

Aspectos prácticos de la preparación y uso de los sueros precipitantes

Por JUAN M. MIRAVENT y RODOLFO FERNÁNDEZ

A partir del año 1897 cuando R. KRAUS comunicó el descubrimiento de las precipitinas, se inicia para la inmunología una era nueva en la cual alcanza rápida difusión el estudio y conocimiento exacto de ese fenómeno. Al propio tiempo nacen procedimientos de aplicación en las ciencias afines.

Poco después de KRAUS, BORDET y TSCHISTOVITCH, en 1899, comprueban la existencia de precipitinas anti-albúmina y con este hallazgo aparece un amplio campo de experimentación y estudio, intensamente explotado hasta nuestros días.

Estos estudios fueron ratificados poco después por los de MYERS, KOWARSKY, etc., y luego por numerosos autores cuyas contribuciones han permitido alcanzar el progreso que hoy comprobamos en la materia.

Es a UHLENHUTH y colaboradores a quienes principalmente debemos la utilización de las precipitinas en el reconocimiento de albúminas, con aplicación a la medicina legal. Mucho se ha publicado después de estos trabajos y muchos conceptos nuevos se han agregado, especialmente en lo referente a la forma, proporciones y leyes de combinación de antígeno-anticuerpo, pero su aplicación forense poco se ha beneficiado con ello. Puede decirse que en la actualidad el método original de UHLENHUTH, constituye el procedimiento de elección en medicina legal, al que los estudios mencionados han añadido la prueba científica y del tiempo de su exactitud.

En este resumen de carácter eminentemente práctico, nos apartamos en lo posible de la parte teórica del problema, para puntualizar lo que la experiencia nos ha aconsejado como más útil en la preparación, titulación y aplicación diagnóstica de los sueros precipitantes llamados anti-albúmina. Antes de pasar a la parte prác-

tica conviene recordar algunos principios que rigen las reacciones de precipitación — fruto de los estudios modernos — y el discutido punto de la especificidad.

LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA FLOCULACIÓN. — Los estudios modernos a que haremos referencia en la forma más somera posible, han permitido un profundo conocimiento de muchos aspectos del fenómeno de la precipitación. Se sabe perfectamente, hoy día, que el grado de formación del complejo antígeno-anticuerpo y de su floculación varía según las condiciones del experimento. Es acelerado por los procedimientos que aumentan la velocidad de impacto entre las partículas del complejo; tales procedimientos incluyen la reducción del volumen total (disminución del espacio entre las partículas reactivas), el aumento del grado de movimiento (agitación, corrientes líquidas al llevar a baño de 37°, inmersión incompleta), el óptimo de concentración de electrólitos y especialmente la temperatura.

A DEAN se debe el conocimiento de las proporciones de antígeno y anticuerpo en la reacción de precipitación; ya en 1911 demuestra que la cantidad del precipitado depende de las proporciones relativas en la mezcla.

Al añadir a cantidades variables de antígeno una cantidad constante de anticuerpo, se nota que con cierta cantidad de antígeno es mayor el precipitado y que con la mitad del anticuerpo la mayor precipitación ocurre con la mitad de antígeno, etc. Cuando se reducen ambos reactivos se retarda o impide la reacción. OPIE demuestra que el precipitado puede no aparecer o ser disuelto por exceso de antígeno.

En 1926, DEAN y WEBB trabajando con suero de conejo anticaballo, elaboran un método denominado de proporciones óptimas para la medición cuantitativa de antígeno y anticuerpo aplicable a los sueros precipitantes.

Ensayan diversas proporciones de anticuerpo frente a cantidades variable de antígeno, hallando así la relación óptima antígeno-anticuerpo que es una constante para cada suero. Si para 1/20 de anti-suero la dilución óptima de antígeno es de 1/320, para 1/40 es de 1/640, conservando siempre la relación constante de 1/16. Un exceso de cualquier reactivo hace más lenta la floculación.

DEAN y WEBB designan a la reacción antígeno-anticuerpo con floculación más rápida, con el nombre de proporción óptima y sobre 33 sueros encuentran valores de 1/177 a 1/14, es decir que una parte de antígeno flocula en condiciones óptimas con 177 ó 14 partes de anticuerpo. En otros términos, para una cantidad dada de

antígeno (1 volumen) se requiere la misma cantidad de anticuerpo, contenida en un caso en 177 volúmenes y en otro en 14; en este último la concentración de anticuerpo es mucho mayor.

