

CAPÍTULO XVIII

MÉTODOS DE EXAMEN DEL LÍQUIDO CÉFALO-RAQUÍDEO

REACCIONES D E LAS GLOBULINAS

Hemos visto en el capítulo correspondiente que los prótidos presentes en el l.c.r. normal son las albúminas y las globulinas. Estas últimas se encuentran en cantidades ínfimas. En numerosas afecciones del sistema nervioso central las globulinas pueden sufrir aumento considerable que interesa conocer. Habitualmente su investigación se hace con diferentes reacciones que dan resultados negativos ante las cantidades de globulinas normales, pero que se hacen positivas cuando aquellas se encuentran aumentadas. Una serie grande de sustancias se han propuesto para esta investigación cualitativa, veremos alguna de ellas.

REACCIÓN D E PANDY (1307)

Es la más frecuentemente utilizada por lo sencilla y por la pequeña cantidad de l.c.r. empleada.

Soluciones. — Se emplea la técnica de preparación de **ZALO-ZIECKI (1398)** :

Acido fénico cristalizado	8 a 10 grs.
Agua destilada	100 C.C..

Agitar fuertemente la mezcla y llevarla a la estufa a 37° durante 24 horas y luego dejarla a temperatura ambiente por varios días. Por encima de la capa oleosa de ácido fénico queda la solución acuosa saturada que es el reactivo de Pandy, que se decanta y se guarda en frasco oscuro.

Técnica.

- 1) En un tubo de hemolisis colocar 1 C.C. de reactivo de Pandy.
- 2) Agregar 1 gota de l.c.c., agitar.
- 3) Hacer la lectura a los 3 minutos.

Lectura. — Se hace sobre fondo **oscuro**, lo que permite apreciar mejor la opalescencia o la turbidez producidas por los líquidos **patológicos**. Es aconsejado por algunos autores, la comparación con un **l.c.r.** normal, lo que facilita la apreciación de las pequeñas opalescencias.

Los resultados se expresan de la siguiente manera:

- a) La mezcla no cambia de aspecto. **Reac.** negativa (—).
- b) Opalinidad, reacción positiva (+).
- c) Enturbiamiento, reacción positiva (++) .
- d) Enturbiamiento fuerte, reacción positiva (+++).
- e) Enturbiamiento lechoso, reacción positiva (++++) .

Para **KAFKA** (1399) y **LEVINSON** (1400) la reacción es un **índice** de la fracción globulínica del **l.c.r.** Sin embargo Pandy dice que es una prueba para albúminas y globulinas. **SCHMIDT** (1401) **no** cree tampoco que sea una reacción definida para las globulinas. Sin embargo, es la reacción que satisface más en la práctica y la que corrientemente se realiza.

Algunos autores frente a una reacción de Pandy negativa, admiten un valor normal de los prótidos del **l.c.r.** Son de esa opinión **ZALOZIECKI** (1398), **GREENFIELD** (1402), **ESKUCHEN** (1403) y **NEEL** (1404).

OBARRIO y **RECHNIEWSKI** (1405) en un brillante trabajo sobre las globulinas del **l.c.r.**, afirman que la reacción no es nunca positiva, sin un aumento de los prótidos.

IZIKOWITZ (1406), **MADONICK** y **SAVITSKY** (1407), dicen que un Pandy negativo no excluye la posibilidad de un aumento de los prótidos.

En nuestra experiencia en la inmensa mayoría de los casos un Pandy negativo corresponde a albuminorraquias normales.

REACCIÓN DE NONNE-APELT (1408)

Es con la reacción de Pandy la más frecuentemente utilizada en nuestro medio.

Reactivo.

Sulfato de amonio q.p.	85 grs.
Agua destilada	100 C.C.

Colocarlos en vaso de Erlenmeyer y calentar la mezcla hasta la disolución completa de la sal. Dejar enfriar y filtrar. La solución debe ser neutra frente al papel de tornasol.

Técnica.

- 1) Colocar en un tubo de hemolisis 0 C.C. 5 del reactivo.
- 2) Agregarle 0 C.C. 5 de **l.c.r.** y agitar.
- 3) Hacer la lectura a los 3 minutos.

Lectura.

Se procede de igual manera que en la reacción anterior, y se expresa de acuerdo a los grados de turbidez que ya vimos.

J. BAPTISTA DOS REIS (1409) hace la lectura de la turbidez en el nefelómetro de Pulfrich expresando los valores en turbidez absoluta, evitando así la poco **precisa** terminología que se usa corrientemente.

En los casos normales la reacción de Nonne-Apelt da valores comprendidos entre 0,006 y 0,015 en tanto que en los casos patológicos pueden observarse valores de 0,080 o mismo más altos. En nuestra opinión, tal modificación es una complicación técnica poco práctica y no creemos tenga divulgación.

REACCIÓN DE ROSS JONES (1410)

No es más que una modificación de la anterior.

Reactivo. — Igual que el utilizado en la reacción de Nonne-Apelt.

Técnica.

- 1) Colocar en un tubo de hemolisis 0 C.C. 5 del reactivo.
- 2) Superponerle 0 C.C. 5 del **l.c.r.**, haciendo deslizar a este suavemente por las paredes del tubo para evitar que se mezcle el reactivo.

Lectura.

Se hace también sobre fondo oscuro. En los casos positivos aparece en el punto de contacto un anillo blanquecino tanto más fuerte cuanto más intensa sea la reacción la que se informará como los casos anteriores por medio de cruces.

Si él anillo no aparece a los 2 minutos la reacción se considera negativa. La prueba no debe leerse pasado ese período de tiempo.

En la práctica se realiza primero la técnica de Ross Jones, por superposición, y luego se agita el tubo y se tiene entonces la **reacción** de Nonne-Apelt.

Las reacciones de Nonne-Apelt y Ross Jones son utilizadas sobre todo por los americanos e ingleses. Desde el punto de vista teórico, la reacción de Nonne-Apelt es la única específica de las globulinas, puesto que estas **precipitan** por el sulfato de amonio a media saturación; no sucede lo mismo con la de Ross Jones pues en el punto de **contacto** la concentración del sulfato de amonio es del 85 %, o sea una solución saturada, que precipita no sólo las globulinas sino también las albúminas.

REACCIÓN DE NEWMAN (1411)

Reactivo.

Ácido tánico q.p. 5 grs.
Solución de ácido fénico al 2 % 100 C.C.

Técnica.

- 1) Colocar en un tubo de hemolisis 1 C.C. de reactivo.
- 2) Dejar caer 1 gota de **l.c.r.**
- 3) Esperar un minuto y proceder a la lectura.

Lectura.

Se hace y se expresa de igual manera que la de Pandy.

Según el autor, esta reacción tiene igual sensibilidad que la de Pandy. La ventaja de la reacción de **Newman** sobre aquélla es que una vez alcanzado el máximo, al minuto, se mantiene estacionado durante mayor tiempo.

REACCIÓN DE WEICHBRODT ⁽¹³⁹⁾**Reactivo.**

Reactivo de mercurio q.p.	1 gr.
Agua destilada	1000 C.C.

Técnica.

- 1) Colocar en un tubo de hemolisis 0 C.C. 3 del reactivo.
- 2) Agregar 0 C.C. 7 de l.c.r. y agitar suavemente.
- 3) Proceder inmediatamente a la lectura.

Lectura.

Igual que en las **reacciones** anteriores.

La reacción presenta una sensibilidad comparable a la de **Nonne-Apelt**.

REACCIÓN D E NOGUCHI ⁽¹⁴¹⁾**Reactivo.**

1) ácido butírico purísimo	10 grs.
agua destilada c.s.p.	100 C.C.
2) hidróxido de sodio	4 grs.
agua destilada c.s.p.	100 C.C.

Técnica.

- 1) en un tubo colocar 0 C.C. 1 de l.c.r. y 0 C.C. 5 de la solución de ácido butírico.
- 2) calentar hasta ebullición y agregar rápidamente 0 CC. 1 de la sol. de soda.
- 3) hervir nuevamente.

Lectura.

En los casos positivos aparece un precipitado granuloso o coposo que luego se deposita en el fondo del tubo. No deben tomarse como positivo los **enturbiamientos** difusos.

Esta reacción, agrega a su poca practicidad una menor **sensibilidad** frente a las otras reacciones por lo que ha sido abandonada.

PRUEBA DEL ALCOHOL**Reactivo.**

Alcohol etílico a 95°

Técnica.

- 1) En un tubo de hemolisis colocar 1 C.C. de alcohol.
- 2) Agregar 1 gota de l.c.r.

Lectura.

En los casos positivos aparece una **turbidez** o precipitación. Los **líquidos** normales dan una ligera opalescencia.

Hemos ensayado repetidas veces esta reacción y consideramos, que como los líquidos normales pueden dar, como ya hemos visto, una ligera opalescencia, en manos poco experimentadas puede llevar a considerar como positivas una reacción negativa, por este hecho no la aconsejamos.

Reacción de Sagastume, Vucetich y Gherxi.**Reactivo.**

Sulfato de amonio	50 grs.
Acido sulfosalicílico	1 gr.
Acido fénico	3 grs.
Agua destilada	100 c.c.

Técnica.

- 1) En un tubo de hemolisis colocar 1 C.C. de reactivo.
- 2) Superponer 0 C.C. 5 de **l.c.r.**
- 3) Proceder a la lectura luego de 5 minutos.

Lectura.

En los casos positivos en la zona de contacto aparece un anillo blanquecino.

Sensibilidad de las diferentes reacciones para investigar las globulinas

En orden decreciente, la sensibilidad de las diferentes reacciones es la siguiente :

- 1º) Reacciones de Pandy y Newman.
- 2º) Reacciones de Nonne-Apelt, **Ross** Jones y Weichbrodt.
- 3º) Reacción de Noguchi.

Elección de las reacciones de las globulinas

Dada la gran sensibilidad y la pequeña cantidad de **l.c.r. necesaria**, la reacción de Pandy es la más aconsejable y la más utilizada. Realizamos nosotros además, la reacción de **Nonne-Apelt** y **Ross** Jones.

En caso de ser muy pequeña la cantidad de **l.c.r.** enviada para examen, **realizamos** solamente la reacción de Pandy.

DETERMINACIÓN DE LOS PRÓTIDOS TOTALES

Todos los **métodos** de dosificación de prótidos en líquidos biológicos pueden ser aplicados al **l.c.r.**; hacen exclusión los **métodos** densimétricos, **dado** el pequeño tenor en sustancia proteica que generalmente tienen.

Haremos una revista crítica sucinta de algunos de los diferentes métodos **preconizados** y describiremos luego los utilizados por nosotros en la práctica diaria.

MÉTODOS GRAVIMÉTRICOS

Dado su poca practicidad y el requerimiento **más 0 menos** grande de material, hacen que no sean utilizados en la clínica.

