

UNIVERSIDAD NACIONAL

FACULTAD
DE CIENCIAS MÉDICAS

GUATEMALA, C. A.

LA REACCION DE FIJACION
EN LA TUBERCULOSIS

TESIS

presentada a la Junta Directiva de la
Facultad de Ciencias Médicas de la
Universidad Nacional

por

CARLOS ALBERTO CASASOLA,

Ex-practicante por oposición de los
Hospitales General, San José y de Amatitlán.

En el acto de su investidura de
MEDICO Y CIRUJANO.

NOVIEMBRE, 1943.

INTRODUCCION

Solamente después de haber vencido grandes dificultades pudo la reacción de fijación, aplicada a la tuberculosis, entrar en el campo de la medicina práctica. Diversas causas habían impedido su éxito: unas de orden general, las otras debidas a errores de técnica.

La clínica, apoyándose en siglos de observación, quería permanecer soberana en materia de diagnóstico. Al laboratorio apenas se le permitía proporcionar algunos datos auxiliares para completar un examen.

Sin embargo, en tuberculosis, a veces el oído más fino puede encontrarse en dificultades para descubrir signos físicos, puesto que el bacilo de Koch puede localizarse en lugares inaccesibles a la exploración por nuestros órganos sensoriales.

La reacción de fijación, con la sensibilidad que es propia a los reactivos biológicos, puede ayudar a nuestros órganos de percepción.

Sin usurparle al clínico su papel de juez, la reacción, cuando es positiva, puede transformar una duda en certidumbre; negativa, puede hacer disipar el temor a la tuberculosis, que es tan frecuente en nuestro medio. Sin embargo, muchos fisiólogos opusieron durante largo tiempo una resistencia no disimulada para adoptar la reacción de fijación como medio de diagnóstico en la tuberculosis, pues creían abdicar de sus cualidades clínicas al aceptar un consejo del laboratorio.

Otra causa que contribuyó a retardar que se generalizara la reacción, fué que se le exigió dar luces que no estaban en su papel poderlas otorgar. Algunos fisiólogos no se contentaron con tener en ella la presencia o ausencia de un proceso tuberculoso; ellos deseaban además, conocer los caracteres de este proceso; si la lesión se encontraba en un estado evolutivo o no; si la lesión podía comprometer la vida del enfermo; en una palabra, buscaron en la reacción los elementos para el pronóstico.

Otros fueron aún más lejos y quisieron traducir la reacción en fórmulas matemáticas.

Siendo de esta manera la reacción inexactamente interpretada, ocasionó grandes decepciones a algunos clínicos, quienes la acusaron de falsa é inútil.

Fisiólogos eminentes observaron casos en los que había un desacuer-

do completo entre el laboratorio y la clínica. Encontraron la reacción positiva en sujetos sanos y por el contrario, negativa en individuos atacados fuertemente por el bacilo de Koch. Para explicar esto surgieron dos hipótesis posibles: la reacción de fijación no era específica, o la técnica empleada no era rigurosa.

La especificidad de los anticuerpos tuberculosos está fuera de duda. Tal hecho se atestigua por los animales que se sacrifican al mismo tiempo que se procede al examen de su suero. Ya sean cobayos o conejos nuevos o inoculados; ya sean perros o vacas sanas o tuberculosas, la armonía entre la reacción de fijación y el estado de los órganos es perfecta en una proporción de casi 100% de los casos.

Quedaba solamente la cuestión de la técnica. Hay que convenir en que ésta es muy delicada. El que practica una reacción de fijación, aplicada a la tuberculosis, debe conocer perfectamente bien los reactivos necesarios; debe recordarse también que se exigen manipulaciones minuciosas, parecidas a las que reclama el análisis cuantitativo de un producto químico.

Llenando estas condiciones, se puede estar seguro que los malentendidos entre el laboratorio y la clínica desaparecerán.

HISTORIA

Los primeros en aplicar la reacción de desviación del complemento en el diagnóstico de la tuberculosis fueron Widal y Le Sourd, en el año de 1901. Utilizaron como antígeno bacilos de Koch homogéneos y pusieron en evidencia una sensibilisatriz específica en el suero de los tuberculosos.

Durante el mismo año, Camus y Pagniez obtuvieron resultados comparables utilizando tuberculina como antígeno.

En 1903, Bordet y Gengou notaron la presencia de anticuerpos tuberculosos en el suero de los cobayos que habían sido inoculados con bacilos tuberculosos aviarios.

En 1904, Dembinski observó que solamente los animales inoculados con bacilos aviarios poseían en sus sueros anticuerpos tuberculosos. Esta observación fué combatida dos años más tarde por Gengou, quien demostró que los cobayos tuberculizados por bacilos humanos o aviarios, muertos por temperaturas de 65° ó 100°, presentaban en sus sueros, anticuerpos que podían ser descubiertos utilizando cualquiera de estas dos clases de bacilos.

Wassermann y Bruck en 1906, encontraron sensibilisatrices en el suero de enfermos tuberculosos tratados por la tuberculina. Estas sensibilisatrices no eran, sin embargo, específicas puesto que pueden también ser puestas en evidencia en el suero de algunos sífilíticos.

En 1907, Citron observó desviaciones del complemento positivas, en cobayos tuberculizados y sangrados al aparecer los primeros signos de la tuberculosis. Usó como antígeno la tuberculina de Koch.

Durante los años de 1908 y 1909, numerosos autores buscaron la presencia de anticuerpos en el suero de enfermos tuberculosos, tanto tratados como no tratados por la tuberculina. En 183 exámenes se obtuvieron los siguientes resultados: 106 sueros de tuberculosos no tratados dieron 74 reacciones positivas (69%); 44 sueros de sujetos sanos dieron 9 reacciones positivas (20%) y 33 sueros de tuberculosos tratados por tuberculina dieron 23 reacciones positivas (69%).

En 1909, Rolly notó que algunos sueros de enfermos no tuberculosos

daban también reacciones positivas. Las observó con los sueros de sífilíticos y tíficos.

Estos primeros trabajos dieron resultados poco halagadores. La utilidad de la reacción de fijación aplicada a la tuberculosis parecía muy limitada, pues no daba ninguna enseñanza práctica sobre el diagnóstico de la enfermedad. Fueron Calmette y Massol y más tarde Besredka, quienes con sus experiencias, hicieron que esta reacción entrara en una nueva fase de aplicaciones prácticas.

En 1911, Calmette y Massol preconizan una técnica rigurosa, que es actualmente aceptada en la gran mayoría de los laboratorios. Usan una dosis fija de suero y de antígeno y dosis crecientes de alexina. Prepararon un antígeno muy sensible y específico, al que denominaron «antígeno peptonado B2». Dicho antígeno es un filtrado de una maceración de bacilos tuberculosos en solución de peptona de Witte al 10%. Con dicho antígeno se ha logrado poner en evidencia las más pequeñas fracciones de anticuerpos contenidos en los sueros de enfermos tuberculosos.

Besredka propuso en 1913, utilizar como antígeno un cultivo de bacilos tuberculosos, de cuatro días, esterilizado a 115°.

Con estos antígenos, diversos autores han encontrado una proporción de 95% de sueros tuberculosos positivos.

En los años que siguieron la reacción fué estudiada con minuciosidad en América y algunos autores, como Craig, obtuvieron 103 reacciones positivas en 107 sueros de enfermos tuberculosos y en cambio solamente 2 reacciones positivas en 350 sueros de individuos sanos.

LA REACCION DE FIJACION EN GENERAL

La introducción en el organismo de un animal sensible, de ciertas sustancias heterogéneas tales como microbios, elementos figurados de la sangre, etcétera, provoca la formación y la puesta en libertad en los humores de dicho animal, de otras sustancias que se conocen con el nombre de «anticuerpos».

Las sustancias capaces de dar origen a estos anticuerpos son denominadas «antígenos».

Cada organismo reacciona de manera particular en presencia de un antígeno determinado, de modo que la producción de anticuerpos varía bastante de un sujeto a otro.

Los anticuerpos no han podido ser aislados; ellos corresponden a propiedades adquiridas por el suero y su presencia o ausencia no puede ser descubierta más que por reacciones especiales de laboratorio.

Las propiedades de estos anticuerpos son específicas. Algunas veces están ligadas a la inmunidad y presentan un carácter defensivo; así encontramos las llamadas «antitoxinas» que no son otra cosa que los anticuerpos de las toxinas microbianas. Por lo general sucede lo contrario, es decir que estas propiedades están más bien en relación con la infección y no ejerce ninguna acción protectora. Los anticuerpos aparecen entonces como testigos de una reacción de defensa del organismo.

En este grupo de anticuerpos, las sensibilisatrices tienen un lugar muy importante. Ellas pueden dar, en efecto, grandes indicaciones para el diagnóstico y, algunas veces, para el pronóstico de ciertas enfermedades, como la sífilis, tuberculosis, etcétera.

En el año de 1894, Pfeiffer demostró la existencia de anticuerpos bacteriolíticos. Inyectó vibriones coléricos en el peritoneo de un cobayo vacunado contra el cólera, y observó que los microbios no solamente no se multiplicaban, sino que también perdían rápidamente su motilidad y su forma alargada transformándose en pequeñas bolas que se volvían granulosas y se disolvían en parte en el líquido vecino.

El mecanismo de este fenómeno (fenómeno de Pfeiffer) fué explicado años más tarde por Bordet y Gengou (1898) y por Ehrlich y Morgenroth (1899). En el suero del cobayo vacunado contra el cólera, existen dos sustancias que tienen propiedades diferentes. Una de ellas se encuentra en todos los sueros normales de hombre o animal; es termo-

lábil, es decir que se destruye por calentamiento a 55° durante 30 minutos; ha sido denominada «complemento» por Ehrlich, «alexina» por Buchner, «citasa» por Metchnikoff. La otra substancia es específica, es decir que no ataca sino a un antígeno bien determinado, que es siempre de la misma especie. Se fija sobre este antígeno, lo «sensibiliza», y permite que la alexina lo destruya. Esta substancia es termo-estável, es decir que resiste la temperatura de 55°. Ha sido denominada «sensibilisatriz» por Bordet, «amboceptor» por Ehrlich y «fijador» o «filositasas» por Metchnikoff.

En la experiencia de Pfeiffer, el vibrión colérico (antígeno) ha sido lisado por la acción combinada de estas dos substancias (alexina y sensibilisatriz).

Si, en lugar de microbios, el antígeno está constituido por glóbulos rojos, la acción lítica se manifiesta por la hemólisis, es decir por la puesta en libertad de la hemoglobina de los glóbulos rojos. La destrucción de dichos glóbulos solamente puede ser obtenida cuando en el suero con el que se mezclan, se encuentra una sensibilisatriz activa para ellos.

Con el objeto de facilitar la apreciación de esta hemólisis, Bordet y Gengou en el año de 1901, realizaron la «reacción de desviación o de fijación del complemento».

El mecanismo de esta reacción es el siguiente:

Primer tiempo: poner en presencia uno del otro los elementos de un sistema hemolítico: un antígeno y un anticuerpo correspondiente, que está representado por el suero del enfermo. Este suero puede estar inactivado a 55°, en cuyo caso se tendrá que agregar alexina, es decir, en la práctica, suero fresco de cobayo.

Segundo tiempo: después de una permanencia de una hora en la estufa a 37°, se agrega a la mezcla, glóbulos rojos de carnero desprovistos de toda traza de suero. Añadir en seguida una cantidad conveniente de suero hemolítico, inactivado por un calentamiento de 55°.