El sistema usado por DEAN y WEBB, mantiene constante la cantidad de anticuerpo. En este sentido es idéntico el utilizado por UHLENHUTH.

TAYLOR, ADAIR y ADAIR, comprueban y amplían lo hallado por DEAN y WEBB, investigando las relaciones del punto de neutralidad, la constante anticuerpo, la floculación óptima y la precipitación máxima. Se basan en los trabajos de CULBERSTON, por análisis del líquido sobrenadante, como medio de establecer la zona de neutralidad.

Trabajan con albúmina cristalizada de huevo y su respectivo antisuero, pues, cuando usan suero de conejo anti-caballo, no pueden determinar exactamente el punto de neutralización, atribuyendo este hecho a que la albúmina de caballo es una mezcla de diferentes antígenos.

Afirman que hay un punto neutro donde no existe antígeno o anticuerpo en el líquido sobrenadante. En este punto el promedio de valores en la relación de N del precipitado a N del anticuerpo es de 1/11 a 1/15, y esta relación es constante. El punto neutro corresponde al llamado por DEAN y WEBB, óptimo constante anticuerpo. Con crecientes cantidades de antígeno y anticuerpo constante, el mayor precipitado ocurre en la zona de exceso de antígeno, en una cantidad que varía, como ya lo determinaron DEAN y WEBB, de 1,6 a 2,4 veces la dosis de antígeno en el óptimo. Cuando el antígeno es constante, la primera floculación no se produce en el punto neutro, sino con 1,6 veces la cantidad óptima de anticuerpo, pero la precipitación es más abundante aumentando el anticuerpo, el cual no inhibe hasta quince veces la cantidad óptima.

DEAN y WEBB dicen que en la práctica el único punto de interés es la investigación y diferenciación de pequeñas trazas de albúminas y que las mejores condiciones son dadas por variables cantidades de antígeno y altas concentraciones de anticuerpo. Expresan el título de un suero como la mayor dilución de antígeno que produce turbidez visible, usando anticuerpo puro o en dilución baja (1/5 - 1/10), siendo el mejor anticuerpo el que descubre menores cantidades de antígeno.

Los autores que como TOPLEY y CRUICKSHANK estudian los dos sistemas de floculación, antígeno constante y anticuerpo constante, hallan valores diferentes para cada sistema y aunque teóricamente debieran ser idénticos, en la práctica pueden ser muy distintos. La relación antígeno anticuerpo con antígeno constante no es 1/16 co-

mo en el ejemplo que mencionan, para constante anticuerpo, sino 1/40 y si se busca la floculación rápida se encuentra un valor 6 veces mayor que el óptimo de neutralización.

Esta discordancia curiosa entre los valores de precipitación óptima con sistema constante anticuerpo y constante antígeno ha sido analizada por MARRACK y por BROWN bajo puntos de vista generales. MARRACK llama procedimiento α al de constante anticuerpo y β al de constante antígeno, comúnmente usado en la valoración de toxina antitoxina por floculación.

Se halla con el procedimiento α floculación neutra usando la sustancia soluble específica del neumococo y su respectivo antisuero; en cambio con el procedimiento β se constata floculación óptima en la zona de exceso de anticuerpo y por lógica fuera de la zona neutra.

BROWN divide las reacciones de precipitación en tres clases: 1º aquellos sistemas antígeno-anticuerpo en los cuales los procedimientos α y β dan la misma relación (p. e., T. A. diftérica), 2º los que dan relación distinta con los proc. α y β , pero con tratamiento especial (agitación después de primera lectura y observación de los precipitados que resisten la dispersión o son estables), dan con el procedimiento α la misma relación que con el β , y 3º aquellos donde persiste la diferencia de valores α y β pese a la agitación.

En el caso 2º está el sistema subs. soluble del neumococo y su antisuero y en el caso 3º los sueros precipitantes antihumanos.