MÉTODOS VOLUMÉTRICOS

Entendemos como **tales** el procedimiento de Kjeldahl con destilación. Este principio ha sido aplicado por **RAPPAPORT y LASOWSKI** (¹⁴¹⁴) y por **BERNHARD** (¹⁴¹⁵) para la dosificación de los prótidos en el l.c.r. en pequeña cantidad de líquido. Utilizando volúmenes mayores de l.c.r., el procedimiento de **HOWE** (¹⁴¹⁶) se ha utilizado como control de los otros métodos empleados.

MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

La utilización del principio de Kjeldahl puede hacerse también por procedimientos **colorimétricos**, tal como lo hacen **WALTER y BAKST** (¹⁴¹⁷) para la dosificación de prótidos en el l.c.r.

Otros métodos colorimétricos utilizados en la clínica y que han tenido aceptación son los basados en la coloración de la **tirosina** con el reactivo de los fenoles, preconizada por primera vez por **WU** (¹⁴¹⁸) para la determinación de los prótidos totales en sangre.

Posteriormente **LING** (¹⁴¹⁹) lo aplica al l.c.r. Más tarde **HEWITT** (¹⁴²⁰) lo modifica y lo utiliza para el estudio del fraccionamiento proteico en el mismo humor. Con el mismo principio **MATZ y NOVICK** (¹⁴²¹) crean un método de dosificación. En nuestro medio **GIANNETTO** (¹⁴²²) ha divulgado un método de dosificación, que basado en el principio de la coloración **obtenida** con el reactivo de los fenoles frente a la tirosina, **tiene** la ventaja sobre los métodos anteriores propuestos, de la poca cantidad de l.c.r. utilizada, 1 c.c., que permite no sólo la dosificación de los prótidos, sino también la de la glucosa y cloruros.

MÉTODOS DIAFANOMÉTRICOS

Son los procedimientos más corrientes de uso en la clínica y tienen gran valor práctico.

Se basan todos ellos en la absorción de la luz, por el precipitado proteico obtenido por diferentes reactivos y su comparación con un padrón proteico utilizado como tipo. La comparación con la solución tipo se hace con una serie de tubos en el método de **MESTREZAT** (¹⁴²³) y de **KINGSBURY, CLARK, WILLIAMS y POST** (¹⁴²⁴); en el nefelómetro en los métodos de **DENIS AYER** (¹⁴²⁵) y **AYER, DAILEY y FREMONT SMITH** (¹⁴²⁶) y en el fotómetro en la técnica de **DOS REIS** (¹⁴²⁷).

Además de las críticas generales 'inherentes a todos-los métodos nefelométricos se pueden agregar otros en el caso particular que tratamos: dosificación en el **l.c.r.** de un conjunto de albúminas y globulinas, variables en sus cantidades relativas, y capaces ellas de dar, a igual concentración, distintos grados de turbidez.

MÉTODOS BASADOS EN LA MEDIDA DE UN VOLUMEN PRECIPITADO

Entre estos métodos-están los de **NISSL** (¹⁴²⁸), **el de SICARD y CANTALQUBE**, **el de KAFKA y RAUTENBERG** (¹⁴²⁹), **etc.** Son aún utilizados por numerosos laboratorios, a pesar de ser teóricamente muy inexactos; consideran sus defensores que a pesar de ello, tienen en la práctica suficiente valor para los fines clínicos.

MÉTODOS CRONOMÉTRICOS

De uso muy generalizado en nuestro medio. Primeramente utilizado en orina por Roberts, Stolnikow y Brandberg, fué aplicado al **l.c.r.** por **ZALOZIECKI** (¹⁴³⁰). Son métodos con grandes errores y muy ligados al factor personal. Sirven sólo como discriminación grosera entre líquidos con contenido proteico normal o patológico.

Pasaremos ahora a la descripción de los métodos utilizados por nosotros en la determinación de los prótidos totales en el **l.c.r.**

MÉTODO DE KINGSBURY, CLARK, WILLIAMS y POST (¹⁴²⁴)

Reactivos.

1) Soluciones padrones.

a) En un frasco de Erlenmeyer de 250 c.c., hacemos una marca a la altura de los 200 c.c. Colocamos en él aproximadamente 150 c.c. de agua destilada y 20 grs. de gelatina pura. Calentamos a temperatura de 45° a 50° hasta su disolución. Completamos luego con agua destilada hasta la marca de los 200 c.c. Añadimos luego, media clara de huevo, mezclamos bien por agitación y llevamos a baño maría hirviendo durante 30 minutos. Filtramos en caliente, a través de papel de filtro Whatman N° 4, doblado. El filtrado debe ser perfectamente claro, aunque débilmente amarillento. En el momento del uso agregamos por cada 100 c.c. del filtrado 0 cms. 3 de formol al 40 %.

b) En una probeta graduada de 50 c.c. colocamos 0 grs. 25 de sulfato de hidrazina, que se disuelve en 25 c.c. de agua destilada. Le añadimos luego 2 grs. 5 de urotropina disueltos en aproximadamente 15 c.c. de agua destilada. Completamos ahora con agua destilada hasta la marca 50 c.c. Dejamos reposar la mezcla y luego de 15 horas se formará un precipitado blanco amorfo, el que por inversión suave en la probeta se distribuye uniformemente.

c) Tomamos 14 C.C. de la mezcla anterior y se añaden a 100 C.C. de la solución a) , agitando suavemente. Se obtiene procediendo de esa manera un enturbiamiento equivalente a 1 gr. de proteínas por litro. De esa solución se preparan padrones de 0 gr. 90, 0 gr. 80, etc., diluyéndola de acuerdo con el siguiente cuadro :

Valores del padrón en grs. por litro.	Cantidad en c.c. del padrón al 1%	Cantidad en c.c. de la solución de gelatina
1,00	10,0	0,0
0,9	9,0	1,0
0,80	8,0	2,0
0,70	7,0	3,0
0,60	6,0	4,0
0,50	5,0	5,0
0,40	4,0	6,0
0,30	3,0	7,0
0,20	2,0	8,0
0,10	1,0	9,0

Estas diluciones se colocan en tubos de hemolisis de iguales dimensiones, se tapan y se sellan con lacre. Se dejan enfriar a la temperatura ambiente. Los padrones obtenidos pueden ser utilizados durante 8 a 10 meses.

2) **Acido sulfosalicílico** al 3 %.

Técnica.

1) Colocamos en un tubo de hemolisis, de iguales dimensiones al de las soluciones padrones, 1. C.C. de l.c.r.

2) Agrégamos 3 c.c. de la solución ácido sulfosalicílico. Mezclamos bien por inversión del tubo.

3) Dejamos en reposo 5 minutos y comparamos el grado de enturbiamiento con los tubos padrones sobre fondo oscuro.

En caso de encontrar valores superiores a 1 gr. por litro, repetimos la prueba con l.c.r. diluido, para que procediendo de la manera anterior, se obtenga una turbidez que corresponda a la escala de los padrones. Con este método, las proteínas en el l.c.r. normal están en los alrededores de Ogr.30 por litro.

MÉTODO D E GIANNETTO ⁽¹⁹²²⁾

Las proteínas del l.c.r. se precipitan por el ácido tungstico. Se hidroliza el precipitado y se le trata con el reactivo de los fenoles, comparando el color desarrollado con el de una solución padrón de tirosina tratada de igual manera.

Reactivos.

- 1) Solución de tungstato de sodio al 10 %.
- 2) Solución de ácido sulfúrico 2/3 N.
- 3) Solución de hidróxido de sodio al 5 %.
- 4) Solución madre de tirosina.
 Tirosina q.p. 50 mgrs.
 Solución de ácido clorhídrico N/10 . 250 C.C.

Esta solución contiene 0 gr. 200 de tirosina por litro, 1 C.C. contiene pues, 0 mgr. 2.

5) Solución saturada de carbonato de sodio;

Carbonato de sodio anhidro	28 grs.
Agua destilada	100 C.C.

6) Reactivo de los fenoles.

En un frasco de Erlenmeyer de 1000 C.C. colocamos:

Tungstato de sodio	50 grs.
Molibdato de sodio	17 grs. 50
Agua destilada	350 C.C.
Acido fosfórico al 85 %	25 C.C.
Acido clorhídrico concentrado	50 C.C.

Hervir suavemente durante 10 horas con condensador a reflujo. Enfriamos y añadimos:

Sulfato de litio	75 grs.
Agua destilada	25 C.C.

Agitamos hasta la completa disolución, y añadimos algunas gotas de agua de bromo. Hervimos libremente para expulsar el bromo en exceso. Enfriamos y llevamos a 500 C.C. con 'agua destilada y filtramos.

Técnica.

1) En un tubo de centrifuga graduado, rotulado **M**, colocamos 1 C.C. de l.c.r. y le agregamos 0 c.c. 5 de la solución de tungstato de sodio y 0,5 C.C. de la solución de ácido sulfúrico. Agitamos y dejamos en reposo durante 30 minutos.

2) Completamos con agua destilada hasta 10 C.C., agitamos y centrifugamos 15 minutos a 3.000 revoluciones.

3) Volcamos el líquido sobrenadante, que es utilizado, como luego veremos para otras dosificaciones, dejando escurrir bien el tubo y secando su boca con papel de filtro.

4) Agregamos 0,05 C.C. de la solución de hidróxido de sodio, tapamos el tubo con una gasa y llevamos a baño maría hirviendo por 15 minutos. Enfriamos y agregamos agua destilada hasta la marca de 4 C.C.

5) La solución testigo la preparamos tomando 1 C.C. de la solución de tirosina a la que se añade 9 C.C. de agua destilada; de esta solución tomamos 2 C.C. y la llevamos a un tubo graduado, rotulado T y le agregamos agua destilada hasta los 4 C.C.

6) Agregamos a ambos tubos, desconocido y testigo, 0,5 C.C. de reactivo de los fenoles y 1,5 C.C. de la solución saturada de carbonato de sodio, agitamos, invirtiendo suavemente los tubos.

7) Dejamos en reposo durante 20 minutos y comparamos el colorímetro.

Cálculo. —

$$\frac{T}{M} \times 0,52 = \text{grs. de proteína por litro de l.c.r.}$$

Con este método los valores de proteína normales en el l.c.r. están comprendidos entre 0 gr.25 a 0 gr. 40 por litro.

Fraccionamiento proteico en el l.c.r. — Dosificación por separado de las albúminas y globulinas

La separación de las albúminas y globulinas está basada en iguales fundamentos que los utilizados para otros líquidos biológicos, es decir, la precipitación de las globulinas con sulfato de amonio a media saturación. En el l.c.r. el problema técnico es mayor, dada la pequeña cantidad de líquido a nuestra disposición y su pobreza en sustancias proteicas.

Los diferentes métodos descritos dosifican por una parte las proteínas totales, por otro, las globulinas. Las albúminas se obtienen por diferencia de esos valores.

SAMSON (1431) utilizando tubos de centrífuga especial, determina las proteínas totales por la medida del volumen del precipitado obtenido con el reactivo de **Esbach**, y las globulinas por su precipitación con sulfato de amonio a media saturación, su redisolución posterior en suero fisiológico y precipitación subsiguiente por el reactivo de **Esbach**, y la medida del precipitado así obtenido.