Dos hechos pueden producirse:

Primero: que el suero del enfermo contenga una sensibilisatriz; ésta se fija sobre el antígeno. El complemento es «desviado» por este sistema bacteriolítico. No puede activar al suero hemolítico y por consiguiente éste es incapaz de disolver a los glóbulos rojos y producir la hemólisis. Se dice entonces que la reacción es: POSITIVA.

Segundo: que el suero examinado no contenga la sensibilisatriz específica; el antígeno no puede ser «sensibilizado», y la alexina permanece libre. Esta alexina sí puede activar al suero hemolítico y cuando éste se pone en contacto con los glóbulos rojos del carnero, los disuelve y la hemólisis se producirá. Se dice entonces que la reacción es: NEGATIVA.

PREPARACION DE LOS ELEMENTOS PARA LA REACCION DE FIJACION. SU TITULACION

Los elementos necesarios para practicar la reacción de fijación, son los siguientes:

- 1o.—Emulsión de glóbulos rojos lavados.
- 2o.—Suero hemolítico.
- 3o.—Alexina.
- 4o.—Suero del enfermo.
- 5o.—Antígeno.
- 1o.—Preparación de la emulsión de glóbulos rojos.

Se utiliza, generalmente, sangre de carnero. Esta es recogida por punción aséptica de la vena yugular del animal en un recipiente estéril, que contenga perlas de vidrio. Se agita durante diez o quince minutos hasta que la fibrina se separe, formando un coágulo grande.

Después es necesario lavar los glóbulos rojos para quitarles completamente el suero. Este lavado se hace por medio de centrifugadores eléctricos.

En cada tubo del centrifugador, se ponen $\frac{2}{3}$ de sangre desfibrinada. Los glóbulos se separan por centrifugación. Se decanta el suero que sobrenada y se le reemplaza por una cantidad igual de solución de cloruro de sodio al 9 0/00. La mezcla resultante se sacude enérgicamente. Se coloca nuevamente en la centrífuga; se decanta otra vez el suero que sobrenada y se le reemplaza por una cantidad igual de la misma solución de cloruro de sodio. La operación se repite dos o tres veces. Después de la última decantación, se vierte en el tubo una cantidad de la solución de cloruro de sodio igual al volumen primitivo que ocupaba la sangre desfibrinada. Todo esto debe hacerse asépticamente.

Los glóbulos rojos obtenidos de esa manera pueden ser utilizados durante varios días después de su preparación. Siempre se hará antes de su empleo, la dilución habitual al 5% en una solución de cloruro de sodio al 9 0/00.

- 2o.—Suero hemolítico.

Para obtener un buen suero hemolítico es necesario recurrir a una especie de animal que produzca sensibilizantes con facilidad y que por el contrario, solamente produzca pequeñas cantidades de aglutininas. Además es indispensable que su suero no sea naturalmente hemolítico

para los glóbulos rojos del carnero. Los animales que llenan mejor estas condiciones son el conejo y el caballo.

La preparación del suero hemolítico en ambos animales se hace más o menos de la misma manera; solamente describiré cómo se produce con el conejo.

Se inyecta asépticamente en el peritoneo de un conejo, 5 cc. de glóbulos de carnero frescamente preparados. A la semana siguiente se hace una nueva inyección. Se repiten estas inyecciones semanales durante 6 ó 7 veces, para obtener un suero fuertemente hemolítico.

A los 8 o 10 días después de la última inyección, se sangra completamente el conejo; se deja coagular la sangre asépticamente. El suero es decantado y se le coloca en pequeñas ampollas, que se cierran a la lámpara.

Las ampollas que contienen el suero se calientan al baño de maría a 58-60° durante media hora. Esta práctica tiene por objeto destruir la alexina; además favorece la conservación del suero en caso de que éste haya podido ser contaminado durante su preparación.

Estas ampollas deben ser conservadas en la obscuridad y a la temperatura del laboratorio. De ese modo pueden conservarse activas por un año o más.

Antes de su utilización este suero debe ser titulado y ello se consigue de la manera siguiente: se prepara una dilución a 1% de dicho suero, poniendo 1cc. de él con 99cc. de una solución de cloruro de sodio al 9 0/00.

En una serie de 10 tubos para reacción, se vierte sucesivamente una décima de cc., dos décimas de cc., etcétera, hasta que en el último tubo se coloca 1cc. de la dilución.

Se agrega a cada uno de los tubos una cantidad de alexina en exceso; después 1cc de una emulsión de glóbulos rojos de carnero al 5%.

Se añade a los tubos una cantidad de solución de NaCl al 9 0/00, para completar en cada uno un volumen de 3cc.

Se agitan los tubos para homogeneizar la mezcla y se llevan a la estufa a 37° durante 30 minutos.

Suponiendo que la hemolisis comience en el quinto tubo, es decir, en el que contiene cinco décimas de cc. de la dilución del suero hemolítico, y si es completa en todos los otros tubos que contengan una cantidad mayor de dicha solución, se dice que este suero hemoliza a la dosis de 0.005 en presencia de la cantidad de alexina empleada.

Algunos autores creen necesario emplear una dosis de suero hemolítico comprendida entre 10 y 20 veces la dosis mínima hemolizante. Gracias a este exceso de suero hemolizante, la más pequeña traza de alexina se manifestará por una acción disolvente sobre los glóbulos rojos sensibilizados. (Véase cuadro número 1).

3o.—Alexina.

La mejor alexina nos es proporcionada por el suero fresco de cobayo.

La sangre de este animal puede ser obtenida por punción del corazón.

La alexina debe ser siempre usada muy fresca y por eso en la práctica de laboratorio, el suero es siempre extraído por centrifugación el día en que se practica la reacción. Se ha demostrado que la actividad de la alexina desciende rápidamente por envejecimiento.

Si es necesario conservar la alexina por muchos días, lo mejor es usar el procedimiento de Massol y Nowaczinski. Este consiste en agregar al suero fresco de cobayo, un décimo de su volumen de agua saturada de NaCl (36 gramos por litro). Para emplear este suero es indispensable diluirlo en una solución de NaCl al 9 0/00.

También puede la alexina conservar su actividad, si se le coloca a una temperatura de -10° o -15°.

Titulación de la alexina: se diluye el suero de cobayo al 1% en la solución en NaCl al 9 0/00. Se introduce en una serie de tubos, un décimo de cc. de la dilución, dos décimos de cc., y así sucesivamente hasta verter en el último tubo 1cc de la dilución.

En todos los tubos se completan 3cc. con la solución de NaCl.

Se agrega una dosis 20 veces mínima de suero hemolítico en cada tubo y también 1cc. de una emulsión de glóbulos de carnero al 5%.

Se agitan los tubos y se llevan a la estufa a una temperatura de 37° durante 30 minutos.

La dosis de alexina no fijada se encuentra en el primer tubo de la serie en donde haya hemolisis. Se tomará una dosis doble de ésta como dosis mínima en las experiencias de fijación. (Ver cuadro número 2).

4o.—Suero del enfermo.

La sangre del enfermo se recoge por punción venosa en el pliegue del codo. Es preferible hacer la sangría en ayunas o por lo menos fuera del período digestivo. Durante este período la sangre es rica en materias grasas y el suero es a menudo opalino. Esto no altera el resultado de la reacción, pero sí la hace menos nítida.

La sangre así recogida no debe colocarse a bajas temperaturas, pues éstas impiden la retracción del coágulo. Esta retracción es favorecida, al contrario, por una temperatura de 37°. A menudo es necesario desprender los bordes del coágulo para permitir la salida del suero. En fin, en caso de urgencia, el suero puede obtenerse por centrifugación. Es preferible, sin embargo, dejar que el suero se separe a la temperatura del laboratorio.

El suero obtenido de esa manera puede ser inactivado y para lograrlo basta con ponerlo en el baño de maría durante 30 minutos a una temperatura de 55-56°. Puede también usarse al estado fresco.

5o.—Antígeno.

Las cualidades de un antígeno tuberculoso dependen:

a) **de su sensibilidad**, es decir de su facultad para poner en evidencia las trazas más pequeñas de sensibilizadora en los sueros tuberculosos.

b) **de su fijeza y de su inalterabilidad**, es decir que debe tener un valor constante y debe poder conservarse indefinidamente

c) **de su especificidad**, es decir que solamente debe fijar la alexina en presencia de anticuerpos tuberculosos.

Algunos antígenos utilizados actualmente son muy sensibles; poseen además un valor constante y son inalterables, pero su especificidad no es absoluta.

El número de antígenos propuestos para la determinación de los anticuerpos es considerable. Los mencionaré rápidamente, sin entrar en detalles sobre su preparación.

1o.—Tuberculina.

La tuberculina bruta de Koch da resultados poco precisos e inconstantes. La tuberculina precipitada no tiene ningún valor.

Tuberculina T. A. C. de Momose: este autor emplea como antígeno una tuberculina especial, a la que ha llamado T. A. C. Se trata de una emulsión turbia, grisácea. Tiene el olor propio de los bacilos tuberculosos. El autor ha podido provocar la formación de anticuerpos en el conejo por medio de ella.

Para buscar los anticuerpos, el antígeno T. A. C. debe ser diluído al diezmilésimo, es decir un centigramo en cien cc. de la solución al 9 0/00 de NaCl. Para cada reacción se emplea medio cc. de la solución.

2o.—Bacilos tuberculosos.

Los bacilos tuberculosos, vivos o muertos han sido empleados como antígenos. Se les utiliza en emulsión en la solución de cloruro de sodio, a dosis variables. Solamente algunas de estas emulsiones dan resultados satisfactorios; la mayoría los dan irregulares, debido a la dificultad de obtener suspensiones homogéneas.

Entre estos antígenos pueden citarse: el de Miller, el de Wilson, el de Cooke, el de Boquet y Negre y por último el de Besredka.

La conservación de estos antígenos no es difícil, pero su valor disminuye con el envejecimiento.

3o.—Productos extraídos de los bacilos tuberculosos.

Los procedimientos de extracción de los productos del bacilo tuberculoso son muy numerosos; su nomenclatura es demasiado larga y sin interés práctico.

Entre esta clase de antígenos merecen mención:

a) Antígeno de Calmette y Massol: estos autores han preparado dos antígenos: el antígeno B1 y el antígeno peptonado B2.

Con el primero han podido descubrir anticuerpos en ciertos sueros, mientras que han fracasado en otros.

El segundo es muy sensible; permite, en efecto, poner en evidencia pequeñas fracciones de anticuerpos contenidos en los sueros de individuos tuberculosos.

Para emplearlo, se diluye al 10%; se pone en cada tubo de la reacción 1cc. de esta dilución.

b) Extracto glicerinado de Petroff; este antígeno se diluye al 1 por 40 en una solución de cloruro de sodio al 9 0/00 y en la reacción se usa a razón de un décimo de cc.

c) Antígeno alcohólico y glicerinado de Borrel y Boez: los autores han obtenido buenos resultados tanto en los sueros humanos como en los de lo bóvidos.

d) Extracto alcohólico-metílico de Boquet y Negre: se usa a la dosis de 1cc. de la dilución al 5% en solución de NaCl al 9 0/00.

Este antígeno debe ser conservado a resguardo de la luz y del aire. En frío da un precipitado muy abundante que se deposita bajo la forma de pequeñas masas blancas. Este precipitado se redisuelve enteramente cuando el líquido se lleva a la temperatura de 45-50°.