En la práctica debe usarse el sistema de titulación de anticuerpo constante. No conviene diluir excesivamente el anticuerpo porque disminuye la sustancia precipitable y porque se afecta la velocidad e intensidad de la reacción. El método de antígeno constante, sus modificaciones y su relación con el anticuerpo constante han contribuído al esclarecimiento de los fenómenos de floculación y sus relaciones cuantitativas.

La especificidad de las reacciones de precipitación. — La reacción de precipitación ha permitido apreciar y limitar las diferencias biológicas de las proteínas de especies distintas, animales y vegetales. Las experiencias de muchos autores y en particular de NUTTALL prueban que un suero inmune actúa más intensamente con el suero o proteína usados en la inmunización y también con antígenos de especies próximas; la intensidad de las reacciones guarda relación con el grado de parentesco zoológico. Si las especies son próximas la distinción por precipitinas es dificultosa (UHLENHUTH y SEIFFER, DEAN, LANDSTEINER, etc.).

La diferenciación de proteínas de especies próximas puede practicarse según FUJIWARA con sueros absorbidos con antígenos heteró-

logos; el mismo resultado puede conseguirse por desensibilización in vivo con antígeno heterólogo (DAKIN y DALE, WELLS y OSBORNE). El método de precipitación parcial usado exitosamente por varios autores, ha sido criticado por otros, que a su vez aconsejan la comparación del valor límite (UNLENHUTH y SEIFFERT).

En lugar de mencionar las variadas opiniones sobre el fundamental problema teórico planteado por la inespecificidad relativa, preferimos recordar que la especificidad de los sueros inmunes disminuye con la inmunización prolongada (UHLENHUTH y SEIFFERT, HOOKER y BOYD, etc.) y aún hay variaciones individuales de especificidad en animales de la misma especie como productores de anticuerpos. (MANTEUFELD y BERGER).

Preparación de los sueros precipitantes. — Nuestra técnica de inmunización difiere escasamente de la preconizada por UNLENHUTH y SEIFFERT, se aparta algo del sistema de DEAN y WEBB y está basada en ciertos principios enumerados a continuación. Seleccionamos animales grandes y sanos (conejos), perfectamente cuidados y alimentados con verde y cereal; inoculamos por vía venosa en dos series de inyecciones bien espaciadas; suprimimos las cantidades excesivamente grandes por ser contraproducentes en cuanto al título y especificidad, por igual razón no inoculamos con demasiada frecuencia; aprovechamos el consejo difundido de espaciar ampliamente cada serie de inyecciones y finalmente practicamos una buena selección de los productores de antisuero, basada en la eliminación de los animales que no produzcan suero de título alto y específico. En cuanto a la vía de inoculación elegimos la venosa para la rutina; la peritoneal completa en ciertos casos la inmunización y la subcutánea la reservamos para desensibilizar los animales, evitando las muertes que se producen con las cantidades grandes por vía venosa o al iniciar la segunda serie. El antígeno usado debe ser suero fresco estéril.

Después de varios ensayos preferimos el sistema siguiente: inoculación con dos series de inyecciones endovenosas espaciadas dos meses entre sí.

Cada serie consta de las siguientes cantidades: 1, 1 1/2, 2, 2 1/2, 3, 3, 3 c. c. con 5-6 días de intervalo; excepcionalmente llegamos a 5 c. c. Horas antes de las inoculaciones grandes inyectamos 1 c. c. por vía subcutánea.

Esta dosis desensibilizante evita la muerte de animales por anafilaxia, no perjudica el valor del suero y es aconsejable antes de iniciar la segunda serie; la dilución del suero con fisiológica y la inyección lenta aumentan la tolerancia de las cantidades grandes de antígeno.

A pesar de todas las precauciones mueren conejos por anafilaxia. Se observan también variaciones muy grandes individuales en cuanto a título y especificidad, y por esa razón eliminamos los animales inapropiados al término de la 1ª serie. La producción de anticuerpos debe juzgarse, por lo tanto, después de la primera serie; de acuerdo a este criterio eliminamos todos los animales que después de 10 días de la última inyección de la primera serie no formen precipitinas de un valor específico de 1/1.000 o bien formen anticuerpos inespecíficos, para especies bien distintas de un valor que alcance o pase de 1/100. Estos animales, malos productores, pueden perjudicar una buena partida de suero y por ello, se eliminan. El cuadro N° 1 revela la producción escasa e inespecífica de anticuerpos en animales tratados en las mismas condiciones del resto.