HEWITT (1432) basándose en el método de Wu y Ling, precipita las proteínas totales por el ácido túngstico y las globulinas por sulfato de amonio a media saturación. A ambos precipitados los hidroliza y les agrega luego reactivo de los fenoles comparando el color desarrollado con el de una solución de tirosina, tratada de igual manera.

MATZ y NOVICH (1433) utilizan un método similar.

Dos REIS (1434) siguiendo los mismos principios generales, dosifica nefelométricamente las proteínas totales y las globulinas, comparándolas con una solución tipo obtenida a partir de una mezcla de suero sanguíneo humano.

MÉTODO DE MATZ y NOVICH (1433) MODIFICADO

Determina por un lado los prótidos totales y por otro las globulinas, precipitadas por sulfato de amonio a media saturación. Los precipitados hidrolizados son tratados por el reactivo de los fenoles.

Determinación de las proteínas totales. —

Seguimos la técnica de Gianetto, descrita en la página 245.

Determinación de las globulinas. —

REACTIVO. — 1) Solución saturada de sulfato de amonio.

Sulfato de amonio	85 grs.
Agua destilada	100 C.C.
Disolver en caliente:	

Se utilizan además los reactivos descritos en la técnica de Gianetto para la **dosificación** de 18s prótidos totales.

TÉCNICA. — 1) En un tubo de centrífuga graduado colocamos 5 C.C. de l.c.r. y 5 C.C. de la solución saturada de sulfato de amonio. Agitamos y llevamos al **baño** maría a **56°** durante 30 minutos.

2) Centrifugamos a 3.000 revoluciones durante 15 a 20 minutos. Decantamos el líquido sobrenadante, secando bien la boca del tubo con un papel de filtro.

3) Agregamos al precipitado 1 C.C. de la solución de tungstato de sodio y agitamos bien hasta su disolución; agregamos 4 C.C. de agua y 1 C.C. de la solución de ácido sulfúrico. Mezclamos bien por inversión del tubo y centrifugamos durante 10 a 15 minutos a 3.000 revoluciones.

4) Decantamos el líquido sobrenadante y agregamos al precipitado 0,5 C.C. de la solución de hidróxido de sodio, tapamos el tubo con una gasa y llevamos a baño maría hirviendo durante 15 minutos. Enfiamos y agregamos agua destilada hasta los 4 CC.

5) Para la preparación de la solución de tirosina tomamos 1 C.C. de la solución madre y agregamos 9 C.C. de agua destilada; de esta solución tomamos 2 C.C. llevando a un tubo graduado rotulado T y completamos a 4 C.C. con **agua** destilada.

6) Agregamos a ambos tubos, **desconocido** y **testigo**, 0,5 C.C. de los reactivos de los fenoles y 1,5 C.C. de la solución saturada de carbonato de sodio. Agitamos por inversión de los tubos.

7) Dejamos en reposo durante 20 minutos y comparamos. al colorímetro.

Cálculo. —

$$\frac{5}{M} \times \frac{0,65}{5} = \text{grs. de globulina por litro de l.c.r.}$$

Determinación de las albúminas. —

Proteínas totales por litro -- globulinas por litro = grs. de albúmina por litro de l.c.r.

DOSIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS

(Método de FOLIN) (1435).

Fundamento. — Basada en la reacción coloreada que estos cuerpos dan con el ácido a naftoquinoneulfónico en medio alcalino.

Reactivos.

1) Solución de α naftoquinonsulfonato de sodio a 0,5 %, recientemente preparado, puesto que se oscurece al cabo de pocas horas.

2) Solución de hidróxido de sodio al 1 %, que sirve para dar a los líquidos la reacción adecuada.

3) Solución acetoacética.

Acido acético al 50 % 50 c.c.
Solución acuosa de acetato de sodio al 5 % 50 c.c.

Retarda por su acción amortiguadora el enturbiamiento producido por la precipitación del hiposulfito y aumenta por otra parte la intensidad del color del compuesto aminoácido-quinona formado.

4) Solución de hiposulfito de sodio al 4 %.

5) Solución de tungstato de sodio al 10 %.

6) Solución de ácido sulfúrico 2/3 N.

7) Solución alcohólica de fenoltaleína al 0,25 %.

8) Solución padrón de aminoácido.

Solución madre.

Disolver 0 gr. 5353 de glicocola en 1.000 c.c. de ácido clorhídrico N/10. Esta solución contiene 0 mgr. 1 de nitrógeno por c.c.

Solución tipo.

Solución madre 7 CC.
Solución de ácido clorhídrico N/10 c.s.p. 10 cc.

Cada c.c. de esta solución contiene 0 mgr. 07 de nitrógeno.

Técnica.

1) En un tubo de centrífuga colocamos 2 c.c. de l.c.r. y le añadimos 2 c.c. de agua destilada, 0,5 c.c. de la solución de tungstato de sodio y 0,5 c.c. de la solución de ácido sulfúrico, Dejamos en reposo durante 5 minutos y luego centrifugamos.

2) En una probeta de 10 c.c., rotulada M, colocamos 4 c.c. del líquido claro sobrenadante; en una probeta de 25 c.c., rotulada T, vertemos 1 c.c. de la solución tipo de aminoácido. A cada probeta agregamos 1 gota de la solución alcohólica de fenoltaleína y además a la probeta marcada T, 1 c.c. de la solución de hidróxido de sodio al 1 %.

3) A la probeta marcada M, le agregamos gota a gota, solución de hidróxido de sodio hasta alcanzar una coloración estable e igual a la de la probeta T.

4) A la probeta M le añadimos 0,8 c.c. del reactivo naf-toquinónico y a la probeta T, 2 c.c. de la misma solución. Agitamos ambas probetas y dejamos en reposo 24 horas en la oscuridad.

5) A la probeta M se le añaden 0,8 c.c. del reactivo aceto-acético e igual cantidad de la solución de hiposulfito. A la probeta T se le agregan 2 c.c. de cada una de esas soluciones.

6) Completamos con agua hasta la marca 10 c.c.

Cálculos.

$$\frac{T}{D} \times 1,75 = \text{miligrs. de nitrógeno aminado por 100 c.c. de l.c.r.}$$
REACCIÓN DEL TRIPTOFANO ⁽¹⁴³⁶⁾**Reactivos.**

- 1) **Acido** clorhídrico concentrado.
- 2) Solución de formol al 2 %.
- 3) Solución de nitrato de sodio al **0,6** por ciento.

Técnica.

1) Colocamos en un tubo de ensayo 2 C.C. de **l.c.r.**, le añadimos **0,5** C.C. de ácido clorhídrico y 2 6 3 gotas de la solución de formol. Agitamos bien el tubo y dejamos en reposo durante 5 minutos.

2) Superponemos 2 C.C. de la solución del nitrato de sodio dejando en reposo por 2 a 3 minutos.

En los casos positivos aparece en la superficie de contacto un anillo de color violeta.

PRUEBA DE LEVINSON ⁽¹⁴³⁷⁾**Reactivos.**

- 1) Solución **acuosa** de ácido sulfosalicílico al 3 por ciento.
- 2) Solución acuosa de bicloruro de mercurio al 2 por ciento.

Técnica.

Se utilizan tubos delgados de fondo plano.

1) En dos tubos se colocan en cada uno 1 CC. de **l.c.r.**; a uno de ellos rotulado S, agregar 1 C.C. de la solución de ácido **sulfo**-salicílico y al otro, rotulado B, 1 C.C. de la solución de bicloruro.

2) Dejamos en reposo 24 horas a la temperatura ambiente.

3) Medimos con ayuda de una regla la altura de los sedimentos de ambos tubos.

En **l.c.r.** normales el sedimento en ambos tubos es muy pequeño. En las meningitis supuradas el sedimento en el tubo S es considerable, y por lo regular tres veces superior al del tubo B. En las meningitis bacilares ocurre lo contrario y la precipitación en el tubo B es tres veces mayor que la **obtenida** en el tubo S. Para los fines diagnósticos no interesa la cantidad depositada, sino la altura relativa en milímetros de los sedimentos. Algunas veces el precipitado no se deposita, sino que pequeños flóculos quedan adheridos a las paredes del tubo, es aconsejable en esos casos, agitar ligeramente los tubos, dos a tres horas antes de hacer la lectura.

Si no hubiera formación de precipitado, repetimos la prueba usando una solución de bicloruro de mercurio al 2 % y de ácido sulfosalicílico al 6 %.

Urea

Si queremos dosificar con toda rigurosidad la urea, tenemos que recurrir a los métodos específicos, tales como los que **utilizañ** el xantidrol (¹⁴³⁸), la ureasa (¹⁴³⁹), etc. Es suficiente, sin embargo, para las necesidades clínicas, la técnica del hipobromito de KNOP (¹⁴⁴⁰) y HÜFNER (¹⁴⁴¹) modificada, que **sólo** nos da un **índice** de la cantidad de compuestos que desprenden nitrógeno bajo la acción de los oxidantes. Podemos omitir en esta dosificación la desalbnminación, dado el pequeño contenido en **pró-****tidos** del l.c.r. Si se tratara de líquidos patológicos con alto contenido proteico, más de 3 grs., se llevará a cabo la desproteinización con ácido tricloroacético.

Reactivos.

- 1) Solución de **hidróxido** de sodio al 30 %.
- 2) Solución alcohólica de fenoltaleína al 1 %.
- 3) Solución de hipobromito de sodio.

Lejía de soda D 1,33	50 C.C.
Agua destilada	100 C.C.
Bromo	15 grs.

En la mezcla de agua y soda, introducimos la punta ligeramente calentada de la ampolla que contiene el bromo ; esto produce su ruptura y a medida que el bromo descende, sin sacar el pico de la ampolla de la mezcla, agitamos 'con una varilla de vidrio hasta la completa disolución.

- 4) Solución de ácido tricloroacético al 10 %.

Técnica. — L.c.r. sin desalbuminar.

- 1) **Colocamos 2,5 C.C.** de l.c.r. en la cuba del ureómetro de Ambarl y con ayuda de una pequeña cantidad de agua destilada lo hacemos pasar al interior del aparato, ayudándonos de compresiones y decompresiones suaves y sucesivas, de la pera de goma.

- 2) Seguimos introduciendo agua destilada en pequeñas fracciones, ayudándonos con la pera de goma, hasta que apretada ésta a fondo, el líquido alcance el nivel de la llave, incluso su orificio, y entonces procedemos a su cierre.

- 3) Colocamos en la cuba del ureómetro 5 C.C. de la solución de hipobromito de sodio y abriendo la llave se les deja penetrar lentamente al aparato, por decompresión de la pera, dejando un pequeño resto de hipobromito en la cuba que se desprecia. Enjuagamos con agua la parte superior para evitar la proyección del hipobromito.

- 4) Agitamos violentamente la pera por unos minutos y finalmente colocamos el aparato en posición vertical, dejando así que se reúna en la parte superior del vástago el gas desprendido, procediendo a la lectura de su volumen.

Cálculo.

Cada décima de C.C. de gas desprendido corresponde a 0,10 gr. de urea por 1.000 de l.c.r.