Este antígeno es muy activo. Da una reacción positiva con los sueros de tuberculosos, aún en presencia de pequeñas cantidades de anticuerpos.

e) Antígeno de Wadsworth y Maltaner: muy sensible y de una conservación fácil.

f) Antígeno de Leone: muy sensible; da resultados positivos en un 90% de los casos. Tiene el inconveniente de fijar el complemento en presencia de anticuerpos sifilíticos.

g) Antígeno de Wassermann: el autor ha tratado de preparar un antígeno tuberculoso completamente específico, es decir que solamente fije los anticuerpos tuberculosos, excluyendo los anticuerpos sifilíticos.

Empleando su antígeno, Wassermann ha obtenido siempre reacciones negativas con los sueros de sujetos sanos y de sujetos sifilíticos. En cambio ha observado una gran proporción de reacciones positivas en presencia de sueros de sujetos tuberculosos.

Esta especificidad ha sido discutida y Silberstein ha obtenido con el antígeno de Wassermann, un 33% de reacciones positivas en los sifilíticos.

h) Antígeno tuberculoso del Departamento Sero-bacteriológico de Leverkuse; este es un antígeno bencílico y su especificidad es casi absoluta.

Este antígeno ha sido usado en nuestras reacciones y podemos afirmar que no fija la alexina de los sueros sifilíticos o palúdicos. En cambio nos ha dado una gran proporción de reacciones positivas en los sueros de tuberculosos.

50.—Organos, exudados, pus o excreciones glandulares de los sujetos tuberculosos.

Meyer demostró que los exudados pleurales, el líquido ascítico, el exudado peritoneal de los sujetos tuberculosos no poseen ningún valor antigénico.

Utilizando extractos acetónicos y alcohólicos, Hammers ha observado, sin embargo, la presencia de una sensibilisatriz específica en 46 sueros de bóvidos, que en la autopsia fueron reconocidos como tuberculosos. Este mismo antígeno solamente ha dado un 65% de reacciones positivas en las manos de otros autores.

Da Cruz ha preparado un antígeno a base de hígado de cobayo tuberculoso. Le ha llamado M. II y ha asegurado que tiene la misma sensibilidad que el antígeno de Boquet y Negre.

Titulación del antígeno tuberculoso:

Todo antígeno tuberculoso debe ser titulado antes de su uso, tanto desde el punto de vista de su poder auto-fijador como desde el punto de vista de su valor antigénico.

a) Titulación del poder auto-fijador:

Cualquiera que sea su naturaleza, todo antígeno tuberculoso que se encuentra en exceso con relación a la cantidad de alexina que se le opone, es capaz por sí mismo y en ausencia de anticuerpos tuberculosos, de fijar una cantidad elevada de dicha alexina,

Por consiguiente, para que una reacción de fijación tenga algún valor, es indispensable que la alexina sea fijada por el antígeno por medio de los anticuerpos a dosis en las que el antígeno solo, no pueda fijar ninguna cantidad apreciable de dicha alexina.

Es necesario, antes de practicar una reacción de fijación, determinar la dosis exacta en la que el antígeno se vuelve absorbente para la cantidad de complemento empleado a manera de producir la hemólisis del complejo glóbulos + sensibilisatriz, con el objeto de no emplear este antígeno sino a dosis inferiores, no absorbentes.

Para efectuar esta titulación, se diluye el antígeno con cantidades crecientes de una solución de NaCl al 9 0/00; 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, etcétera. Se tomará una cantidad fija de cada una de estas diluciones, por ejemplo 1cc., que se pondrá en presencia de dosis crecientes de alexina, a partir de la dosis mínima activa.

Se completa un volumen total de 2.5cc. con la solución de NaCl, se agitan los tubos y se les deja una hora en la estufa a la temperatura de 37°. Al cabo de este tiempo de contacto, se agrega 1cc. de una emulsión de glóbulos rojos previamente sensibilizados, es decir que a los glóbulos de carnero se les habrá añadido 20 dosis (procedimiento de Calmette) o 1 a 2 dosis (procedimiento de Besredka) mínimas de suero hemolítico.

Los tubos son agitados y nuevamente se les coloca en la estufa a 37°. Los resultados se interpretan después de media hora.

Si, por ejemplo, las diluciones al 1/10 y al 1/20 ejercen un poder auto-fijador, no se les utiliza por ser muy concentradas. Se tomará por consiguiente, para la reacción de fijación, la dilución al 1/30 del antígeno que no tiene poder absorbente frente a la dosis mínima activa de alexina. (Véase cuadro número 3).

Titulación del valor del antígeno:

La medida del poder del antígeno se hace por medio de un suero tipo cuya riqueza en anticuerpos es conocida.

La titulación puede hacerse por los dos métodos siguientes:

1o.—Aumentando las dosis de alexina en presencia de una dosis fija de antígeno.

2o.—Aumentando las cantidades de antígeno en presencia de una dosis fija de alexina.

1o.—Dosis creciente de alexina, dosis fija de antígeno: con el objeto de no emplear grandes cantidades de alexina, es indispensable usar un antígeno bastante diluido.

Se hace actuar una dosis fija de la dilución del antígeno, por ejemplo, 1cc. de la dilución al 1% y una cantidad fija de un suero tipo (por ejemplo 0.5cc.) que ha sido calentado durante media hora a 55°, en presencia de dosis crecientes de alexina a partir de la dosis mínima activa.

En tubos testigos se pone antígeno solo, y suero solo, en presencia de las mismas dosis de alexina.

En todos los tubos se completa un volumen de 2.5cc. con la solución al 9 0/00 de cloruro de sodio. Se agitan estos tubos y se llevan a la estufa a la temperatura de 37°, dejándolos allí durante una hora.

Se retiran para agregarles el sistema hemolítico previamente sensibilizado. (1cc. de la emulsión de glóbulos rojos de carnero al 5%, a la que se ha añadido el suero hemolítico necesario). Se agitan nuevamente y se les lleva otra vez a la estufa a 37° durante 30 minutos. Se aprecian los resultados de la manera siguiente:

Si llamamos convencionalmente N al número de dosis mínimas de alexina que han sido desviadas por el antígeno, y al V volumen de antígeno empleado, tendremos que la relación N/V nos dará el valor de este antígeno en unidades de alexina.

Suponiendo que 0.01 de antígeno desvíe 8 dosis mínimas de alexina, el valor de este antígeno será $8/0.01$, igual a 800. Se dice que la unidad de volumen de este antígeno desvía 800 unidades de alexina. (Ver cuadro número 4).

2o.—Dosis fijas de alexina, dosis crecientes de antígeno: en una serie de 10 tubos se introduce la misma dosis de un suero, con anticuerpos específicos, que ha sido previamente inactivado por un calentamiento de 30 minutos a 55°. Se agregan dosis variables: 0.cc.1, 0.cc.2, 0.cc.3... 1cc. de la dilución del antígeno cuyo valor se quiere determinar. Cada tubo recibe después la misma dosis de alexina, por ejemplo 0.05cc. o sean 5 dosis mínimas, si es que 0.01 representa la dosis mínima activa. Se preparan tubos testigos con la dosis fija de suero y una parte de las dosis crecientes de antígeno utilizadas.

Completar en todos los tubos un volumen de 2.5cc. con la solución de cloruro de sodio; agitar los tubos y ponerlos en la estufa durante una hora a la temperatura de 37°.

Se agrega en seguida, como en la titulación precedente, 1cc. de una emulsión al 5% de glóbulos rojos de carnero, previamente sensibilizados. Se agitan de nuevo los tubos y otra vez se ponen en la estufa a 37° durante 30 minutos, procediéndose luego a la interpretación de los resultados.

El valor del antígeno se establece, como en el otro procedimiento, por la relación N/V. (Ver cuadro número 5.

Naturaleza del antígeno.

Kurt Meyer fué el primero en buscar las propiedades antigénicas de los diversos extractos, haciendo actuar sobre los bacilos tuberculosos: alcohol, bencina, acetona, éter, etcétera. Observó que las partes insolubles en la acetona y solubles en el alcohol, compuestas sobre todo por fosfatos, tienen el valor antigénico más grande, y les atribuyó las propiedades fijadoras del bacilo tuberculoso. Según él, las grasas, las ceras y los ácidos grasos no ejercen ninguna acción.

Much y otros experimentadores consideran, al contrario, que las únicas activas serían las grasas neutras.

Boquet y Negre han confirmado, en general, las observaciones de Meyer. Ellos han demostrado que el poder fijador de los bacilos tuberculosos pertenece sobre todo a los lipoides insolubles en la acetona y solubles en el alcohol metílico. Reconocen, sin embargo, que el papel de las ceras, de las grasas, de las proteínas y de las sustancias nitrogenadas no debe despreciarse completamente.

LOS ANTICUERPOS TUBERCULOSOS

Definición de la unidad de anticuerpo:

Si un volumen V del suero estudiado desvía N dosis mínima de alexina, la relación N/V representa el número de dosis mínima de alexina que puede desviar 1cc. de suero. Resulta que la «unidad de anticuerpo» puede ser representada por la cantidad de anticuerpo capaz de desviar una dosis mínima de alexina. Si tomamos por ejemplo, una reacción donde la mezcla suero antígeno ha desviado 4 dosis mínimas de alexina, mientras que los tubos testigos han sido completamente hemolizados, la relación N/V es igual a $4/0.2$, que a su vez es igual a 20.

Los diversos sueros, probados con un mismo antígeno y un suero hemolítico siempre igual, siguiendo técnicas semejantes, pueden ser comparados entre sí, según el número de unidades de alexina que puedan fijar.

Cuando estos ensayos se hacen con sueros de animales preparados, muy ricos en anticuerpos, para evitar el empleo de grandes cantidades de alexina, se recomienda hacer diluciones de dichos sueros al 1/50, 1/100, etcétera.

Riqueza de los sueros antituberculosos en anticuerpos:

La riqueza de los sueros de enfermos en anticuerpos es, en general, bastante débil. Raramente pasa en la especie humana de 50 unidades. (Calmette).

Sin embargo, Armand-Delille, Ducrochet y otros autores, han observado en algunos niños tuberculosos un tenor considerable en anticuerpos, cuya tasa alcanzaba 200, 300 y aún 875 unidades.

Según Calmette, la tasa de anticuerpos en los sujetos tuberculosos es nula o muy débil al principio de la infección. Aumenta en seguida a medida que la enfermedad evoluciona; los anticuerpos desaparecen totalmente al final, cuando aparece la caquexia y la muerte se aproxima.

Besredka ha observado lo mismo en el cobayo tuberculoso que se encamina hacia la terminación fatal: la reacción de fijación es negativa en la sangre tomada unos días antes de la muerte.

Algunos autores no comparten esta opinión y han señalado la persistencia de la reacción en las formas más graves de la enfermedad.

Bezançon y Bergeron han visto enfermos muy graves, portadores de lesiones granúlicas, de endocarditis tuberculosa, etc., que presentan una reacción positiva en los días que anteceden a la muerte.

Titulando los anticuerpos encontrados en los enfermos durante los diferentes estados de su afección, Boez y Duhot han notado que no existe ninguna relación entre la forma evolutiva y la riqueza del suero en anticuerpos.