CUADRO N° 1

| Suero precipitante | Antígeno: Dilución de suero en solución fisiológica 1/2 cc | | | | | | | | | |
|--------------------|--|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|---|
| | Caballo | | | Bovino | | | Humano | | | C |
| | 1/1000 | 1/5000 | 1/10000 | 1/1000 | 1/5000 | 1/10000 | 1/1000 | 1/5000 | 1/10000 | |
| Anticaballo | | | | | | | | | | |
| 1 | + | ± | ? | — | — | — | — | — | — | — |
| 2 | ++++ | +++ | ++ | ± | ? | — | ± | ? | — | — |
| 3 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 4 | ++++ | +++ | ++ | ? | — | — | ? | — | — | — |
| 5 | ++ | + | ± | — | — | — | — | — | — | — |
| 6 | +++ | ++ | + | — | — | — | — | — | — | — |
| | 1/100 | 1/500 | 1/1000 | 1/10 | 1/50 | 1/100 | 1/10 | 1/50 | 1/100 | |
| 1 | + | ? | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 2 | ++++ | +++ | ++ | — | — | — | — | — | — | — |
| 3 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 4 | ++++ | ++++ | ++ | + | + | + | + | + | + | — |
| 5 | ± | ± | ± | — | — | — | — | — | — | — |
| 6 | + | + | + | — | — | — | — | — | — | — |

Seis conejos inoculados con dos series de inyecciones. Temperaturas de incubación de 37° y ambiente. Un suero (n° 4) conserva inespecificidad.

Al término de la segunda serie de inyecciones y después de 10 días de la última, practicamos un segundo ensayo, donde exigimos valor específico por lo menos de 1/10.000, con un inespecífico de 1/500 como máximo.

En el caso de excelente valor homólogo pero también el heterólogo resulte excesivo, se repite la sangría después de otros 15 días, ya que en ocasiones éste se atenúa, conservándose aquél.

Si el resultado revela título insuficiente o inespecífico, conviene eliminar al animal. Si el valor homólogo fuera inferior pero cercano a 1/10.000 se puede reforzar mediante 1 ó 2 inyecciones intraperitoneales de 10 c.c. de antígeno. Un nuevo descanso de 2 ó más meses y una tercera serie puede resolver el problema cuando la preparación no exige urgencia o economía.

En resumen; la selección de animales, dosando individualmente los anticuerpos y el método de inmunización discontinua, así como la inoculación exclusiva de suero sanguíneo fresco y estéril, como antígeno, nos han dado buen resultado práctico, sin olvidar la buena alimentación y el cuidado de los animales productores.

Si la valoración mencionada es aceptable, se procede a la sangría definitiva, practicada por lo menos 10 días después de la última inyección. Sangrando antes del término dicho, se constatan floculaciones parciales in vitro, muy molestas, así como mayor valor inespecífico.

Antes de la sangría total se dejan en ayunas 24 horas los animales y aquélla se realiza por punción estéril de la carótida. Cada suero se recibe por separado; así se titula al día siguiente, después de eliminado el coágulo y evitando la hemólisis. Se reúnen los sueros buenos, se filtran por bujía Berkefeld y de acuerdo a nuestra observación los dejamos en la heladera a 0° durante 2 ó 3 meses en condiciones de absoluta esterilidad. Consideramos conveniente dicha permanencia por dos razones; en primer término para que se produzca la floculación in vitro — siempre inevitable — antes de la segunda filtración y reparto; además, hemos comprobado una franca disminución del valor inespecífico por simple estacionamiento a 0°, como puede apreciarse en el cuadro 2.

Para terminar con la preparación aconsejamos la conservación estéril a 0° en ampollas al abrigo de la luz, o bien la desecación al vacío en condiciones de esterilidad.