Técnica con l.c.r. desalbuminado.

1) En un tubo de centrífuga colocamos 4 C.C. de l.c.r. y 4 C.C. de la solución de ácido tricloroacético ; **agitamos**, dejamos en reposo unos minutos y centrifugamos.

2) Llevamos a la cuba del ureómetro 5 C.C. del líquido claro **sobreñadante**, le agregamos 1 gota de la solución de **fenoltaleína** y solución de soda hasta la **aparición** de un débil color rosado. Procedemos luego de igual manera que en el caso anterior y realizamos el cálculo en la misma forma.

CREATININA**Método de FOLIN-WU (1442).**

Fundamentos. — La creatinina frente a una solución de picrato de sodio (reactivo de Yaffé) da una coloración roja que es comparada con una solución tipo de creatinina tratada de igual manera.

Reactivos.

1) Solución madre de creatinina.

Creatinina pura y seca	0 gr. 1
Acido clorhídrico N/10 c.s.p.	100 C.C.

2) Solución tipo de creatinina.

Solución madre	1 C.C. 5
Solución de ácido clorhídrico N/10	50 C.C.
Agua destilada c.s.p.	250 C.C.

Esta solución contiene 6 miligrs. de creatinina por mil.

3) Solución saturada de ácido pícrico.

Acido pícrico	15 grs.
Agua destilada c.s.p.	1000 C.C.

Conviene hervir esta solución para que se disuelva bien el ácido pícrico y que el exceso cristalice por enfriamiento.

4) Solución de hidróxido de sodio al 10 %.

5) Solución de tungstato de sodio al 10 %.

6) Solución de ácido sulfúrico 2/3 N.

Técnica.

1) En un tubo de ensayo colocamos 2 C.C. de l.c.r., 1 C.C. de la solución de tungstato de sodio, 1 C.C. de la solución de ácido sulfúrico y dejamos en reposo durante 10 minutos. Agregamos luego 16 C.C. de agua destilada y filtramos.

2) A 10 C.C. del filtrado colocado en una probeta rotulada M, se le agregan 5 C.C. de la solución saturada de ácido pícrico y 1 C.C. de la solución de hidróxido de sodio.

3) En otra probeta, marcada T, colocamos 2,5 C.C. de la

solución tipo de creatinina, **7,5** C.C. de agua destilada, 5 C.C. de la solución saturada de ácido pícrico y 2 C.C. de la solución de hidróxido de sodio.

4) Esperamos 15 minutos y comparamos al **colorímetro**.

Cálculos.

$$\frac{T}{M} \times 1,5 = \text{miligrs. de creatinina por 100 C.C. de l.c.r.}$$

ÁCIDO ÚRICO

Método *de* BROWN (1443).

Fundamentos. — El color producido por la acción del reactivo fosfotúngstico con el ácido úrico en el filtrado libre de proteínas del **l.c.r.** es comparada con una solución tipo de ácido úrico tratada de igual manera.

Reactivos.

1) *Solución madre de ácido úrico.* — Pesar exactamente 1 gr. de ácido úrico y colocarlo en un frasco de Erlenmeyer de **500** C.C. En un vaso de Bohemia ponemos **0,45** a **0,50** gs. de carbonato de litio y 150 C.C. de agua destilada, calentamos a una temperatura de 55 a **60°**, hasta la disolución, que es favorecida por una agitación constante. Se vierte esta solución en el recipiente conteniendo el ácido úrico. Colocamos el frasco bajo chorro de agua fría, tan pronto aclare el líquido y continuamos la agitación. Pasamos luego el líquido a un matraz aforado de 1.000 C.C., diluyendo a un volumen de 400 a 500 C.C. con agua destilada. Le añadimos 25 C.C. de formol y luego de agitación, 3 C.C. de ácido acético glacial. Agitamos bien para expulsar el anhídrido carbónico y le agregamos agua destilada hasta el enrase. Conviene guardar la solución en frascos **pequeños**, bien tapados y al abrigo de la luz.

Solución tipo de ácido úrico.

Tomamos 2 C.C. de la solución madre y lo colocamos en un matraz aforado de 500 C.C., añadiéndole 1 C.C. de formol y 10 C.C. de una solución de ácido sulfúrico **2/3** N. Diluimos con agua destilada hasta el enrase.

5 C.C. de esta solución corresponden a 0 mgr. 025 de ácido úrico. Esta solución se conserva aproximadamente **dos** meses.

2) Solución de cianuro de sodio.

Cianuro de sodio	5 grs.
Agua destilada c.s.p.	100 c.c.

Esta solución dura aproximadamente **2** meses.

3) Reactivo del ácido úrico.

En un frasco de Erlenmeyer de 500 C.C., colocamos 50 grs. de tungstato de sodio, 40 C.C. de ácido fosfórico y unos 350 C.C. de agua destilada. Calentamos suavemente por espacio de **dos**

horas, usando un condensador a reflujo. Dejamos enfriar y completamos con agua destilada hasta los 500 C.C.

- 4) Solución de tungstato de sodio al **10** %.
- 5) Solución de ácido sulfúrico **2/3** N.

Técnica.

1) En un tubo. de centrifuga graduado colocamos 2 C.C. de l.c.r., 1 C.C. de la solución de tungstato de sodio y 1 C.C. de la solución de ácido sulfúrico. Dejamos en reposo durante 10 minutos, enrasamos a 10 con agua destilada y centrifugamos 10 minutos a alta velocidad.

2) En una probeta rotulada M, colocamos 5 C.C. del líquido claro sobrenadante y le añadimos 2 C.C. **5** de agua destilada.

3) En otra probeta, marcada T, colocamos 5 C.C. de la solución tipo de ácido úrico y 2 C.C. de agua destilada.

4) Añadimos a cada probeta, **2,5** C.C. de la solución de cianuro de sodio y **0,25** del reactivo de ácido úrico. Comparamos al colorímetro.

Cálculos.

$$\frac{T}{M} \times 2,5 = \text{miligrs. de ácido úrico por cien de l.c.r.}$$

Dosificación de glucosa

La dosificación de la glucosa en el l.c.r. se realiza aplicando las mismas técnicas utilizadas en la sangre. Pueden usarse métodos volumétricos de gran precisión como el **Hagedorn-Jensen** (1444) pero en la práctica las técnicas **colorimétricas** son de más fácil aplicación. Son ellas las que **describiremos**.

MÉTODO D E FOLIN-WU (1445)

Se basa en la formación de subóxido de cobre en cantidad proporcional, a la glucosa existente y en la obtención de una coloración azul frente al ácido fosfomolibdico proporcional a la cantidad de subóxido formado.

Reactivos.

- 1) Solución de tungstato de sodio al 10 %.
- 2) Solución de ácido sulfúrico **2/3** N.
- 3) Solución cuproalcalina.

Tartrato de sodio	6	grs.
Carbonato de sodio anhidro	3	grs. 50
Bicarbonato de sodio	10	grs.
Sulfato de sodio crystalizado	2	grs. 50
Agua destilada c.s.p.	500	C.C.

El tartrato, el carbonato y el bicarbonato se disuelven

juntos en frío en 300 a 350 C.C. de agua destilada; se le añade el sulfato de cobre disuelto en 50 a 60 C.C. de agua y se completa a 500 c.c.

2) Reactivo fosfosulfoacetomolibdico.

Molibdato de sodio cristalizado	40	g r s .
Acido fosfórico a 85 %	55	C.C.
Acido sulfúrico al $\frac{1}{4}$	40	C.C.
Acido acético al 99 %	20	C.C.
Agua destilada c.s.p.	500	C.C.

En un matraz de 500 C.C. disolvemos el molibdato de sodio en 100 C.C. de agua destilada y sin alterar el orden agregamos, agitando, el ácido fosfórico, luego el ácido sulfúrico y por último el ácido acético. Completamos con agua destilada hasta 500 C.C.

Para probar este reactivo se mezclan partes iguales de él y de la solución cuproalcalina y si está en condiciones de uso debe desaparecer casi completamente el color azul.

3) Solución madre de glucosa.

Glucosa pura y seca	10	grs.
Solución saturada de ácido benzoico, c.s.p.	1000	C.C.

La solución saturada de ácido benzoico se obtiene disolviendo por ebullición 3 grs. de ácido benzoico en 1 litro de agua destilada dejándola enfriar y decantando el líquido.

4) Solución tipo de glucosa.

Tomar 1 C.C. de la solución madre y llevar a 100 C.C. con solución saturada de ácido benzoico. Queda una solución que tiene 0 gr. 1 de glucosa 'por litro.

Técnica. •

1) En un tubo de centrifuga graduado colocar 1 C.C. de **l.c.r.** Agregarle **0,5** C.C. de solución de **tugnstato** de **sodio** y **0,5** de la solución de ácido sulfúrico.

Dejar en reposo 10 minutos y agregarle 3 C.C. de agua destilada, agitar y centrifugar a alta velocidad durante 10 minutos.

2) En un tubo de Folin rotulado M, colocar 2 C.C. del líquido claro sobrenadante y en otro tubo igual, rotulado T, 2 C.C. de la solución **diluída** de glucosa.

3) Agregar a cada tubo 2 C.C. de la **solución** cuproalcalina y colocar a baño maría hirviendo por 6 minutos. Enfriar.

4) Añadir a cada tubo 2 C.C. de la solución **fosfosulfoacetomolibdica**, enrasar a 25 C.C. con agua destilada y comparar al colorímetro.

Cálculo.

$$\frac{T}{M} \times 0,5 = \text{grs. de glucosa por litro.}$$

MICROMÉTODO DE FOLIN Y MALMROS ⁽¹⁴⁶⁾

Fundamento. — Está basado en la reducción del ferricianuro de potasio a ferrocianuro y en la dosificación colorimétrica del ferrocianuro **aparecido**. Agregando una sal férrica y acidificando con ácido fosfórico, obtenemos una cantidad de ferrocianuro férrico, proporcional al ferrocianuro formado. Como el ferrocianuro férrico es muy insoluble se le mantiene en suspensión coloidal protegido por un coloide, la goma arábica.

Reactivos.

1) Solución desproteinizante.

Solución de tungstato de sodio al 10 %	2 C.C.
Acido sulfúrico 2/3 N	2 C.C.
Agua destilada c.s.p.	100 C.C.

Agregar 1 gota de toluol para la conservación.

2) Solución de ferricianuro de potasio.

Ferricianuro de potasio q.p.	1 gr.
Agua destilada c.s.p.	500 C.C.

3) Solución de carbonato-cianuro.

Carbonato de sodio anhidro	8 grs.
Solución de cianuro de sodio al 1 %	150 C.C.
Agua destilada c.s.p.	500 C.C.

Se disuelve el carbonato de sodio en 100 C.C. de agua destilada, agregándole luego 150 C.C. de la solución de cianuro recién preparada y se diluye a 500 c.c. con agua destilada.

4) Solución férrica gomosa.

Goma arábica	30 grs.
Sulfato férrico	5 grs.
Acido fosfórico al 85 %	75 C.C.
Agua destilada c.s.p.	1.000 C.C.