Casi todos los autores están de acuerdo al considerar que la tuberculina inyectada a animales sanos, no es capaz de provocar la formación de anticuerpos en sus sueros. Si se inyecta, al contrario, en sujetos tuberculosos, ella aumenta considerablemente la riqueza de sus sueros en sensibilizantes.

Calmette, Massol y Mezie han precisado la acción de la tuberculina en los tuberculosos. Han observado que, en los enfermos tratados por extractos bacilares acuosos, la tasa de los anticuerpos se ha elevado de una manera considerable, pasando por ejemplo, de 5 unidades a 333, de 15 unidades a 500.

Brocq-Rousea y Cauchemez han confirmado estos hechos en los bóvidos tuberculosos: una inyección de tuberculina aumenta mucho su riqueza en anticuerpos. La acción de la tuberculina se manifiesta durante tres meses después de la inyección.

Obtención de sueros ricos en anticuerpos:

Los animales que deben ser utilizados para la obtención de sueros ricos en anticuerpos son: el caballo, el asno, el buey y el conejo; no debe tomarse en cuenta al cobayo.

Calmette y Massol han inyectado a un caballo sano dos dosis sucesivas, con 12 días de intervalo, de 20 cc. de extracto bacilar conteniendo 2% de extractos secos. Los anticuerpos aparecen bruscamente, en abundancia, en el suero de este animal a los 12 días después de la segunda inyección.

Inyectando a otro caballo sano pequeñas dosis del mismo extracto bacilar (2 cc. diluïdos en solución de NaCl), estos autores han obtenido, desde el segundo día después de la segunda inyección, un suero mucho más rico en anticuerpos que aquel del caballo tratado con altas dosis de antígeno.

El mejor procedimiento para obtener sueros ricos en sensibilizantes tuberculosos consiste en tratar a los animales espontáneamente tuberculosos o a los animales preparados, por medio de inyecciones endovenosas y repetidas de bacilos virulentos, o por tuberculina inyectada bajo la piel.

La inhibidora de los sueros con anticuerpos tuberculosos:

Buscando la riqueza en anticuerpos de los sueros de un gran número de sujetos tuberculosos, Calmette y Massol han observado que algunos de estos sueros poseen la propiedad de impedir la fijación del complemento

sobre el antígeno tuberculoso; también han notado que dichos sueros pueden manifestar esta propiedad en presencia de otros sueros que encierran sensibilizantes tuberculosas.

Han estudiado con mucha minuciosidad esta propiedad «inhibiente o inhibitriz», que es sobre todo particular a los sueros de los animales hipervacunados.

Han podido observar que este poder inhibidor aumenta inmediatamente después de las inyecciones de bacilos por vía endovenosa. Alcanza su máximo a los 5 o 6 días, empezando en seguida a descender, aunque no llega a desaparecer por completo.

Todos los sueros inhibidores examinados por estos autores dan una reacción de fijación negativa en presencia de su antígeno B 1. Sin embargo, estos anticuerpos han podido ser puestos en evidencia utilizando el antígeno B2, con la condición de emplear una dosis apropiada de suero.

Se ha observado que los sueros de animales hiper-inmunizados dan un precipitado abundante al contacto de la tuberculina. Se ha buscado la intervención de esta reacción de precipitación en el fenómeno de inhibición. Los resultados han sido negativos.

Calmette y Massol han logrado separar la inhibitriz de los anticuerpos, haciendo pasar una corriente de CO₂ a través de los sueros inhibidores diluidos al 1/10 en agua destilada. La inhibitriz se fija en el precipitado de globulinas así obtenido, mientras que los anticuerpos permanecen en el líquido decantado, que ya no posee poder inhibidor.

Esta propiedad inhibitriz es característica, como dijimos, de los sueros de los animales hipervacunados. Los sueros de animales sanos, los sueros terapéuticos (antiestreptocócico, antidiftérico, antitetánico, etc.) no son inhibidores. Existe, aunque con menos frecuencia, en el hombre y en los bóvidos.

Para explicar la formación de esta sustancia inhibitriz, Calmette y Massol formulan la siguiente hipótesis: «En los animales que han sido inmunizados por medio de inyecciones intravenosas masivas de bacilos tuberculosos más o menos modificados o virulentos, estos bacilos, encontrándose inmediatamente sensibilizados por una superabundancia de anticuerpos, provocan un enriquecimiento de la sangre en globulinas. La inhibitriz está contenida en estas globulinas y, por consiguiente, son ellas las que tienen la propiedad de impedir la fijación de la alexina sobre los antígenos sensibilizados y de oponerse a la aglutinación.

Investigación de los anticuerpos en los extractos de órganos y en los exudados tuberculosos:

Como ha sido establecido por los trabajos de Metchnikoff y sus colaboradores, parece ser que los anticuerpos tuberculosos son elaborados por los leucocitos. Por consiguiente se les debe encontrar en abundancia

en los órganos que regulan la formación de estas células (ganglios linfáticos, médula ósea y bazo).

Livietaro los ha puesto en evidencia en los ganglios escrofulosos y tuberculosos, utilizando como antígeno emulsiones bacilares o la tuberculina.

Citrón ha encontrado la reacción de fijación positiva en el líquido pleural de los tuberculosos. Slatineano y Danielopol han notado la presencia de fijadores en los líquidos pleurales y peritoneales de origen tuberculoso.

Paraskevopoulos ha encontrado también sensibilisatrices tuberculosas en abundancia en los exudados serofibrinosos provenientes de pleuresías, teniendo cuidado de eliminar por centrifugación los bacilos de estos exudados.

Muchos autores más han confirmado estos datos y han obtenido con los exudados pleurales resultados positivos absolutamente iguales a los obtenidos con el suero sanguíneo.

Massias y Djouknitch han examinado algunos líquidos céfalo-raquídeos con el antígeno de Besredka. Han empleado la siguiente técnica: a 0.8 cc. de líquido céfalo-raquídeo agregan en 3 tubos 0.1 cc. de un suero fresco, no calentado, cuyo poder hemolítico ha sido previamente titulado, y 0.1 cc., 0.2 cc., 0.3 cc. de antígeno. Después de una hora y media de permanencia en la estufa, agregan la cantidad de glóbulos rojos de carnero, que puede hemolizar el suero utilizado en 30 minutos. Dejan de nuevo los tubos media hora en la estufa a 37°, y en seguida proceden a la interpretación de los resultados. Estos son controlados después de 6 horas de permanencia a la temperatura del laboratorio. Los resultados obtenidos han sido poco satisfactorios.

Mozzer ha buscado los anticuerpos en el pus de las lesiones tuberculosas. En 19 casos ha obtenido 19 reacciones fuertemente positivas.

Otros autores han tratado en vano de encontrar los anticuerpos en los esputos bacilíferos.

Transmisión de los anticuerpos tuberculosos de la madre al niño:

Un cierto número de experimentadores han buscado si en la infección tuberculosa, los anticuerpos pueden pasar de la madre al feto.

Parisot y Hanns han examinado la sangre de una mujer encinta que murió de tuberculosis cavitaria durante el octavo mes del embarazo, y la del niño que fué extraído por operación cesárea, aunque no sobrevivió.

La reacción de fijación del complemento fué positiva con el suero de la madre y con el del niño.

Rosenkrantz ha examinado los sueros de 100 recién nacidos, de los cuales 50 eran hijos de mujeres sanas y 50 de tuberculosas. En los primeros encontró 50 reacciones negativas, y en los segundos 31 reacciones

positivas. En todos los casos la sangre fué tomada simplemente del cordón umbilical en el momento del parto.

Ribadeau-Dumas, Cuel y Prieur han buscado en los sueros de madres tuberculosas y en los de sus niños, los anticuerpos tuberculosos por medio del antígeno de Besredka.

En 8 mujeres tuberculosas la reacción fué positiva en todas. También lo fué en 7 niños nacidos de estas madres. En estos 7 casos la cuti-reacción fué negativa, así como la reacción de Wassermann.

Debré y Lelong han practicado la reacción de desviación del complemento en el suero extraído de la sangre venosa materna, en el suero sacado de la sangre del cordón y en el suero de un cierto número de lactantes nacidos de madres tuberculosas. Han confirmado la realidad y la frecuencia de la transmisión de los anticuerpos tuberculosos de la madre al niño.

Para estos autores el paso de los anticuerpos a través de la placenta no es una simple filtración. La placenta puede detener los anticuerpos parcial o totalmente; puede dejarlos pasar sin modificar la tasa; pero, sobre todo, parece tener sobre estos anticuerpos una acción de concentración o de reactivación, haciéndolos aparecer en la sangre del cordón a una tasa superior a la que tenían en la sangre materna.

Urquijo y Pagniez han tomado simultáneamente sangre materna y sangre del cordón en 31 casos, obteniendo los resultados siguientes: sobre 21 resultados positivos en la sangre materna, comprueban 20 positivos y 1 dudoso en el niño; y sobre 10 resultados negativos en la madre, 1 dudoso y 9 negativos en el niño.

La transmisión de los anticuerpos de la madre al feto debe ser considerada como la regla, por lo menos en la especie humana.

Naturaleza y papel de los anticuerpos tuberculosos:

Lüdke observó que la inyección de albumosas a los cobayos daba lugar a la formación de anticuerpos, los que descubría en la sangre de estos animales por medio de la tuberculina. Asimiló esta última a una «albumosa» y los anticuerpos tuberculosos a «anti-albumosas».

Para Wassermann, Citron y otros autores, los anticuerpos corresponden a una «antituberculina», cuya función es la de neutralizar la tuberculina producida en el seno de las lesiones tuberculosas o aquella que es introducida artificialmente en el organismo.

Löwenstein ha creído demostrar su existencia de la manera siguiente: mezcla una cantidad fija y definida de tuberculina con cantidades variables de suero antituberculoso rico en anticuerpos. Con estas mezclas no obtiene la cuti-reacción que produce una tuberculina testigo, y deduce, que la antituberculina del suero ha neutralizado a la tuberculina.

Calmette y Massol han demostrado que en realidad no se trata de una neutralización. El contacto de la tuberculina con el suero da lugar a una precipitación de las globulinas. Separando con centrifugación este precipitado del suero, ellos notaron que el precipitado empleado solo no es susceptible de producir la cuti-reacción o la oftalmo-reacción, mientras que estas reacciones son producidas por el suero que contiene toda la tuberculina inicial.

Casi todos están de acuerdo en considerar que no existe ninguna correlación entre la aparición de los anticuerpos en el suero de un sujeto tuberculoso y su aptitud para reaccionar a la tuberculina. Algunos enfermos, atacados de lesiones óseas o cutáneas, reaccionan fuertemente a la tuberculina, sin presentar sensibilizantes en su suero. Si esta reacción tuberculínica fuese debida a la unión de la tuberculina con una antituberculina, sería imposible dejar de encontrar estos anticuerpos en enfermos que presentan dicha reacción muy acentuada.

Por otra parte, en algunos animales tuberculizados experimentalmente, los anticuerpos aparecen antes de la aptitud para reaccionar a la tuberculina.

Está actualmente demostrado que las sensibilizantes tuberculosas no poseen ni «in vivo», ni «in vitro», propiedades neutralizantes ante las tuberculinas.

Aún no se conoce, pues, exactamente la naturaleza de los anticuerpos tuberculosos.

Calmette, Negre y Boquet, utilizando un suero de caballo muy rico en anticuerpos, han buscado el papel que las sensibilizantes son capaces de llenar en la defensa del organismo contra la infección por el bacilo de Koch.