Titulación de los sueros precipitantes. — Mucho se ha escrito y mucho hemos trabajado en la elección de un buen método de titulación. Resumiremos la experiencia adquirida diciendo que preferimos el método original de UHLENHUTH, que corresponde al luego

CUADRO N° 2

| Sueros: 0.1 cc. | Antígeno: 1 cc. | Sueros frescos 2 h. 37° | Tres meses estacionados (0°) 2 h. 37° |
|-------------------|-----------------|----------------------------|---|
| Humano | Humano 1/5000 | +++ | +++ |
| » | » 1/10000 | + | ++ |
| » | Sol. fisiol. | 0 | 0 |
| Sol. fisiol. | Humano 1/5000 | 0 | 0 |
| Humano | Bovino 1/1000 | + | 0 |
| » | Caballo 1/1000 | ++ | 0 |
| » | Cerdo 1/1000 | + | 0 |
| » | Bovino 1/5000 | 0 | 0 |
| » | Caballo 1/5000 | 0 | 0 |
| » | Cerdo 1/5000 | 0 | 0 |
| Bovino | Bovino 1/5000 | +++ | +++ |
| » | » 1/10000 | ++ | ++ |
| » | S. Fisiol. | 0 | 0 |
| S. fisiol. | Bovino 1/5000 | 0 | 0 |
| Bovino | Humano 1/1000 | + | 0 |
| » | Caballo 1/1000 | ++ | 0 |
| » | Cerdo 1/1000 | ++ | 0 |
| » | Humano 1/5000 | 0 | 0 |
| » | Caballo 1/5000 | 0 | 0 |
| » | Cerdo 1/5000 | + | 0 |
| Caballo | Caballo 1/5000 | ++++ | +++ |
| » | » 1/10000 | +++ | ++ |
| » | S. fisiol. | 0 | 0 |
| S. fisiol. | Caballo 1/5000 | 0 | 0 |
| Caballo | Humano 1/1000 | ++ | 0 |
| » | Bovino 1/1000 | ++ | 0 |
| » | Cerdo 1/1000 | +++ | 0 |
| » | Humano 1/5000 | ± | 0 |
| » | Bovino 1/5000 | ± | 0 |
| » | Cerdo 1/5000 | + | 0 |

Incubación a 37° para hacer más nítido el fenómeno.

denominado sistema de anticuerpo constante. En nuestra experiencia debe practicarse la lectura de los resultados a los 5 minutos de permanencia a temperatura ambiente. Las temperaturas de 37° a 40°, si bien intensifican la reacción facilitando la lectura, en cambio provocan un aumento proporcionalmente mayor del valor inespecífico, con los inconvenientes consiguientes. Es decir, se observa la disminución de la zona de especificidad por mayor acercamiento de ambos valores, precisamente lo que se trata de impedir en una reacción de limitada especificidad. (Cuadro N° 3).

CUADRO N° 3

| Suero de conejo N° | Inoculados con una serie. — 2 h. a 37° | | | | | | Contral. Sol. fis. | Inoculados con 2 series. — 2 h. a 37° | | | | | | Contral. Sol. fis. | | | | | |
|---------------------------------|--|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|----------------------------------|---------|-------------|-------------|---|---|
| | Antígeno 1/1000 | | | Antígeno 1/10000 | | | | Antígeno 1/1000 | | | Antígeno 1/10000 | | | | | | | | |
| | Caballo | Bovi- no | Hu- mano | Caballo | Bovi- no | Hu- mano | | Caballo | Bovi- no | Hu- mano | Caballo | Bovi- no | Hu- mano | | Caballo | Bovi- no | Hu- mano | | |
| 393 | + | ± | ± | ± | — | — | — | — | ++ | + | + | + | — | — | — | + | — | — | — |
| 387 | ++++ | + | + | +++ | — | — | — | — | +++ | ± | ± | +++ | ? | ? | — | ++ | — | — | — |
| 372 | + | — | + | ± | — | ± | — | — | ++ | + | + | + | — | — | — | ++ | — | — | — |
| 367 | ++++ | + | + | +++ | ± | — | — | — | ++++ | +++ | ++ | +++ | + | + | — | + | ± | ± | — |
| 332 | ++++ | + | + | ++ | — | — | — | — | ++++ | + | + | ++ | ± | ± | — | + | — | — | — |
| 394 | ++++ | + | + | +++ | — | — | — | — | ++++ | + | + | +++ | ± | ± | — | ++ | — | — | — |

Demuestra la influencia de la temperatura haciendo inespecífico el total de los sueros.