Se coloca la goma arábica en un mortero, la pulverizamos perfectamente y añadiendo unos 30 C.C. de agua destilada fría, la trabajamos con la mano del mortero hasta obtener una suspensión homogénea. Por otra parte disolvemos el sulfato férrico en 300 C.C. de agua destilada hirviendo y le agregamos 75 C.C. de ácido fosfórico.

Al añadir el ácido la solución de sulfato férrico se decolora, quedando algunas veces ligeramente turbia.

Dejamos que la mezcla se enfríe y la agregamos agitando, a la goma del mortero. Con una pipeta le añadimos solución de permanganato de potasio N/10 hasta persistencia de una débil coloración rojiza. Completamos a 1.000 c.c. y la filtramos a través de gasas colocadas en el vástago de un embudo. Mantenemos la solución en la estufa a 37° hasta el día siguiente y obtenemos así un líquido perfectamente claro.

Mezclando 1 C.C. de la solución de ferricianuro con 1 C.C. de la solución de carbonato cianuro y 3 C.C. de la solución de sulfato férrico no debe aparecer color azul.

5) Solución de glucosa.

Glucosa pura y seca 2 grs.
Solución saturada de ácido benzoico, c.s.p. 1000 C.C.

Técnica.

1) En un tubo de centrífuga colocar **4,9** C.C. de la solución desalbuminante y le agregamos **0,1** C.C. de l.c.r. medido con pipeta a contenido, que se enjuaga varias veces con la solución. Agitamos, esperamos 5 minutos y centrifugamos.

2) En un tubo, rotulado M, colocamos 3 C.C. del líquido claro sobrenadante; en otro tubo, rotulado T, colocamos 3 C.C. de la solución tipo de glucosa.

3) Agregamos a cada tubo 1 C.C. de la solución ferricianuro y 1 C.C. de la solución de carbonato y llevamos a baño maría hirviendo durante 8 minutos. Enfriar.

4) Añadimos a cada uno de los tubos 3 C.C. de la solución férrica gomosa, apareciendo una coloración azul que se compara al **colorímetro**.

Cálculo.

$$\frac{T}{M} \times 0,5 = \text{grs. glucosa por litro.}$$

ÁCIDO LÁCTICO (TEC. DE MENDEL Y GOLDSCHIEDER ⁽¹⁴⁴⁷⁾)

Fundamento. — Las proteínas son precipitadas por el ácido metafosfórico. El filtrado es tratado por cobre que precipita los glúcidos. El ácido láctico es transformado en acetaldehído y óxido de carbono por la acción del ácido sulfúrico en caliente. Agregamos veratrol y el color desarrollado es comparado con una solución de ácido láctico tratada de igual manera.

Reactivos.

1) Solución de ácido metafosfórico al 5 %, recientemente preparada.

2) Solución de sulfato de cobre.

a) Solución saturada de sulfato de cobre

Sulfato de cobre 30 grs.
Agua destilada 100 C.C.

b) Solución a semisaturación de sulfato de cobre.

Solución sat. de sulfato de cobre . . 1 parte
Agua destilada 1 parte

3) Hidróxido de calcio.

- 4) **Acido** sulfúrico concentrado. Para poder ser utilizado no deberá dar color amarillo cuando 3 C.C. del ácido se mezclan a **0,1** C.C. de una solución de veratrol al **0,125 por** ciento.
- 5) Solución madre de lactato.
Lactato de calcio cristalizado, con 5 moléculas de **agua** de cristalización 171 mgrs.
Agua destilada **c.s.p.** 100 C.C.
- Esta solución contiene 1 miligramo de ácido láctico por **c.c.**
En caso de utilizar la sal anhidra pesar 121 miligramos.
- 6) Sol. tipo de lactato.
Sol. madre de lactato 1 C.C.
Agua destilada **c.s.p.** 100 C.C.
- 7) Sol. de veratrol al **0,28 %** en alcohol absoluto.

Técnica.

1) En un tubo de centrífuga colocamos 1 C.C. de l.c.r., 6 C.C. de agua destilada y 1 C.C. de la sol. de ácido metafosfórico. Agitamos fuertemente y dejamos en reposo por 15 minutos.

2) Centrifugamos fuertemente y 4 C.C. del líquido claro sobrenadante son llevados a otro tubo de centrífuga y adicionados de 1 C.C. de la solución de sulfato de cobre a media saturación y de 1 gramo de hidróxido de calcio. Dejamos en reposo 30 minutos, agitando durante ese tiempo varias veces la mezcla.

3) Luego de enérgica centrifugación, tomamos **0,5** del líquido claro sobrenadante y lo llevamos a un tubo perfectamente limpio y seco, rotulado M.

En otro tubo, rotulado T, colocamos **0,5** de la solución tipo de ácido **láctico**. A ambos tubos añadimos gota a gota 3 C.C. de ácido sulfúrico concentrado al tiempo que la mezcla es enfriada en agua helada.

4) Llevamos ambos tubos a baño maría hirviendo por 4 minutos exactamente, al cabo de los cuales los sumergimos en agua helada, por 2 minutos.

5) Agregamos a ambos tubos, **0,1** C.C. de la solución de veratrol, mezclamos y dejamos en reposo 30 minutos a temperatura ambiente y procedemos a la comparación **colorimétrica**.

Cálculo.

$$\frac{T}{M} \times 10 = \text{miligramos de ácido láctico por 100 C.C. de l.c.r.}$$

Compuestos cetónicos

Investigación cualitativa. Reacción de Zmbert.

Ace tona.

Reactivos.

- 1) Solución acética de nitroprusiato de sodio.

Agua destilada	50 C.C.
Acido acético glacial	50 C.C.
Nitroprusiato de sodio	5 grs.

Se disuelve el nitroprusiato de sodio en agua destilada **y** luego se le agrega el **ácido** acético.

2) Amoníaco q.p.

Técnica.

En un tubo de ensayo colocamos 2 C.C. de **l.c.r.** y 5 gotas del reactivo. Le superponemos 2 C.C. de amoníaco.

En los casos positivos aparece en el punto de contacto, un anillo violáceo, más o menos intenso, según la cantidad de acetona presente.

Colesterol

Sólo nos limitaremos a dar la técnica de su investigación cualitativa, dada la inconstancia con que se le encuentra en el **l.c.r.**, **y** mismo, cuando existe lo hace en cantidades muy pequeñas.

Utilizamos la reacción de Liebermann.

Reactivos.

1) Mezcla de alcohol éter.

Alcohol a 95°	90 C.C.
Eter sulfúrico	30 C.C.

- 2) Anhídrido acético q.p.
- 3) Acido sulfúrico. D. **1,84**.
- 4) **Cloroformo q.p.**

Técnica.

1) A 5 C.C. de **l.c.r.**, le agregamos 25 C.C. de la mezcla de alcohol éter. Agitamos enérgicamente y dejamos en reposo durante una hora.

2) Centrifugamos, decantamos el líquido sobrenadante que llevamos a una cápsula de porcelana y es evaporado al baño maría.

3) Tomamos el residuo con 1 C.C. de cloroformo, le agregamos **0,5** C.C. de anhídrido acético y **II** gotas de **ácido** sulfúrico.

En caso de que el **l.c.r.** tenga colesterol aparece una coloración verdosa.

Bilirrubina

Investigación cualitativa. .

Reactivos.

- 1) Alcohol a **95°**.
- 2) Reactivo de Erlich.
Solución A.

Acido sulfanílico	0 gr. 50
Acido clorhídrico D, 1,14	5 c.c.
Agua destilada c.s.p.	100 C.C.

Disolver primeramente el ácido sulfanílico en agua y luego agregarle el ácido clorhídrico.

Solución B.

Nitrito de sodio al **0,5 %** en agua, recientemente preparado.

En el momento del uso mezclar 10 C.C. de la solución A con **0,3 C.C.** de la solución B.

Técnica.

En un tubo de hemolisis colocar **0,5 C.C.** del reactivo y superponerle **0,5 C.C.** de **l.c.r.** En el caso que el **l.c.r.** contenga **bilirrubina** aparece un anillo rojizo.

Investigación cuantitativa.

Fundamentos. — El desalbuminado del **l.c.r.** es tratado por el diazo reactivo obteniéndose, en los casos positivos, un color rojizo que se compara con tipos especiales.

Reactivos.

- 1) Solución madre de rojo de metilo.

Rojo de metilo	0 gr. 29
Acido acético glacial	100 C.C.

Para facilitar la disolución conviene pulverizar bien el colorante.

- 2) Solución tipo de metilo.

Solución madre de rojo de metilo	1 C.C.
Acido acético glacial	5 C.C.
Acetato de sodio cristalizado	14 gr. 40
Agua destilada c.s.p.	100 C.C.

Esta solución equivale a 5 miligr. de bilirrubina por litro.

- 3) Alcohol a **95°**.

- 4) Reactivo de Erlich (ver investigación cualitativa).

Técnica.

1) Colocamos en un tubo de centrifuga 1 C.C. de **l.c.r.**, 2 c.c. de alcohol, agitamos bien y centrifugamos.

2) Tomamos 1 C.C. de líquido claro sobrenadante, y le añadimos **0,25 C.C.** del reactivo de Erlich y **0,5 C.C.** de alcohol. Aparece un color rojizo que se compara colorimétricamente con la solución tipo.

Cálculos.

$$\frac{T}{M} \times 5 \times 5 = \text{miligrs. de bilirrubina por litro.}$$

$$\frac{T}{M} \times 5 = \text{unidades Van der Bergh por litro de l.c.r.}$$

Calcio. Método de Clark y Collip (1448)

Fundamentos. — Consiste en precipitar el calcio por un oxalato alcalino, su redisolución por ácido sulfúrico y en valorar manganométricamente el oxalato precipitado en forma de oxalato de calcio y liberado por el ácido sulfúrico.

Reactivos.

- 1) Solución saturada de oxalato de amonio.

Oxalato de amonio 6 grs.
 Agua destilada c.s.p. 100 C.C.

- 2) Solución de amoníaco al 2 %.

- 3) Solución de ácido sulfúrico aproximadamente N.

Acido sulfúrico D 1,84 . . . 2 C.C. 8
 Agua destilada c.s.p. „ 100 C.C.

- 4) Solución de permanganato de potasio N/100.

Técnica.

1) Colocamos 2 C.C. de l.c.r. en un tubo de centrífuga de fondo obús, añadimos 2 C.C. de agua destilada y 1 C.C. de la solución saturada de oxalato de amonio. Agitamos y dejamos en reposo durante 2 horas.

2) Luego de ese tiempo, centrifugamos 15 minutos a 3.000 revoluciones **para** reunir todo el precipitado en el fondo del tubo. Se decanta el líquido sobrenadante, enjugando los bordes del tubo con papel de filtro.

3) Se agregan 4 C.C. de la solución de amoníaco, se agita con cuidado para no remover el precipitado y se centrifuga nuevamente durante 5 minutos. El agua amoniacal, lava el precipitado, quitándole el exceso de oxalato. Se decanta el líquido sobrenadante. Repetimos esta **operación** 2 veces más.