Han llegado a las siguientes conclusiones: «las sensibilizantes anti-tuberculosas del suero de caballo preparado, aún empleadas a dosis considerables no tienen ningún poder bactericida y son incapaces de provocar la lisis, «in vivo» o «in vitro», del bacilo tuberculoso; no neutralizan la tuberculina y no ejercen ninguna acción favorable sobre la marcha de la infección tuberculosa. Estas sensibilizantes solamente pueden tomarse como «testigos de infección».

TECNICA DE LA REACCION

Todos los autores que han estudiado la reacción de fijación del complemento en la tuberculosis, han utilizado diversas técnicas, cuyos resultados han sido más o menos semejantes.

Podemos dividir las técnicas en dos grupos:

1o.—En las que se usa suero fresco.

2o.—En las que se usa suero inactivado.

El segundo grupo tiene muchas desventajas sobre el primero y por eso ha sido casi abandonado por los serólogos modernos. En efecto, se necesita una alexina extraña, que es muchas veces inestable, es decir que es destruida por una temperatura de 37°. Además es necesario inactivar el suero de los enfermos a una temperatura de 55°, temperatura que algunas veces destruye en parte y aún en su totalidad la sensibilizadora específica, de tal modo que se puede obtener una reacción llamada «disociada», o sea, positiva con el suero fresco y negativa con el suero inactivado.

Describiré las principales técnicas y por último la que he seguido, que se basa en el método de Hecht.

1o.—Método de Calmette y Massol

Empleando como antígeno el extracto peptonado B2 preparado por ellos, Calmette y Massol disponen la reacción de la manera siguiente:

Se utilizan tres series de tubos; la primera comprende 5 tubos: ella recibe la cantidad de suero por examinar, o sea 0.5 cc., y la cantidad fija del antígeno, o sea 1 cc. de la dilución al 1/10; la segunda serie de 3 tubos (testigos suero) recibe únicamente 0.5 de suero; la tercera serie de 3 tubos también (testigos antígeno), recibe la misma cantidad de antígeno que los tubos de la primera serie o sea, 1 cc.

En cada uno de los tubos de las tres series, se agregan dosis crecientes de alexina, titulada previamente, partiendo de la dosis mínima activa.

Boquet y Negre le han hecho algunas ligeras modificaciones a esta técnica. Solamente emplean 0.3 cc. del suero por examinar. El extracto metílico, diluido al 1/20, es utilizado a la dosis de 1 cc. y la alexina diluida al 1/15.

Se completa el volumen total de cada tubo a 2.5 cc. con la solución de cloruro de sodio al 9 ‰. Se agitan los tubos y se llevan a la estufa a 37° durante una hora. En seguida se agrega el sistema hemolítico (una gota de emulsión de glóbulos de carnero y 20 dosis mínimas de sensibilisatriz hemolítica).

Se agitan los tubos y se llevan nuevamente a la estufa a 37° durante 30 minutos. Se retiran de la estufa y se interpretan los resultados.

Los sueros considerados como positivos son aquellos que desvían netamente una cantidad de alexina superior a aquella desviada por los tubos testigos.

No se toman en cuenta las reacciones en las que hay una fijación incompleta (hemolisis parcial) para una dosis mínima activa de complemento. (Ver cuadro No. 6).

20.—Método de Besredka,

El procedimiento que emplea Besredka y sus colaboradores para buscar los anticuerpos tuberculosos, consiste como en el de Calmette y Masol en el empleo de dosis fijas de antígeno y de suero por examinar, y de dosis crecientes de alexina. Difiere del anterior por la ausencia de titulación inicial de la alexina y por una técnica especial en la preparación del sistema hemolítico.

Se utilizan 4 series de tubos. La primera comprende 6 tubos (No. 1 al 6); recibe 0.2 cc. del suero por examinar y una cantidad fija de antígeno de Besredka, o sea, 0.3 cc.

La segunda serie de tres tubos (testigos suero, No. 7 al 9), recibe solamente 0.2 cc. del suero enfermo.

La tercera serie de 4 tubos (testigos antígeno, No. 10 al 13), recibe la misma cantidad de antígeno que los tubos de la primera serie, o sean, 0.3 cc.

Por último, la cuarta serie de 4 tubos (control alexina, Nos. 14 al 17) recibe únicamente alexina.

En cada uno de los tubos de las cuatro series se agregan dosis crecientes de alexina al 1/20, de manera que el primer tubo de cada serie reciba 0.2 cc., el segundo 0.3 cc., etc. hasta llegar al 60. que recibirá 0.7 cc.

Se completa el volumen total de cada tubo a 1.2 cc. con solución al 9 ‰ de NaCl. Después de agitar los tubos se les coloca en la estufa durante una hora a la temperatura de 37°. Se dejan en seguida una hora a la temperatura del laboratorio. Este último tiempo puede ser disminuido o suprimido.

Titulación del suero hemolítico y preparación del sistema hemolítico: mientras que los tubos permanecen en la estufa y a la temperatura del laboratorio, se procede a la titulación del suero hemolítico y después a la preparación del sistema hemolítico. Para titular un suero

hemolítico cuya actividad aproximada se conoce (0.5 a 1%), se opera de la manera siguiente:

Se toman 3 tubos de ensayo estériles A, B, C. En cada uno de ellos se vierten 9.5 cc. de solución de cloruro de sodio al 9 ‰ y 0.5 cc. de glóbulos de carnero. Se agrega en seguida en el tubo A 0.05 cc., en el tubo B, 0.1 cc., en el tubo C, 0.15 cc. del suero hemolítico que se va a emplear. Se obtiene así las siguientes diluciones de este suero: 0.5% en el tubo A, 1% en el tubo B, 1.5% en el tubo C.

Se agitan fuertemente los tres tubos para homogenizar bien su contenido y se dejan 15 o 20 minutos a la temperatura del laboratorio.

La mezcla de cada tubo se reparte después, a razón de 1 cc. en dos tubos que contienen 0.3 cc. del antígeno y dosis crecientes de alexina (0.2 cc. en el primer tubo, 0.3 cc. en el segundo). Se completa un volumen total de 2.2 cc. en cada tubo con la solución de NaCl.

En total habrá 6 tubos: dos que reciben 1 cc. del tubo A; dos que reciben 1 cc. del tubo B; dos que reciben 1 cc. del tubo C.

Después de media hora en la estufa se aprecian los resultados. La hemolisis, más o menos total, que se ha producido indica a qué tasa los glóbulos de carnero son mejor sensibilizados por el suero hemolítico en presencia de alexina.

Si, por ejemplo, la hemolisis total no se manifiesta sino a partir de los tubos 4 y 5, la sensibilización de los glóbulos de carnero por la dilución al 0.5 y al 1% del suero hemolítico es insuficiente para obtener la hemolisis frente a 0.2 cc. de alexina al 1/20. Será necesario, en este caso, emplear la dilución al 1.5%.

Teniendo este dato, solamente falta preparar una cantidad de emulsión de glóbulos sensibilizados, suficiente para todos los tubos de la reacción sabiendo que se necesita 1 cc. por tubo.

La emulsión preparada se deja a la temperatura del laboratorio durante 20 minutos.

La reacción se termina vertiendo en cada uno de los tubos de las 4 series, 1 cc. de la emulsión de glóbulos sensibilizados. Se agitan los tubos y se llevan por última vez a la estufa a una temperatura de 37° durante media hora. Se procede en seguida a la apreciación de los resultados.

Esta se hace por una comparación entre los tubos suero + antígeno y los tubos testigos; a veces es útil una segunda interpretación, después de una hora de permanencia en el laboratorio.

Hay que tener en consideración la falta de hemolisis que pueda encontrarse en alguno de los tubos testigos.

Para que una reacción sea positiva, es indispensable que la cantidad de alexina fijada por la mezcla de antígeno y de suero sea superior a la suma de los volúmenes de alexina desviados por el antígeno y los anti-

cuerpos separadamente. En el caso contrario, la reacción es negativa. (Véanse cuadros Nos. 7, 8 y 9).

3o.—Método rápido con suero fresco (Técnica de Goldenberg)

En este procedimiento se utiliza la alexina del suero examinado y su hemolisina frente a los glóbulos rojos de carnero. Para ser concluyente, la reacción debe ser siempre precedida por un estudio del poder hemolítico del suero frente a los glóbulos de carnero, es decir de la dosificación del índice hemolítico del suero por examinar.

Este método ha sido empleado por numerosos autores para poner en evidencia los anticuerpos tuberculosos en los sueros humanos.

Describiré la técnica de Goldenberg:

El suero sospechoso debe ser conservado en la hielera para ser examinado al día siguiente de la sangría.

En 10 pequeños tubos para hemolisis, se vierte 0.1 cc. del suero. En los 3 primeros, se agregan dosis crecientes de antígeno de Besredka: 0.1 cc., 0.2 cc., 0.3 cc. El tubo No. 4 contiene únicamente suero. En los 6 últimos tubos, se vierten dosis crecientes de una emulsión de glóbulos rojos de carnero al 5%, de manera que en el tubo No. 5 se pone 0.1 cc. y en el No. 10, 0.6 cc. de dicha emulsión.

Se tiene, pues, 3 series de tubos. La primera comprende los tubos para la reacción propiamente dicha (suero + antígeno). La segunda, que sólo comprende el tubo No. 4 (sólo suero) llamado «tubo cronométrico», sirve para indicar la atenuación del poder hemolítico del suero después de permanecer una hora en la estufa. La tercera serie contiene el suero y los glóbulos rojos del carnero; indica el poder hemolítico del suero.

Se completa el volumen de cada tubo hasta 0.7 cc. con solución de cloruro de sodio al 9 0/00. Se agitan bien los tubos y se llevan a la estufa a 37° durante una hora. Al cabo de media hora de permanencia en la estufa, se observa cuál es el poder hemolítico del suero estudiado. Se anota cuidadosamente la dosis máxima de glóbulos hemolizados. Hecho esto, se espera otra media hora y se agrega, en los 4 primeros tubos de la reacción, esta dosis máxima de la emulsión de glóbulos menos 0.1 cc.

Después de este tiempo, se agitan los tubos y se llevan otra vez a la estufa, hasta la aparición de una hemolisis completa en el tubo No. 4, que por eso se llama «tubo cronométrico». Esta hemolisis se manifiesta ordinariamente a los 15 o 20 minutos. Se procede en seguida a la interpretación de los resultados.

Esta no presenta ninguna dificultad. La ausencia de hemolisis en los 3 primeros tubos indica una reacción positiva fuerte (+++). La hemolisis en el primer tubo y su ausencia en el No. 2 y en el No. 3, indican

una reacción positiva mediana (++). La hemolisis en los tubos No. 1 y No. 2 y su ausencia en el No. 3, indica una reacción positiva débil (+). La reacción es negativa cuando hay hemolisis en los tres primeros tubos. (Ver cuadro No. 10).

4o.—Método de Hecht

(Técnica seguida en mis trabajos)

El suero es conservado a la temperatura del laboratorio y debe ser examinado al día siguiente de la sangría. Antes del examen debe centrifugarse para separarlo completamente de los glóbulos rojos.

En una serie de cuatro tubos para hemolisis se vierten tres décimas de cc. de solución de NaCl al 9 0/00.

A cada uno de los tubos se le agrega un décimo de cc. del suero del enfermo.

Al tubo No. 1 se le añade un décimo de cc. de una emulsión de antígeno al 10% en la solución de cloruro de sodio.