Todo el material de vidrio debe estar perfectamente limpio, seco y carente del menor resto de materia orgánica. Preferimos para la práctica los tubos de la reacción de KAHN, dispuestos en soportes que permitan una lectura fácil. Una buena fuente de luz así como la relativa oscuridad del laboratorio son condiciones necesarias para la lectura. El uso del fotómetro y la habitación oscura son las condiciones ideales.

Por variadas razones y en particular por el mayor título, facilidad en la técnica, como también por la uniformidad y constancia de los resultados, efectuamos siempre la valoración con sueros frescos, como antígeno.

Tanto éstos como los sueros precipitantes deben ser perfectamente transparentes y libres de partículas; la filtración por bujía o la centrifugación permiten obtener dicha condición indispensable.

Con solución fisiológica al 0,85 %, bien transparente, se practican diluciones del suero usado como antígeno en las proporciones siguientes: 1/500, 1/1.000, 1/2.500, 1/5.000, 1/10.000, 1/15.000 y 1/20.000 para el antígeno homólogo; igual número pero de concentración diez veces menor para los heterólogos. De cada dilución se coloca 1 c.c. en un tubo de KAHN, añadiendo rápidamente y bien medido el antisuero a ensayar, en volumen de 0,1 c.c. Como controles empleamos la misma cantidad de antisuero añadida a sol, fisiológica y la mayor concentración de antígeno sin antisuero. A los 5 minutos después de agitación uniforme de todos los tubos de reacción y controles, se efectúa la lectura, anotando la dilución mayor de antígeno específico y de cada uno de los no específicos donde se observa opacidad neta. Durante los 5 minutos establecidos, todo el sistema debe permanecer a temperatura ambiente próxima a 20°. Anotado el valor específico y los heterólogos, se establece la relación E./N.E., indicadora de la utilidad práctica de cada suero, puesto que un buen suero debe contener por lo menos 50 a 100 veces más precipitinas específicas comparadas, desde luego, con las de especies alejadas.

Como criterio práctico basta una separación amplia entre ambos valores, para su aplicación diagnóstica, p. e., un suero antihumano de valor específico de 1/10.000 e inespecífico de 1/500 o menos, para antígeno de caballo, vaca o cerdo, puede utilizarse con seguridad en diluciones mayores que las mencionadas últimamente. El resultado será bueno con diluciones de antígeno de 1/2.000 a 1/10.000. UHLENHUTH en la determinación del valor no específico procede así: diluye los sueros heterólogos a 1/200 y 1/1.000; el específico a 1/1.000. Todos los volúmenes son de 1 c.c.; a cada tubo agrega 0,1 de antisuero y exige que a los 20 minutos de permanencia

a temperatura ambiente no se constata enturbiamiento franco en diluciones de 1/200; en caso contrario se elimina dicho antisuero. El criterio citado es excelente, pero tal vez de exigencia demasiado rigurosa.

La reacción de precipitinas en el reconocimiento de proteínas.— Nos limitaremos al diagnóstico de origen de una sustancia o de una mancha en Medicina Legal. Al llegar el material al laboratorio, para reconocer o negar el origen humano, se procede de acuerdo a la naturaleza de dicho material. En el caso de tratarse de sangre, se procede en primer término a verificar su naturaleza mediante las reacciones micro-químicas de hemoglobina y de ser posible investigando la existencia de eritrocitos.

Inmediatamente se procura obtener una buena suspensión en solución fisiológica, tratando de desprender lo mejor posible el material sospechoso del objeto que lo contiene, empleando para conseguirlo instrumental libre de materia orgánica. Realizada esta primera etapa, se pesa dicho material para emulsionarlo en 100 veces su peso de solución fisiológica de 0,85 % estéril; material y solución quedan una noche a 0° en recipiente de tapa esmerilada, libre también de materia orgánica. Al día siguiente se agita durante 1 hora con perlas de vidrio y finalmente se centrifuga o filtra, según la cantidad, usando en este caso crisoles Jena con filtro de vidrio que retienen poco líquido, con el fin de suprimir en absoluto toda partícula en suspensión y contar con un líquido perfectamente transparente y claro. De esta suspensión o dilución de concentración aproximada al 1 % se obtiene otra más exacta al 0,5 % por comparación de la turbidez de una dilución de suero humano, que se utiliza para contralor, al 0,5 % y a la que se añade ácido tricloroacético. La citada dilución cuya opacidad se iguala a la de suero al 1/200, sirve a su vez para preparar otras más altas, de 1/500, 1/1.000, 1/2.000, 1/5.000 y 1/10.000. De igual manera, del suero humano contralor se harán las mismas diluciones, así como también de todos los animales cuya intervención pueda admitirse.