4) Al precipitado lavado, se le agregan 2 C.C. de la solución de ácido sulfúrico, y llevamos a baño maría a 80° hasta su completa disolución.

5) Dejamos caer gota a gota el permanganato de potasio N/100 hasta la aparición de una débil coloración rosada que **nos** indica el final de la reacción. La temperatura de la valoración es importante, y debe mantenerse entre 70 y 80° lo que se consigue introduciendo el tubo en un baño de agua caliente.

Cálculo.

Cada décima de C.C. de la solución de permanganato de potasio N/100 equivale a 1 miligr. de calcio por 100 C.C. de l.c.r.

Magnesio. Método de Denis (1449)

Fundamentos. — Luego de precipitado el calcio como oxalato, el magnesio se precipita en forma de fosfato amónico magnésiano que se dosifica como fosfato. En este método se utiliza la técnica de Youmburg modificada.

Reactivos.

- 1) Amoníaco q.p.
- 2) Solución de fosfato de amonio.

Fosfato de amonio	5 grs.
Amoníaco	0 C.C. 5
Agua destilada c.s.p.	100 C.C.

- 3) Alcohol a 75°.
- 4) Solución de oxalato de amonio saturado (ver **téc. de calcio**).
- 5) Solución de amoníaco **diluido** al tercio.

Los demás reactivos son los descriptos en la técnica de dosificación del fósforo.

Técnica.

1) En un tubo de centrífuga colocamos 2 C.C. de l.c.r., 2 C.C. de agua destilada y 1 C.C. de la solución de oxalato de amonio saturada. Agitamos y dejamos en reposo durante 2 horas. Centrifugamos 15 minutos a 3.000 revoluciones para separar el oxalato de calcio formado.

2) 3 C.C. del líquido sobrenadante se llevan a otro tubo de centrífuga al que añadimos 0,5 de la solución de fosfato de amonio y **II** gotas de amoníaco. Dejamos en reposo durante 12 horas, al cabo de este tiempo **centrifugamos** 15 minutos a 3.000 revoluciones.

3) Decantamos el líquido sobrenadante y lavamos el precipitado con 5 C.C. de amoníaco **diluido** al tercio, centrifugamos y decantamos el líquido sobrenadante. Repetimos esta operación 2 ó 3 veces.

4) Lavamos el precipitado, esta vez con 5 C.C. de alcohol a 75° que tenga 1 C.C. de amoníaco por ciento.

5) Decantamos el líquido sobrenadante y evaporamos el **amoníaco** restante, colocando el tubo en un baño de agua caliente.

6) Disolvemos el precipitado de fosfato amónico magnésiano en 0,5 de ácido sulfúrico normal y 5 C.C. de agua destilada.

7) En otro tubo **colocamos** 3 C.C. de la solución tipo de fosfato, 0,5 de la solución de ácido sulfúrico 10/N y 2 C.C. de agua destilada.

8) Agregamos a cada tubo 2 C.C. del reactivo sulfomolibdico y 1 C.C. de la solución **diluida** de cloruro estañoso, mezclamos y procedemos a la **comparación colorimétrica** a los 15 ó 20 minutos.

Cálculo.

$$\frac{T}{M} \times \frac{100}{1,2} \times 0,025 = \text{miligrs. de magnesio, por cien de l.c.r.}$$

Potasio. Método de Kramer y Tisdall (1450)

Fundamentos. — El potasio es precipitado por el cobalto-nitrito de sodio en solución neutra o débilmente alcalina, al estado de cabal-nitrito de sodio y potasio. Se hace una titulación oxidimétrica del precipitado con permanganato de potasio **N/100**.

Reactivos.

- 1) Solución de cobaltonitrito de sodio.

Esta solución debe ser preparada en el momento del uso porque se altera fácilmente. Se disuelven 150 grs. de nitrito de sodio en 150 C.C. de agua destilada caliente. dejamos enfriar a 40° y se agregan 50 grs. de nitrato de cobalto y 50 C.C. de ácido acético, al 50 %, por pequeñas porciones y agitando continuamente. Se produce un desprendimiento de vapores nitrosos, que se retiran por una intensa corriente de aire, que se hace barbotar durante 30 minutos. Dejamos en reposo 24 horas, apareciendo un precipitado. Filtramos. Al filtrado se le añaden 200 C.C. de alcohol a 96°, se produce un precipitado que se recoge sobre un Buchner y se lava 4 ó 5 veces con 25 C.C. de alcohol a 96°, cada vez, y 2 veces con 25 C.C. de éter. Se deseca al aire. En el momento del uso se disuelve 1 gr. del cobalnitrito de sodio en 5 C.C. de ácido acético al 1 %.

- 2) Solución de ácido sulfúrico al 1/5.
- 3) Solución de permanganato de potasio **N/100**.
- 4) Solución de ácido oxálico **N/100**.

Solución de ácido oxálico N/10	10 C.C.
Solución de ácido sulfúrico N/10	2 C.C.
Agua destilada c.s.p.	100 C.C.

Técnica.

- 1) En un tubo de centrifuga de fondo obús, colocamos 1 C.C. del **l.c.r.** y le agregamos lentamente 2,5 C.C. de la solución del reactivo de cobalnitrito de sodio, agitamos y mantenemos el tubo a baja temperatura durante 60 minutos.

- 2) Añadimos 2 C.C. de agua destilada, agitamos y centrifugamos durante 15 minutos a 3.000 revoluciones.

- 3) Sin mover el precipitado se lava 3 veces con 5 C.C. con agua destilada, centrifugando después de cada añadido de agua, hasta que quede completamente incoloro.

- 4) Una vez lavado, agregamos 5 C.C. de la solución de permanganato de potasio **N/100** y 1 C.C. de ácido sulfúrico al 1/5 y llevamos al baño maría hirviendo durante 2 minutos. Si el color rojo del permanganato se hiciera muy débil, se añade antes de que desaparezca totalmente, una nueva cantidad perfectamente

medida, 2 ó 3 C.C., y se vuelve a calentar durante 30 segundos.

5) Agregamos en este momento, una cantidad exactamente medida de ácido oxálico **N/100**, un poco superior a la necesaria para decolorar completamente el permanganato.

6) Se vuelve a **añadir** el permanganato de potasio **N/100**, hasta la aparición de una **coloración** rosado persistente durante 1 minuto.

Cálculo.

C.C. de la solución de permanganato de potasio **N/100** empleados menos C.C. de ácido oxálico **N/100** utilizados multiplicados por **7,1** igual miligrs. de potasio por 100 C.C. de l.c.r.

Sodio. Método de Kramer - Gitteelman (1451)

Fundamentos. — Se precipita el sodio por el **piroantimoniato** de **potasio**, formándose piroantimoniato de sodio, que es fácilmente precipitado por el alcohol. Esta reacción debe ser hecha en medio neutro o débilmente alcalino. El piroantimoniato **recogido** es **descompuesto** por el ácido clorhídrico concentrado con liberación de oxígeno, el que actuando sobre **yoduro** de **potasio** en **medio** alcalino, deja yodo en libertad en **cantidad equivalente**, que se valora por el tiosulfato de sodio.

Reactivos.

1) Solución de piroantimoniato de potasio.

Colocamos 10 grs. de piroantimoniato de potasio, exento de sodio, en un matraz de 1.000 C.C., y le agregamos 500 C.C. de agua destilada hirviendo. Hervimos durante 3 a 5 minutos, enfriamos rápidamente y se le añade 15 C.C. de solución de hidróxido de potasio al **10 %**, exento de sodio. Filtramos y colocamos el filtrado en frasco parafinado. El reactivo puede ser usado si mezclado en partes iguales con alcohol a **95°** no se produce precipitado.

2) Acido sulfúrico aproximadamente **4/N**.

Acido sulfúrico de 96 a 98 %	109 C.C.
Agua destilada c.s.p.	1000 C.C.

3) Acido nítrico concentrado D **1,40**.

4) Agua oxigenada a 100 volúmenes.

5) Solución de hidróxido de potasio al 10 %.

6) Solución de rojo de metilo.

Rojo de metilo	50 mgrs.
Alcohol a 50°	100 C.C.

7) Solución de ácido clorhídrico **N/10**.

8) Acido clorhídrico concentrado D **1,19**.

9) Alcohol a **95°**.

10) Alcohol a **30°**.

11) Solución de **yoduro** de potasio al 2 %.

- 12) Solución de tiosulfato de sodio N/10.
- 13) Solución de almidón al 1 %.

Técnica.

- 1) Colocamos 1 c.c. de l.c.r. en un tubo de destrucción, le añadimos 2 c.c. de la solución 4/N de ácido sulfúrico y 1 c.c. de ácido nítrico concentrado. Para regularizar la ebullición colocamos 2 perlas de vidrio.
 - 2) Calentamos suavemente con micromechero. Cuando se produce la evaporación del líquido, aparecen vapores nitrosos y el líquido toma una coloración pardo-oscura.
 - 3) Retiramos el mechero y agregamos con precaución 1 c.c. de ácido nítrico, calentamos nuevamente y repetimos esta operación hasta que el líquido toma una coloración pardo-clara.
 - 4) Enfiamos el contenido del tubo y añadimos cuidadosamente 0,5 c.c. de agua oxigenada a 100 volúmenes.
 - 5) Calentamos nuevamente y si el líquido no queda completamente incoloro, se hacen nuevas adiciones de agua oxigenada hasta su obtención.
 - 6) Enfiamos el tubo, apareciendo un precipitado cristalino. Añadimos 1 c.c. de agua destilada y 1 gota de rojo de metilo y procedemos a la neutralización con la solución de hidróxido de potasio.
 - 7) Se pasa el líquido a un tubo de centrifuga de 25 c.c. de capacidad. Se lava el tubo de destrucción con 1 c.c. de la solución de ácido clorhídrico N/10 y 1 c.c. de agua destilada que se pasan al tubo de centrifuga.
 - 8) Se neutraliza con hidróxido de potasio al 10 %, añadimos 5 c.c. de la solución de piroantimoniato de potasio y agua destilada hasta un volumen aproximado de 10 c.c.
 - 9) Agregamos 2,5 c.c. de alcohol a 95°, gota a gota y agitando. Dejamos en reposo durante 30 minutos, luego de lo cual procedemos a la centrifugación durante 15 minutos a 3.000 revoluciones.
 - 10) Decantamos el líquido sobrenadante y hacemos 3 lavados con 2 c.c. de alcohol al 30 %.
 - 11) Luego del último lavado, se sumerge el tubo en agua calentada a 80°, para eliminar cualquier traza de alcohol.
 - 12) Agregamos al tubo 4 c.c. de ácido clorhídrico y 2 c.c. de agua destilada, disolviéndose el precipitado.
 - 13) Se añade 2 c.c. de la solución de yoduro de potasio y se titula rápidamente con la solución de tiosulfato de sodio N/10, hasta la casi completa desaparición del color del yodo.
 - 14) Agregamos en este momento 1 c.c. de la solución de almidón y se sigue agregando solución de tiosulfato de sodio hasta que desaparezca el color azul del almidón yodurado, lo que nos indica el final de la titulación.
- Se aconseja realizar siempre una prueba en blanco.