Al tubo No. 2 se le agregan dos décimos de cc. de la misma emulsión.

En el tubo No. 4 se vierte un décimo de cc. de una solución al 5% de glóbulos rojos de carnero.

Se agita fuertemente para mezclar los componentes.

Se lleva a la estufa a 37° durante 30 minutos.

Cada cierto tiempo observar si hay o no hemolisis en el tubo No. 4, que es denominado por esta razón «índice hemolítico».

Si hay hemolisis, se debe agregar un décimo de cc. de la solución al 5% de glóbulos rojos de carnero.

Se anota el número de décimos de cc. de glóbulos que se emplean, hasta que ya no se produzca la hemolisis.

Al fin de los treinta minutos se agregan a cada uno de los tres primeros tubos un número de décimos de cc. de la solución de glóbulos rojos, igual a la mitad de los empleados en el tubo No. 4.

Se agita para homogenizar bien la mezcla y se les lleva de nuevo a la estufa, hasta que se produzca la hemolisis en el tubo No. 3.

Apreciación de los resultados:

En el tubo No. 3 tiene que producirse forzosamente la hemolisis, (tubo testigo).

En los tubos Nos. 1 y 2 pueden ocurrir varios casos:

1o.—Que haya hemolisis en los dos, entonces la reacción es **negativa**.

2o.—Que no haya hemolisis en ninguno de los dos, la reacción es entonces fuertemente **positiva**.

3o.—Que haya hemolisis en el tubo No. 1 y que no la haya en el No. 2, la reacción es débilmente **positiva**.

APLICACION DE LA REACCION DE FIJACION AL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS HUMANA

La reacción de fijación ha sido aplicada en medicina humana en el diagnóstico de las diferentes formas de la localización de la tuberculosis: visceral, de las serosas, ganglionar, ósteo-articular, cutánea, etc.

Pasaré sucesivamente revista a cada uno de estos grupos, dando a conocer los resultados obtenidos por los autores extranjeros y los obtenidos en mis trabajos.

1o.—TUBERCULOSIS VISCERALES

Tuberculosis pulmonar.

Resultados obtenidos por autores extranjeros: en los casos de tuberculosis confirmada por la clínica, por la presencia de bacilos de Koch en los esputos y por la radiología, la reacción de fijación practicada con un buen antígeno, les ha dado de 85 a 90% de casos positivos. He aquí las proporciones obtenidas por los diferentes autores:

Alliot	81	% en 110 sueros examinados.		
Arloing y Langeron .	69.6	% en 23	„	„
Armand-Delille . . .	91.9	% en 147	„	„
Bezancón y Bergeron	88.6	% en 121	„	„
Bouvier	90.4	% en 42	„	„
Craig	95	% en 107	„	„
Goldenberg	94	% en 195	„	„
Grumbach	95	% en 85	„	„
Lanzengberg	92	% en 197	„	„
Lawrason y Brown .	72	% en 478	„	„
Merklen	100	% en 19	„	„
Rieux y Bass.	98.7	% en 78	„	„
Rist	93.4	% en 90	„	„

Resultados que yo pude obtener: dividí a los enfermos en dos grupos: a) enfermos con lesiones avanzadas y con estado general malo; b) enfermos con lesiones circunscritas y con estado general bueno.

Primer grupo: 60 casos observados; 41 reacciones **positivas**; 19 reacciones **negativas**; 68.3% de casos positivos.

Segundo grupo: 50 casos observados; 45 reacciones **positivas**; 5 reacciones **negativas**; 90% casos positivos.

Total: 110 casos observados; 86 reacciones **positivas**; 24 reacciones **negativas**; habiendo, por consiguiente, obtenido una proporción de 78.2% de casos positivos.

Todos estos enfermos fueron examinados radiológicamente. Sería interminable poner en este trabajo los exámenes de cada uno de ellos. Me limitaré a señalar que todas las radioscopías fueron practicadas en el Servicio de Rayos X del Hospital General por los Drs. Curt Wittkowsky y Luis Velásquez.

¿Puede una reacción positiva transformarse en negativa o viceversa? Muchos autores piensan que lo primero es posible y lo han observado sobre todo en enfermos sometidos a un tratamiento por pneumotórax. Dicen que ésto es debido a una disminución de la cantidad de anticuerpos en estos sujetos y hasta han querido que la reacción no solamente sirva de diagnóstico sino también como pronóstico. Sin embargo, la relación entre la intensidad de las reacciones de fijación y el agravamiento o la mejoría de la tuberculosis pulmonar no es tan estrecha como podría creerse. Así vemos que la reacción aparece negativa en aquellos enfermos caquéticos, con lesiones muy avanzadas y generalizadas, enfermos cuyas defensas han sido completamente minadas por la enfermedad.

En un enfermo con reacción negativa, habrá que hacer una nueva investigación a los 15 días y no será raro encontrarla entonces positiva. Esto es debido a que algunas veces los anticuerpos tardan algún tiempo en aparecer.

Tuberculosis del aparato génito-urinario.

Resultados obtenidos por autores extranjeros: Maisonet y Bass reunieron 7 observaciones de tuberculosis renal confirmada por exámenes de laboratorio. Cinco de éstos tuvieron reacción positiva y dos reacción negativa. En uno de estos últimos casos, el diagnóstico de tuberculosis renal fué siempre dudoso. Tomaron, por el contrario, otras afecciones no tuberculosas del riñón y en todas encontraron la reacción negativa.

Han examinado además el suero de sujetos atacados de epididimitis tuberculosa clínicamente confirmada. En tres de ellos la reacción fué positiva. En tres observaciones de epididimitis dudosa, el resultado fué negativo. El mismo resultado fué registrado en diferentes observaciones de afecciones diversas, no tuberculosas del aparato genital.

Courcoux ha señalado la reacción positiva en un caso de epididimitis tuberculosa y la reacción negativa en otro caso de epididimitis no específica.

Helouin, en tres casos de tuberculosis renal confirmada por la presencia de bacilos de Koch, obtuvo tres reacciones positivas.

No pude encontrar enfermos que presentaran lesiones tuberculosas del aparato génito-urinario. Lo que sí puedo afirmar, es que he encon-

trado la reacción constantemente negativa en sujetos que padecían de afecciones no tuberculosas de dicho aparato. (Blenorragia aguda y crónica, orqui-epididimo-funcultis blenorragica, prostatitis aguda o crónica, cistitis crónica, etc.)

Tuberculosis de forma gastro-intestinal.

Resultados obtenidos por autores extranjeros: con numerosas observaciones han encontrado 83.3% de reacciones positivas en las lesiones tuberculosas intestinales.

Siendo sumamente difícil encontrar enfermos que presenten únicamente lesiones tuberculosas, aisladas del aparato digestivo, solamente he logrado reunir dos observaciones de enteritis tuberculosa. El resultado fué: una reacción positiva y una negativa. No se puede, por consiguiente, sacar de ello una proporción.

2o.—TUBERCULOSIS DE LAS SEROSAS

Pleuresía tuberculosa

Resultados obtenidos por autores extranjeros: Courcoux ha hecho un estudio concienzudo de la reacción de fijación aplicada a 21 enfermos con pleuresía en evolución o curados. La reacción fué hecha por medio de diferentes antígenos. La investigación de los anticuerpos fué efectuada en serie en cada uno de los enfermos: algunos, con pleuresía en evolución, fueron sometidos a tres o cuatro exámenes con ocho días de intervalo. Este punto de la técnica es muy importante, ya que en algunos sujetos en los que la reacción es negativa en un primer examen, puede aparecer positiva en una prueba ulterior. Es muy probable que los fracasos de ciertos autores se deban a la aparición tardía de los anticuerpos, autores que por consiguiente, no le han querido dar ningún valor a la reacción de fijación aplicada al diagnóstico de la pleuresía tuberculosa.

Courcoux ha buscado los anticuerpos simultáneamente en el líquido exudado y en el suero. De una manera general, éstos se encuentran al mismo tiempo en el líquido pleural y en el suero.

El resultado obtenido por este autor es el siguiente: en 17 casos de pleuresía en evolución, ha registrado 11 reacciones positivas y 6 negativas. En los otros 4 casos, que eran pleuresías en regresión, ha encontrado 3 reacciones negativas y 1 positiva.

Bezançon, Bergeron, Bernard, Valtis, Bouvier, etc., han hecho estudios a este respecto con resultados similares. Han obtenido de 60 a 65% de reacciones positivas.

Mis resultados: he estudiado 9 casos de pleuresía sero-fibrinosa en evolución. No he buscado los anticuerpos en el líquido pleural, sino solamente en el suero de estos enfermos. Los resultados han sido los siguientes: 4 reacciones fuertemente positivas; 3 reacciones débilmente

positivas; 2 reacciones negativas; he encontrado 77.7% de casos positivos. Todos estos enfermos han sido sometidos a examen radiológico. 5 de ellos estaban hospitalizados en el Hospital San Vicente; 3 en el Hospital San José; 1 en el 2o. Servicio de Medicina de Hombres en el Hospital General.

Peritonitis y Meningitis Tuberculosa.

Diferentes autores han logrado reunir 19 casos de Peritonitis Tuberculosa de todas las formas. Algunos de estos enfermos presentaban además lesiones pulmonares y pleurales; otros parecían no tener más lesión que en el peritoneal. Según sus estadísticas, de los 19 casos encontraron 16 reacciones positivas, o sea 84.2%.

En lo que se refiere a la Meningitis Tuberculosa, ninguno ha logrado obtener reacciones positivas.

No he podido conseguir ningún caso de Peritonitis o de Meningitis Tuberculosa.

3o.—TUBERCULOSIS GANGLIONAR

Los resultados obtenidos por los autores varían bastante. Mozer y Fried solamente obtienen 37.7% de reacciones positivas. Tal vez esta baja proporción sea debida a que en casi todos los casos, las lesiones eran muy antiguas, de varios años de evolución.

Courcoux dice haber tenido 75% de reacciones positivas. Entre las negativas observadas por este autor, se encontraban un caso de adenitis tratada por rayos X y otro de adenitis inguinal operado.

He reunido 6 casos de adenopatías tuberculosas. 5 de éstos han estado internados en el Hospital San Vicente, y son de localización cervical. Su evolución data de varios años. La otra era una adenitis inguinal, había sido operada en el Servicio de Cirugía de Niñas en el Hospital General, confirmada por examen anatómo-patológico.

Los resultados obtenidos son los siguientes: 2 reacciones fuertemente **positivas;** 4 reacciones **negativas;** o sea 33.3% de casos positivos. Entre las reacciones negativas se encontraba la correspondiente a la enferma de adenitis inguinal operada.

4o.—TUBERCULOSIS OSTEO-ARTICULAR.

Fried y Mozer han buscado los anticuerpos en los sueros de 689 enfermos atacados de Tuberculosis Quirúrgica.

Sus resultados son los siguientes:

Mal de Pott: con menos de tres años de evolución: 77% de reacciones positivas; con más de tres años de evolución: 26.9% de reacciones positivas; con lesiones fistulosas y estado general grave: 26.6%.

Coxalgia: con menos de tres años de evolución: 75% de reacciones positivas; con más de tres años de evolución: 28.5% de reacciones positivas; con lesiones fistulosas y estado general malo: 24.4%.

Además practicaron la reacción de fijación en 105 raquítics, no tuberculosos y obtuvieron 92.5% de reacciones negativas.