En una gradilla apropiada se colocan dos series de 6 tubos cada una con las diluciones mencionadas (de 1/200 a 1/10.000) del material sospechoso por una parte y del suero humano contralor en la otra serie; todos los volúmenes serán de 1 c.c.; además se añadirán 3 tubos con los contralores siguientes: del material sospechoso a 1/200, del antisuero completado con solución fisiológica y de ser posible del objeto que vehiculiza la mancha en su parte libre de la misma.

Dispuesto el experimento en esta forma y contando con suero antihumano puro y límpido, se añade rápida y exactamente medido 0,1 c.c. a todos los tubos mencionados, salvo como es lógico al contralor de antígeno. Se agita rápidamente la gradilla, se anota el tiempo, se espera 5 minutos y se lee. Si el antisuero conserva su poder, la reacción testigo será positiva hasta 1/10.000; si el valor fuera en ese momento inferior a 1/1.000 se desecha el antisuero y se repite con otro. Establecido el valor actual del antisuero con la reacción testigo, se lee inmediatamente el correspondiente al material en estudio, anotándose ambos valores. Si son idénticos o muy próximos la reacción se considera positiva o indicadora de sangre humana, siempre que los 3 contralores antes citados permanezcan transparentes. La reacción se practica a temperatura ambiente y se anota como valor aquella dilución con opacidad neta.

Si los valores son iguales o próximos el resultado es positivo. Si el valor es alto con el suero humano (1/5.000 o más) y bajo con el material examinado en forma que el tubo correspondiente a 1/200 quede transparente después de 20 minutos, la reacción será negativa. En casos de reacción aproximada pero algo distante, p. e., 1/5.000 con el suero humano y 1/500 para el material a examinar, el resultado no será categórico y deberá compararse con: *a*) suero antihumano frente a distintos antígenos animales como ser, suero de oveja, caballo, cerdo, etc., anotando el valor máximo de inespecificidad, *b*) suero antihumano absorbido y estabilizado con el antígeno heterólogo cuya naturaleza se aduzca y *c*), finalmente con la fijación de complemento.

Todos los ensayos mencionados deben practicarse con líquidos prácticamente neutros.

CONCLUSIONES

La buena técnica de preparación, medición y conservación es condición indispensable para el éxito de la prueba. La ejecución meticulosa, el empleo de todos los contralores necesarios, así como cierta práctica previa de las reacciones de este tipo son condiciones absolutamente requeridas en pruebas de tan grande responsabilidad. No basta un buen suero de alto valor y específico; se requiere igualmente buena técnica y rodearse de todas las garantías experimentales necesarias con abundancia de suero precipitante y alto número de reacciones de contralor, en especial la reacción de fijación de complemento.

BIBLIOGRAFIA

- LANDSTEINER, K., *The Specificity of Serl. React.* 1926.
BROWN, A. M., *Brit. Jour. Exper. Path.* 1935, 16, 554.
TAYLOR, G. H., ADAIR, G. S. and ADAIR, M. E., *J. Hyg.* 1933, 32, 340; 1934, 34, 118.
DEAN, H. R., *A System of Bact.* 1931, t. 6, 424.
DEAN, H. R. and WEBB, R. A., *J. Path. Bact.* 1926, 29, 473; 1928, 31, 89.
GOLDSWORTHY, N. E., *J. Path. Bact.* 1928, 31, 220.
MARRACK, J. and SMITH, F. C., *Brit. J. Exp. Path.* 1931, 12, 30 y 182.
MARRACK, J. and SMITH, F. C., *Brit. J. Exp. Path.* 1932, 13, 394.