Cálculos.

Tiosulfato de sodio N/10 empleado en la titulación menos

el empleado en la titulación en blanco multiplicado por 115 igual a miligramos de sodio en 100 c.c. de l.c.r.

Cloruros

La mayoría de los métodos de dosificación de cloruros, aún aquellos de mayor rigurosidad científica, son métodos volumétricos. En los líquidos biológicos la **gravimetría**, diafanometría y colorimetría no tienen aplicación práctica.

Los métodos volumétricos utilizados son los argentimétricos y ésta puede hacer ya en medio ácido, método de **VOLHARD** (¹⁴⁵²) y todas sus modificaciones posteriores, o en medio neutro, método de **MOHR** (¹⁴⁵³), que para el caso particular del l.c.r. tiene una buena **indicación** dado su carácter de líquido neutro.

Teniendo en cuenta el pequeño contenido proteico en l.c.r. normales, las técnicas de dosificación pueden hacerse directamente, sin destrucción ni separación de los prótidos.; pero en algunos líquidos patológicos, con alto contenido proteico, es necesario proceder a su separación, porque con contenido mayor de 2 a 3 grs. por litro altera los resultados finales.

DOS REIS (¹⁴⁵⁴) que llevó a cabo dosificaciones comparativas con líquidos desalbuminados y sin desalbuminación, encuentra los valores siguientes procediendo al estudio comparativo :

<i>Proteínas</i>	<i>totales</i>	<i>Cloruro de sodio</i> <i>grs. por litro</i> <i>L.c.r. desproteínizado</i>	<i>L.c.r. sin des-</i> <i>proteínizar</i>
	0,25	7,02	7,08
	0,50	7,02	7,02
	0,75	7,02	7,02
	1,00	7,08	7,02
	1,25	7,02	7,14
	1,50	7,02	7,08
	1,75	7,08	7,25
	2,00	7,08	7,20
	2,50	7,02	7,31
	3,00	7,02	7,61
	3,50	6,96	7,49
	4,00	7,02	7,61
	4,50	7,02	7,61
	5,00	7,02	7,66
	5,50	7,02	7,72
	6,00	7,08	8,02
	8,00	7,08	8,13
	10,00	6,96	8,42
	12,00	7,02	8,83
	14,00	7,08	9,07
	16,00	7,02	9,48
	18,00	7,02	9,89
	20,00	6,96	10,12

La eliminación de los prótidos puede hacerse **por** cualquiera de los procedimientos utilizados corrientemente en el laboratorio, ya sea la destrucción por el permanganato de potasio y ácido nítrico como en el método de LAUDAT (1455), por el ácido **tricloroacético**, método de Greenwald o por el ácido túngstico, método de FOLIN - WU (1456).

Describimos a continuación los métodos de dosificación utilizados por nosotros en la práctica.

Técnica de Volhard (1452) modificada y adaptada al l.c.r.

Método de dosificación directa sin desalbuminación.

El método es un procedimiento directo y está basado en la precipitación del cloro ión por el ión plata y la dosificación posterior del exceso de plata colocado por el ión **sulfocianuro**.

Reactivos. •

- 1) Solución de nitrato de plata N/50.
- 2) Acido nítrico q.p.
- 3) Solución de alumbre de hierro al 5 %.
- 4) Solución de sulfocianuro de amonio Nj50.

Técnica.

- 1) En un pequeño vaso de Erlenmeyer colocar 2 C.C. de l.c.r. y 15 C.C. de la solución del nitrato de plata N/10.
- 2) Agregar 1 C.C. de ácido nítrico y 1 C.C. de la solución de alumbre de hierro.
- 3) Dejar caer la solución de sulfocianuro de amonio N/50, desde una bureta, hasta que aparezca color rosado.

Cálculo. •

15 menos C.C. gastados de sulfocianuro de amonio N/50 \times 1,17 = grs. de cloruro de sodio por litro de l.c.r.

Técnica de Claudius (1457) modificada y adaptada al l.c.r.

Micrométodo con desalbuminación.

Basado en igual principio que el método anterior.

Reactivos.

- 1) Solución de nitrato de plata 0,04 N.

Nitrato de plata	6 grs. 795
Agua destilada c.s.p.	1000 C.C.
Guardar en frasco oscuro.	
- 2) Acido nítrico q.p.
- 3) Solución de nitrato férrico al 4 %, acidificada con ácido nítrico.
- 4) Solución de permanganato de potasio al 4 %.

5) Solución de sulfocianuro de potasio 0,005 N en alcohol absoluto.

Sulfocianuro de potasio . . . 105 grs.
Alcohol absoluto 1000 C.C.

Se titula con la solución de nitrato de plata 0,04 N.

6) Alcohol absoluto.

Técnica.

1) En un tubo pequeño de Pyrex colocar 0 C.C. 5 de agua destilada.

2) Con una pipeta calibrada a contenido, tomar 0 C.C. 1 de l.c.r. y lo agregamos al agua destilada, lavando varias veces la pipeta con agua destilada, que se agrega al tubo.

3) Agregar 1 C.C. de la solución de nitrato de plata 0,04 N y IV a V gotas de ácido nítrico.

4) Calentar sobre micro-mechero, sin hervir, agitando continuamente. Cuando el líquido comienza a aclarar, se lleva a la ebullición.

5) Cuando queda poca cantidad de líquido en el tubo, aproximadamente 0 C.C. 25 a 0 C.C. 5, se le agrega 1 gota de la solución de permanganato de potasio y continuamos calentando hasta la decoloración.

6) Dejamos enfriar y agregamos 5 C.C. de alcohol absoluto y 1 gota de la solución de nitrato férrico.

7) El exceso de nitrato se titula con la solución de sulfocianuro de potasio, dejando caer éste hasta color rosado persistente.

Cálculo.

8 menos C.C. gastados de sulfocianuro de potasio 0,005 N \times 2,925 = grs. de cloruro de sodio por litro de l.c.r.

Dosificación de albúminas, glucosa y cloruros con 1 C.C. de l.c.r. Método de Giannetto ⁽¹⁴⁵⁸⁾

1) En un tubo de centrifuga graduado hasta 10 C.C., se pone 1 C.C. de l.c.r., se le añaden 0,5 C.C. de tungstato de sodio al 10 % y luego 0,5 C.C. de ácido sulfúrico 2/3 normal. Esperamos 30 minutos para que la precipitación proteica sea total y completamos hasta la marca 10 con agua destilada y procedemos a una enérgica centrifugación.

2) Retiramos 2 C.C. del líquido sobrenadante, porción A, que llevamos a un tubo de Follin para la dosificación de la glucosa.

3) Volcamos el resto del contenido del tubo, 8 C.C., porción B, en un pequeño vaso de Bohemia, teniendo la precaución que escurra algún tiempo. Cuando se trata de l.c.r. normales o patológicos con contenido proteico inferior a 4 grs. por litro, el volumen del coágulo proteico no introduce un error apreciable en esa medida de 8 C.C. de la porción B; pero en l.c.r. de gran

contenido proteico, ese volumen es considerable y **para** obviar ese inconveniente procedemos de la siguiente **forma: una vez** retirada del tubo la porción A volcamos el resto en un tubo y de allí retiramos 7 C.C. que llevamos a un vaso de Bohemia. Nos queda en el tubo un depósito de proteína coagulada, porción C, que dosificaremos.

Veamos ahora la conducta a seguir con estas tres porciones:

- A) Para la dosificación de la glucosa.
- B) Para la dosificación de cloruros.
- C) Para la dosificación de proteínas.
- 4) Porción A. Glucosa.

Seguimos la técnica de dosificación de **Folin** y **Wu**, ya descrita.

5) Porción B. Cloruros.

Colocamos en un vaso de Bohemia los 8 C.C., porción B, del líquido claro sobrenadante, se le agrega 1 C.C. de ácido nítrico puro, unos C.C. de agua destilada, 10 C.C. de nitrato de plata **N/50** y 1 C.C. de la solución de alumbre de hierro ; dejamos caer sulfocianuro de potasio **Nj50** hasta débil color rosado persistente medio minuto.

Cálculo :

10 menos CC. de sulfocianuro gastados $\times 1,46 =$ grs. de cloruro de sodio por litro de **l.c.r.**

Si la porción B es sólo de 7 C.C. el modo operatorio es el mismo, pero el cálculo será:

10 menos C.C. de sulfocianuro gastados $\times 1,67 =$ grs. de cloruros por litro de **l.c.r.**

6) porción C. Proteínas.

Para la dosificación de las proteínas utilizamos el método ya descrito de **Giannetto**.

Fósforo. — Técnica de Youmburg (1459, 1460, 1461)

Fundamentos. — Consiste en la formación de un complejo de ácido fosfomolibdico y su reducción consecutiva con formación de compuestos azules de molibdeno; esta coloración es comparada con una solución tipo tratada de igual manera.

Reactivos.

- 1) Solución de ácido tricloroacético al **10 %**.
- 2) Solución madre de fosfato.

Fosfato monopotásico 0 gr. 4389
 Agua destilada **c.s.p.** 1000 C.C.

Agregar 1 gota de cloroformo para su conservación. Esta solución contiene 100 **miligr.** de fósforo por litro.

- 3) Solución tipo de fosfato.

Solución madre 5 C.C.
 Agua destilada **c.s.p.** 100 C.C.
 Esta solución contiene 5 miligr. de fósforo por litro.

4) Solución de molibdato de sodio al **7,5 %**.

5) Solución de **ácido** sulfúrico **10/N**.

Acido sulfúrico D, 1.84 1 parte
 Agua destilada 2 partes

6) Reactivo sulfo molíbdico.

Solución de molibdato de sodio al **7,5 %** 1 parte
 Acido sulfúrico **10/N** 1 parte
 Se prepara en el momento del uso.

7) Solución concentrada de cloruro estañoso.

Cloruro estañoso 10 grs.
 Acido clorhídrico 25 C.C.

8) Solución **diluída** de cloruro estañoso.

Solución concentrada 1 C.C.
 Agua destilada **c.s.p.** 200 C.C.

Técnica.

1) Colocamos en un tubo de centrífuga 2 C.C. de **l.c.r.** y agregamos 4 C.C. de agua destilada y 4 C.C. de la solución de ácido tricloroacético. Dejamos 10 minutos en reposo y centrifugamos.

2) En un tubo rotulado M, colocamos 6 C.C. del líquido claro sobrenadante y en otro tubo rotulado T, 3 C.C. de la solución tipo y 3 C.C. de agua destilada.

3) Anegamos a cada tubo 2 C.C. del reactivo **sulfomolibdico**, mezclamos bien por **agitación** y añadimos a cada uno de ellos 2 C.C. de la solución de cloruro estañoso. Dejamos en reposo 15 a 20 minutos **y** procedemos a la lectura.

Cálculos.

$$\frac{T}{M} \times 2,5 = \text{miligrs. de fósforo por cien de l.c.r}$$

Sangre

Investigación cualitativa.

