de reactividad de la muestra. Cuando este método es usado solamente para uno de dos análisis las "unidades" informadas son 4 veces mayores para uno de ellos, aun cuando ambos procedimientos de análisis sean de igual sensibilidad.

Ya que los puntos finales de reactividad de dilución de suero son comúnmente usados para informar los resultados de los análisis de aglutinación y precipitina para la fiebre tifoidea, paratifoidea, tifo y otras enfermedades, muchas personas están familiarizadas con el significado de este tipo de informe de laboratorio. Un método estandarizado de informe cuantitativo, de los análisis serológicos para investigar sífilis que siga el mismo patrón será rápidamente comprendido y aceptado.

Bibliografía

1. HARRIS, AD: Quantitative serologic tests for syphilis. I. A standard method of reporting. J. Ven. Dis. Inform., 28: 249-252, Nov. 1947.

* U. S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 1949—829688