He obtenido los resultados siguientes:

Mal de Pott: 10 enfermos, cuya afección variaba en evolución entre 2 y 4 años. 7 se encuentran en el Hospital San Vicente, 2 en el Hospital San José, 1 en el Servicio de Cirugía de Niñas en el Hospital General.

Obtuve: 4 reacciones fuertemente **positivas**; 4 reacciones débilmente **positivas**; 2 reacciones **negativas**; o sea, 80% de reacciones positivas.

Coxalgia: he examinado el suero de 6 enfermas, internadas en el Servicio de Cirugía de Niñas del Hospital General.

Los resultados han sido: 1 reacción fuertemente positiva; 5 reacciones **negativas**; o sea 16.6% de casos positivos.

50.—TUBERCULOSIS CUTANEA

En lo que se refiere al Lupus, los autores están en desacuerdo en la proporción de reacciones positivas. Algunos han encontrado hasta 84% de casos positivos; en cambio otros solamente han obtenido 20%. Parece que el tratamiento local de estas lesiones tiende a suprimir la formación de anticuerpos específicos y por esta razón la reacción de desviación del complemento es en la mayoría de los casos negativa.

He hecho el examen de tres sueros de enfermos con lesiones lúpicas, que han estado en tratamiento durante mucho tiempo en el Hospital San Vicente. He obtenido: 1 reacción débilmente positiva; 2 reacciones negativas.

60.—LA REACCION DE FIJACION EN OTRAS ENFERMEDADES.

Sífilis:

Uno de los obstáculos más grandes que han tenido que vencer los partidarios de la reacción de fijación aplicada a la tuberculosis, ha sido, sin duda, la preparación de un antígeno específico. Todos los primeros investigadores observaron que los antígenos tuberculosos fijaban la alexina en presencia de sueros de sífilíticos. Ichok encontró 100% de reacciones positivas.

Todos los autores estaban, por consiguiente, de acuerdo en decir que una reacción de Wassermann, positiva anulaba la reacción de fijación en la tuberculosis.

Wassermann, con su antígeno, fué el primero en oponerse a esta noción.

Usando el antígeno bencílico del Instituto Sero-Bacteriológico de Leverkuse, he obtenido los siguientes resultados:

100 sueros estudiados con una reacción de Wassermann fuertemente positiva; 95 reacciones **negativas**; 3 reacciones fuertemente positivas; 2 reacciones débilmente positivas; o sea 95% de reacciones negativas.

Para evitar posibles causas de error tomé el suero de la misma sangre que había servido para hacer la reacción de Wassermann.

Contrariamente a la opinión de los autores extranjeros, me atrevo a afirmar que la reacción de fijación en la tuberculosis, conserva todo su valor en los enfermos sifilíticos.

Paludismo:

En nuestro medio, donde el paludismo es tan frecuente, es de importancia capital saber si un individuo portador de hematozoarios y sin lesiones tuberculosas, puede dar una reacción de fijación positiva.

Las estadísticas extranjeras son variables. Algunos han encontrado hasta 41% de reacciones positivas en individuos indemnes de tuberculosis. Otros, por el contrario, no han hallado ni una sola reacción positiva.

He estudiado 60 sueros de enfermos palúdicos, tanto crónicos como agudos.

Los resultados fueron: 54 reacciones negativas; 6 reacciones positivas; o sea, 90% de reacciones negativas.

Cáncer:

No encontré estadística respecto a esta enfermedad. Por curiosidad hice 10 exámenes de enfermos con cáncer en diferentes regiones. Las 10 reacciones fueron **negativas**.

Leprosia:

Slatineano y Danielopol, Meier, Cooke, han observado que los antígenos tuberculosos fijan la alexina en presencia de sueros de leprosos.

Rogers ha notado además, que una emulsión de productos leprosos fijaba la alexina de los sueros tuberculosos.

De Brito-Fontes obtuvo 16 reacciones positivas con los sueros de 19 leprosos.

Taylor y Malone han confirmado todos estos datos, estudiando la reacción de fijación en gran número de leprosos.

Estos resultados pueden explicarse fácilmente por la naturaleza ácido-resistente del bacilo de Hansen.

Por causas ajenas a mi voluntad no puedo ofrecer ninguna observación con respecto a esta enfermedad.

* * *

Todas las reacciones fueron hechas en el Laboratorio Clínico del Hospital General y controladas por el jefe de dicho laboratorio, Dr. don Rafael Morales y por el Ayudante de Serología, Br. don Alfonso Aguilar B.

«El infrascrito Jefe del Laboratorio Clínico del Hospital General, Certifica: que las reacciones que aparecen en el presente trabajo de tesis del Br. Carlos Alberto Casasola, fueron practicadas en este Laboratorio bajo su dirección.

Guatemala, 30 de Octubre de 1943.

R. MORALES.

* * *

«El infrascrito Jefe del Servicio de Rayos X del Hospital General, Certifica: que los exámenes radiológicos de los enfermos cuyos sueros han sido estudiados en el presente trabajo, fueron practicados en este Servicio.

Guatemala, 30 de octubre de 1943.

C. WITTKOWSKY.

Titulación del Suero Hemolítico

Número de los tubos	Emulsión de glóbulos rojos al 5%	Suero hemolítico diluido al 1%	Alexina diluida al 1 por 10	Solución de NaCl al 9 por 1000	Resultado al cabo de 30 minutos a la estufa a 37° No hay hemolisis
1	1 cc.	0.1 cc.	0.5 cc.	1.4 cc.	No hay hemolisis
2	1 cc.	0.2 cc.	0.5 cc.	1.3 cc.	" "
3	1 cc.	0.3 cc.	0.5 cc.	1.2 cc.	" "
4	1 cc.	0.4 cc.	0.5 cc.	1.1 cc.	" "
5	1 cc.	0.5 cc.	0.5 cc.	1 cc.	Hemolisis
6	1 cc.	0.6 cc.	0.5 cc.	0.9 cc.	"
7	1 cc.	0.7 cc.	0.5 cc.	0.8 cc.	"
8	1 cc.	0.8 cc.	0.5 cc.	0.7 cc.	"
9	1 cc.	0.9 cc.	0.5 cc.	0.6 cc.	"
10	1 cc.	1 cc.	0.5 cc.	0.5 cc.	"
Testigos suero hemolítico	1 cc.	1 cc.	—	1 cc.	No hay hemolisis
Testigo alexina	1 cc.	—	0.5 cc.	1.5 cc.	" "

(Cuadro No. 1)

Titulación de la Alexina

Número de los tubos	Emulsión de glóbulos al 5%	Alexina diluida al 1%	Suero hemolítico (20 dosis mínimas)	Solución de NaCl al 9 por 1000	Resultado al cabo de 30 minutos en la estufa a 37°
1	1 cc.	0.1 cc.	0.1 cc.	1.8 cc.	No hay hemolisis
2	1 cc.	0.2 cc.	0.1 cc.	1.7 cc.	" "
3	1 cc.	0.3 cc.	0.1 cc.	1.6 cc.	" "
4	1 cc.	0.4 cc.	0.1 cc.	1.5 cc.	" "
5	1 cc.	0.5 cc.	0.1 cc.	1.4 cc.	Hemolisis
6	1 cc.	0.6 cc.	0.1 cc.	1.3 cc.	"
7	1 cc.	0.7 cc.	0.1 cc.	1.2 cc.	"
8	1 cc.	0.8 cc.	0.1 cc.	1.1 cc.	"
9	1 cc.	0.9 cc.	0.1 cc.	1 cc.	"
10	1 cc.	1 cc.	0.1 cc.	0.9 cc.	"
Testigo suero hemolítico	1 cc.	—	1.8 cc.	1.9 cc.	No hay hemolisis
Testigo alexina	1 cc.	1 cc.	—	1 cc.	" "

(Cuadro No. 2)

Titulación del Poder Auto-Fijador de un Antígeno

Número de los tubos	I Una hora de estufa a 37°			II Glóbulos sensibilizados	Resultados después de 30 minutos de estufa a 37°		
	Dilución del antígeno a varias variaciones.	Alexina diluida a 1/20. Activada a 0.2	Solución de cloruro de sodio al 9.0/100		Dilución del antígeno a 1/10	Dilución del antígeno a 1/20	Dilución del antígeno a 1/30
1	0.3 cc.	0.2 cc.	1 cc.	1 cc.	No hay hemolisis	No hay hemolisis	Hemolisis
2	0.3 cc.	0.3 cc.	0.9 cc.	1 cc.	No hay hemolisis	Hemolisis	Hemolisis
3	0.3 cc.	0.4 cc.	0.8 cc.	1 cc.	Hemolisis	Hemolisis	Hemolisis
4	0.3 cc.	0.5 cc.	0.7 cc.	1 cc.	Hemolisis	Hemolisis	Hemolisis

Cuadro No. 3

Titulación del valor de un antígeno por el método de dosis crecientes de alexina

Número de los tubos	I Una hora de estufa a 37°				II Glóbulos sensibilizados.	Resultados al cabo de 30 minutos en la estufa a 37°.
	Suero tipo calentado.	Antígeno diluido a 1 por 100	Alexina al 10% Dosis activa 0.1	Solución de cloruro de sodio al 9 por 1000.		
1	0.5 cc.	1 cc.	0.1 cc.	0.9 cc.	1 cc.	No hay hemolisis
2	0.5 cc.	1 cc.	0.2 cc.	0.8 cc.	1 cc.	" " "
3	0.5 cc.	1 cc.	0.3 cc.	0.7 cc.	1 cc.	" " "
4	0.5 cc.	1 cc.	0.4 cc.	0.6 cc.	1 cc.	" " "
5	0.5 cc.	1 cc.	0.5 cc.	0.5 cc.	1 cc.	" " "
6	0.5 cc.	1 cc.	0.6 cc.	0.4 cc.	1 cc.	" " "
7	0.5 cc.	1 cc.	0.7 cc.	0.3 cc.	1 cc.	" " "
8	0.5 cc.	1 cc.	0.8 cc.	0.2 cc.	1 cc.	" " "
9	0.5 cc.	1 cc.	0.9 cc.	0.1 cc.	1 cc.	Hemolisis
10	0.5 cc.	1 cc.	1 cc.	—	1 cc.	"
Test. suero						
Sue. 1	0.5 cc.	—	0.1 cc.	1.9 cc.	1 cc.	Hemolisis
Sue. 2	0.5 cc.	—	0.2 cc.	1.8 cc.	1 cc.	"
Sue. 3	0.5 cc.	—	0.3 cc.	1.7 cc.	1 cc.	"
Test. alex.						
Al. 1	—	1 cc.	0.1 cc.	1.4 cc.	1 cc.	Hemolisis
Al. 2	—	1 cc.	0.2 cc.	1.3 cc.	1 cc.	"
Al. 3	—	1 cc.	0.3 cc.	1.2 cc.	1 cc.	"

(Cuadro No. 4)

Titulación del Valor de un Antígeno por el Método de Dosis Crecientes de Antígeno

Número de los tubos	I Una hora de estufa a 37°				II Glóbulos sensibilizados.	Resultados al cabo de 30 minutos en la estufa a 37°
	Suero tipo calentado	Antígeno diluido a 1 por 100	Alexina al 1/10, Dosis activa 0.1	Solución de cloruro de sodio a 9 por 1000		
1	0.5 cc.	0.1 cc.	0.5 cc.	1.4 cc.	1 cc.	No hay hemolisis
2	0.5 cc.	0.2 cc.	0.5 cc.	1.3 cc.	1 cc.	" " "
3	0.5 cc.	0.3 cc.	0.5 cc.	1.2 cc.	1 cc.	Hemolisis
4	0.5 cc.	0.4 cc.	0.5 cc.	1.1 cc.	1 cc.	"
5	0.5 cc.	0.5 cc.	0.5 cc.	1 cc.	1 cc.	"
6	0.5 cc.	0.6 cc.	0.5 cc.	0.9 cc.	1 cc.	"
7	0.5 cc.	0.7 cc.	0.5 cc.	0.8 cc.	1 cc.	"
8	0.5 cc.	0.8 cc.	0.5 cc.	0.7 cc.	1 cc.	"
9	0.5 cc.	0.9 cc.	0.5 cc.	0.6 cc.	1 cc.	"
10	0.5 cc.	1 cc.	0.5 cc.	0.5 cc.	1 cc.	"
Testigo suero	0.5 cc.	—	0.5 cc.	1.5 cc.	1 cc.	Hemolisis
Test. antígeno						
A 1	—	0.1 cc.	0.5 cc.	1.9 cc.	1 cc.	Hemolisis
A 2	—	0.2 cc.	0.5 cc.	1.8 cc.	1 cc.	"
A 3	—	0.3 cc.	0.5 cc.	1.7 cc.	1 cc.	"
A 4	—	0.4 cc.	0.5 cc.	1.6 cc.	1 cc.	"
A 5	—	0.5 cc.	0.5 cc.	1.5 cc.	1 cc.	"
A 6	—	0.6 cc.	0.5 cc.	1.4 cc.	1 cc.	"

(Cuadro No. 5)

Disposición de la Reacción Según el Método de Calmette y Massol

Número de los tubos	I Una hora de estufa a 37°				II 30 m. de estufa a 37°		
	Suero inactiva- do a 55°, 30 minutos	Antígeno metílico diluido a 1/20	Alexina di- luida a 1/15 activa a 0.1	Solución de NaCl al 9 0/00	Emulsión de glóbulos rojos de carnero	Suero he- molítico calentado	
1	0.3 cc.	1 cc.	0.1 cc.	1.1 cc.	1 gota	0.1 cc.	
2	0.3 cc.	1 cc.	0.2 cc.	1 cc.	1 gota	0.1 cc.	
3	0.3 cc.	1 cc.	0.3 cc.	0.9 cc.	1 gota	0.1 cc.	
4	0.3 cc.	1 cc.	0.4 cc.	0.8 cc.	1 gota	0.1 cc.	
5	0.3 cc.	1 cc.	0.5 cc.	0.7 cc.	1 gota	0.1 cc.	
Testigos suero	1	0.3 cc.	—	0.1 cc.	2.1 cc.	1 gota	0.1 cc.
	2	0.3 cc.	—	0.2 cc.	2 cc.	1 gota	0.1 cc.
	3	0.3 cc.	—	0.3 cc.	1.9 cc.	1 gota	0.1 cc.
Testigos antígeno	1	—	1 cc.	0.1 cc.	1.4 cc.	1 gota	0.1 cc.
	2	—	1 cc.	0.2 cc.	1.3 cc.	1 gota	0.1 cc.
	3	—	1 cc.	0.3 cc.	1.2 cc.	1 gota	0.1 cc.

(Cuadro No. 6)

Disposición de la reacción por el procedimiento de Besredka

Numero de los tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Tubos de experiencias						Testigos suero			Testigos antígeno			Testigos alexina				
Antígeno de Besredka	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0	0	0	0.3	0.3	0.3	0.3	0	0	0	0
Suero del enfermo inactivado ...	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0
Alexina diluida a 1/20	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3	0.4	0.5	0.2	0.3	0.4	0.5
Solución de cloruro de sodio al 9 por 1000	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.8	0.7	0.6	0.7	0.6	0.5	0.4	1	0.9	0.8	0.7
	Estufa a 37° durante una hora																
	Dejar a la temperatura del laboratorio una hora																
Emulsión de glóbulos Sensibilizados	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.	1cc.
	Llevar a la estufa a 37° durante media hora.																

(Cuadro No. 7)

Titulación del suero hemolítico Técnica de Besredka

	Tubo A	Tubo B	Tubo C
Tasa del suero hemolítico en la emulsión de glóbulos	0.5 %	1 %	1.5 %
Glóbulos rojos lavados	0.5 cc.	0.5 cc.	0.5 cc.
Solución de cloruro de sodio, 9 por 1,000	9.5 cc.	9.5 cc.	9.5 cc.
Suero hemolítico	0.05 cc.	0.1 cc.	0.15 cc.

(Cuadro No. 8).

Técnica de Besredka (CONTINUACION)

Número de los tubos	1	2	3	4	5	6
Glóbulos rojos sensibilizados	Emulsión de glóbulos sensibilizados del tubo A		Emulsión de glóbulos sensibilizados del tubo B		Emulsión de glóbulos sensibilizados del tubo C	
	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
Alexina diluida al 1/20	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3
Antígeno	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Solución de NaCl al 9 por 1000.. No. de los tubos	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7	0.6

(Cuadro No. 9).

Método rápido con suero no calentado. Procedimiento de Goldenberg

Número de los tubos	Suero humano no calentado	Antígeno	Emulsión de glóbulos de carnero al 5%	Solución de NaCl al 9 0/00
Tubos para el diagnóstico	1	0.1 cc.	0.1 cc.	0.5 cc.
	2	0.1 cc.	0.2 cc.	0.4 cc.
	3	0.1 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.
Tubo cronométrico	4	0.1 cc.	0	0.6 cc.
	5	0.1 cc.	0	0.5 cc.
	6	0.1 cc.	0	0.4 cc.
	7	0.1 cc.	0	0.3 cc.
	8	0.1 cc.	0	0.2 cc.
	9	0.1 cc.	0	0.1 cc.
	10	0.1 cc.	0	—

Agregar, después de la dosificación del poder hemolítico del suero, la emulsión de glóbulos en los tubos 1, 2, 3 y 4, restando 0.1 cc. de la cantidad máxima, hemolisada en 30 m.

(Cuadro No. 10)

CONCLUSIONES

- 1o.—El diagnóstico de la tuberculosis es, sin duda, esencialmente clínico y nada hay hasta hoy, en Serología, que lo supere.
- 2o.—La reacción de fijación del complemento es, sin embargo, de gran utilidad en el diagnóstico de la tuberculosis, ya que proporciona un dato complementario precioso, que, agregado a la clínica y al examen radiológico, puede aclarar alguna duda sobre el particular.
- 3o.—La reacción negativa no permite rechazar la idea de tuberculosis, pero cuando la sero-reacción es positiva, constituye un argumento de gran valor en favor de la existencia de alguna lesión tuberculosa, que se encuentra en cierto grado de actividad.
- 4o.—Es inútil hacer la prueba de desviación del complemento en aquellos sujetos cuya lesión es antigua, o en los que se encuentran ya en estado caquético.
- 5o.—Es, al contrario, muy interesante practicar la sero-reacción en las personas en quienes se sospecha una lesión tuberculosa reciente. La alta proporción de reacciones positivas en tales enfermos, demuestra su gran utilidad práctica.
- 6o.—La reacción de fijación es constantemente negativa en los sifilíticos y en los palúdicos.

CARLOS A. CASASOLA.

Imprímase:

RAMIRO GALVEZ A.,
Decano.

P R O P O S I C I O N E S:

Anatomía Descriptiva	Pulmones
Anatomía Topográfica	Topografía tóraco-pulmonar
Anatomía Patológica	De la tuberculosis pulmonar
Bacteriología	Bacilo de Koch
Botánica Médica	Pinus Maritima
Clínica Quirúrgica	Exploración de la columna vertebral
Clínica Médica	Exploración indirecta del aparato respiratorio
Física Médica	Espirometría
Fisiología	de la respiración
Higiene	Dispensario anti-tuberculoso
Medicina Legal y Toxicología	Asfixia por submersión
Histología	del pulmón
Obstetricia	Mola hidatiforme
Patología General	Herencia tuberculosa
Patología Quirúrgica	Mal de Pott
Patología Médica	Neumonía caseosa
Patología Tropical	Peste
Pediatría	Infiltración tuberculosa crónica curable en la infancia.
Psiquiatría	Oligofrenia
Parasitología	Tenia Solium
Técnica Operatoria	Resección costal
Química Biológica	Reacción de Gmelin
Química Inorgánica	Yodo
Química Orgánica	Eucaliptol
Terapéutica	Codeína.

BIBLIOGRAFIA

Agasse Lafont E.—Las aplicaciones prácticas del laboratorio a la clínica.

Altofft, M.—Rapports entre la réaction de fixation et celle d'agglutination dans la tuberculose. C. R de la soc. de Biol.

Andrus P. M.—A clinical study of 289 serum reactions with tuberculo-antigens. The Am. Rev. of Tub.

Arloing F. y Biot R.—Sur la fixation du complément chez les tuberculeux.

Arloing F. y Langeron.—Réaction de fixation du complément pratiquée avec l'antigène de Besredka sur liquide céphalo-rachidien. Revue de la tuberculose, t. III, p. 431.

Armand-Delille.—Etudes sur les anticorps tuberculeux au moyen de l'antigène méthylique. Revue de la tuberculose, t. II, p. 389.

Armand-Delille y Ducrohet.—Contribution a l'étude de la réaction de fixation du complément chez les enfants tuberculeux. Revue de la Tuberculose, t. V, p. 433. Juin 1924.

Armand-Delille y Negre.—Technique de la réaction de déviation du complément de Bordet et Gengou. 1922.

Aronson y Lewis.—Further studies on the complement fixation reaction as applied to tuberculosis. The Am. Rev. of Tub. 1923.

Bass.—Séro-diagnostic de la tuberculose au moyen de l'antigène de Besredka.

Bernard L. y Valtis J.—Réaction de fixation et tuberculose. Revue de la Tuberculose, t. III, p. 246. 1922.

Bezancon F. y Bergeron A.—La réaction de fixation du complément par les antigenes tuberculeux.

Blanco J.—Valor de la reacción de fijación del complemento para el diagnóstico de la tuberculosis. Archivos del Instituto Nacional de Higiene de Alfonso XIII. 1923.

Cooke J. V.—Complement fixation in tuberculosis.

Couthard H. L.—The complement test in tuberculosis. 1923.

Durrieu H. y Hausen H.—Valeur pratique de la réaction de déviation du complement appliquée au diagnostic de la tuberculose. 1938.

Dopter Ch. y Sacquépée E.—Precis de Bactériologie. 1931.

Domingo P. y Pera M.—La reacción de desviación del complemento en la infección tuberculosa. 1924.

Fraser E.—The complement-fixation test in tuberculosis. 1926.

Goldenberg L.—Réaction de fixation dans la tuberculose, au moyen de l'antigene de Besredka. 1923.

Ichok.—Le séro-diagnostic de la tuberculose au moyen de l'antigene de Besredka.

Jiménez Díaz C.—Lecciones de Patología Médica.

Meyer K.—Acerca de la naturaleza de los anticuerpos tuberculosos de los sueros humanos. 1938.

Sergent E.—Traité élémentaire d'exploration clinique medicale. 1937.

Urquijo C. A. y Pagniez N. F. M.—La reacción de Besredka en el hijo de tuberculosa. 1937.