REACCIÓN DE ADLER

Reactivos.

1) Solución de bencidina.

Bencidina q.p. 0 gr. 50
 Acido acético glacial 4 C.C. 33
 Agua destilada 19 C.C.

Colocamos en un vaso de Bohemiá el ácido acético y la **bencidina**, calentamos durante 8 a 10 minutos a baño maría a 50° y le agregamos finalmente el agua.

2) Agua oxigenada al 3 %.

Técnica.

En un tubo de ensayo colocamos 1,4 c.c. de la solución de bencidina, 0,2 c.c. de agua destilada, 1 c.c. de l.c.r. y finalmente 0,4 c.c. de agua oxigenada.

En los casos positivos aparece un color azul que adquiere su máxima a los 5 minutos.

Reacción del oro coloidal

Esta reacción propuesta por **LANGE** ⁽¹⁴⁶²⁾ en 1912, ha sido objeto de numerosas modificaciones con el fin ya sea de aumentar su sensibilidad o de simplificar su técnica. Entre las modificaciones más usadas debemos citar la de **BARTOLOMEW y GENT** ⁽¹⁴⁶³⁾ la de **VAND GREEN** ⁽¹⁴⁶⁴⁾, la de **BOERNER y LUKENS** ⁽¹⁴⁶⁵⁾, la de **GLASOE y SORUM** ⁽¹⁴⁶⁶⁾, la de **BOROWSKAJA** ⁽¹⁴⁶⁷⁾, la reciente técnica de **C. LANCE** ⁽¹⁴⁶⁸⁾, la de **WURTH y FARUPEL** ⁽¹⁴⁶⁹⁾, la de **GAMBINO** ⁽¹⁴⁷⁰⁾ y la de **CALCAGNO** ⁽¹⁴⁷¹⁾.

Recientemente ha sido demostrado por **GLASOE y SORUM** ⁽¹⁴⁷²⁾ la importancia que sobre el resultado de la reacción, tiene la concentración hidrogeniónica del sol de oro y el tamaño de las partículas. Experimentalmente demostraron que cuando el pH aumenta, también lo hace la sensibilidad y ésta disminuye si el tamaño de las partículas es menor.

LANGE y HARRIS ⁽¹⁴⁷³⁾ en un estudio sobre el significado del pH en la reacción del oro, ponen de manifiesto su importancia. Con la técnica de Zsigmondy, al oro formol, el pH está comprendido dentro del óptimo de la escala, pero las modificaciones de la técnica que tienden a simplificarla, es necesario el control del pH. Es de tanta importancia tener en cuenta ese factor, que es posible, como ellos lo observaron, obtener curvas falsamente paréticas usando pH muy bajo. El pH óptimo encontrado por ellos fué de 7,4.

Reacción del oro coloidal

Reactivos.

1) Agua tridestilada. Todas las soluciones deben ser hechas de esta agua. Los aparatos utilizados en la destilación no deben tener conexiones de goma y el material utilizado debe ser de vidrio Pyrex.

2) Solución de oro coloidal.

En un matraz colocamos 1.000 c.c. de agua tridestilada y calentamos lentamente utilizando un termómetro como agitador. Cuando el agua llegue a los 60° se agregan 10 c.c. de una solución de cloruro de oro al 1 %, gota a gota y agitando. Cuando la mezcla

comienza a hervir retiramos el mechero e inmediatamente agregamos 8 C.C. de una solución de carbonato de potasio al 2 %, gota a gota, agitando bien. Inmediatamente se adiciona solución de ácido tánico al 0,05 %, recientemente preparada hasta la aparición de un pequeño color rojo. Usualmente se requiere 0,4 a 0,5 C.C. Volvemos a colocar el mechero y agregamos 10 c.c. de una solución de ácido oxálico al 1 %, gota a gota y agitando. La solución toma un color rojo oscuro que por calentamiento y agitación continua se vuelve de un color más pálido. Retiramos el frasco del mechero y enfiamos inmediatamente. Ajustamos el pH, midiendo 10 C.C. de la solución anterior y colocándolo en un frasco al que se adicionan 1 a 2 gotas de una solución al 1 % de alizarina roja en alcohol a 50 %. Titulamos con ácido clorhídrico N/50 o hidróxido de sodio Nj50 hasta el punto neutro. Calculamos la cantidad de ácido o de álcali necesarios para neutralizar el resto de la solución de oro coloidal. La solución debe mostrar las siguientes características : ser absolutamente transparente, de un color rojo naranja brillante, neutra a la alizarina roja, y 5 C.C. deben ser decolorados en una hora por el agregado de 1,7 C.C. de una solución al 1 % de cloruro de sodio ; debe dar una curva **parética** típica con un l.c.r. reconocido como paralítico y no debe dar **reacción** con un l.c.r. normal.

3) Solución de cloruro de sodio al 0,4 % en agua tridestilada. Esterilizar.

4) Solución de cloruro de sodio al 1 % en agua tridestilada. Esterilizar .

Técnica.

1) En 12 tubos de ensayo colocamos en el primero 1,8 C.C. de la solución de cloruro de sodio al 0,4 %, en los 10 siguientes 1 C.C. y en el último 1,7 C.C. de la solución de cloruro de sodio al 1 %. Al tubo 1 le agregamos 0,2 C.C. de l.c.r., agitamos bien y transferimos 1 C.C. al tubo 2. Mezclamos bien y transferimos 1 C.C. al tubo 3. Procedemos de igual manera hasta que llegamos al tubo 10. Descartamos 1 C.C. de la mezcla de este tubo. Los últimos 2 tubos no tienen l.c.r. Ellos son usados como control.

2) Agregamos 5 C.C. de la solución de oro coloidal a cada tubo y mezclamos bien,

3) Procedemos a la lectura a los 30 minutos y a las 24 horas. El tubo 11 no debe mostrar cambio en el color y el tubo 12 debe estar completamente decolorado. Hemos visto ya en el capítulo correspondiente los diferentes cambios que pueden experimentar los tubos, el valor que se les asigna y la manera de expresarlo por medio de gráficas.

A propósito de la lectura de la **reacción** de Lange, debemos recordar que **JOHNSON, ANDE Y SORUM** (¹⁴⁷⁴) realizan la lectura en el fotómetro.

WARREN (¹⁴⁷⁵) irradiando l.c.r. con rayos ultravioletas antes de la realización de la prueba observa que en los casos de **parálisis** general la precipitación se acentúa en los primeros tubos. **HECHT** (¹⁴⁷⁶) comparando los resultados de la lectura a las 24 y 48 horas no ha encontrado cambios apreciables.

Reacción del oro coloidal. Nueva técnica de C. Lange (1468).**Reactivos.**

1) Sol de oro. Colocamos en un matraz de Pyrex de 2 lts. de capacidad, con cuello relativamente estrecho, 1,500 C.C. de agua recientemente bidestilada. Calentamos hasta ebullición y le añadimos en ese momento 15 C.C. de una solución de cloruro de oro al 1 % (pardo, ácido, **Merck**) en agua bidestilada. Removemos bien y añadimos 15 C.C. de una solución de citrato de sodio al 1 %, agitando nuevamente. Luego de la adición del citrato, aparece un color azul que más tarde cambia al rojo. Continuamos la ebullición exactamente durante 3 minutos después de haber aparecido el color rojo. Se vierte la solución en un frasco de Erlenmeyer de cristal Pirex y se le enfría en un recipiente grande de agua. La solución no debe ser expuesta a la luz directa del sol. El sol de oro así preparado dura aproximadamente 15 días.

2) Soluciones de goma Ghatti.

Solución madre. Agitamos lentamente en una máquina agitadora durante 5 a 10 horas, 150 grs. de goma Ghatti en 1.000 C.C. de agua destilada que contenga 0,5 % de formol. Filtramos para suprimir el residuo. De la solución madre preparamos tres soluciones de goma Ghatti.

Solución Ghatti 1.

Solución madre	50 C.C.
Agua destilada	146 C.C.
Solución de hidróxido de sodio al 10 %	3 C.C.
Formol	1 C.C.

Solución Ghatti 2.

Solución madre	10 C.C.
Fosfato tampón, pH 8,0 y concentración M/15 (Fosfato ácido de potasio M/15 , 50 C.C.)	189 C.C.
Hidróxido de sodio M/5 , 46,8 C.C.	
Agua destilada, 194 C.C.)	
Formol	1 c.c.

Solución Ghatti 3.

Solución madre	50 C.C.
Fosfato tampón, pH 8,0 y concentración M/15	50 C.C.
Agua destilada	99 C.C.
Formol	1 C.C.

3) Colores de oro patrones.

Solución oro azul. Utilizamos como azul base, 80 C.C. de la solución de oro citrato y lo mezclamos con 3 C.C. de una solución fosfato tampón de pH **5,8** y concentración **M/5** y **0,1** C.C. de una dilución de suero sanguíneo. Para la preparación de la solución tampón se mezclan 50 C.C. de fosfato ácido de potasio **M/5** y

3,7 c.c. de hidróxido sódico **M/5**. El suero sanguíneo utilizado se obtiene mezclando 20 sueros humanos inactivados que no reaccionen en la prueba de fijación del complemento para la sífilis. Se diluye la mezcla de sueros al décimo con solución fosfato tampón de pH **7,4** y luego se añaden partes iguales de glicerina, de modo que la dilución final sea equivalente a **1/20**. La solución tampón pH **7,4** y concentración **M/12** se prepara por mezcla de 50 c.c. de fosfato ácido de potasio **M/5** y 40 c.c. de hidróxido de sodio **M/5**. Se diluyen 500 c.c. de esta mezcla con 700 c.c. de agua bidestilada.

Los 80 c.c. de la solución de oro se vierten desde una probeta a un frasco de Erlenmeyer de cristal Pirex de 300 c.s. que contiene la solución fosfato tampón y la solución de suero. Se agita con suavidad exactamente durante 1 minuto y se vierte luego el oro azul dentro de un segundo frasco, que contiene 3 c.c. de la solución de goma Ghatti 1.

Rojo base. Se mezclan 60 c.c. de sol de oro y 2 c.c. de solución Ghatti 2.

Solución blanco base. Se emplea Ghatti 2.

Para la preparación de las coloraciones standard las distintas mezclas de rojo, azul y blanco base se reparten en 25 tubos según el cuadro siguiente:

Tubo N°	1	2	3	4	5	6	7	8
Rojo	4.75	4,50	4,25	4,00	3.75	3,50	3,25	3,00
Azul	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00
Blanco	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Valor colorimétrico .	5	10	15	20	25	30	35	40

Tubo N°	9	10	11	12	13	14	15	16
Rojo	2,75	2,50	2,25	2,00	1,75	1,50	1,25	1,00
Azul	2,25	2,50	2,75	3,00	3,25	3,50	3,75	4,00
Blanco	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Valor colorimétrico .	45	50	55	60	65	70	75	80

Tubo N°	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Rojo	0,75	0,50	0,25	0	0	0	0	0	0
Azul	4,25	4,50	4,75	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5
Blanco	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
Valor colorimétrico .	65	90	95	100	110	120	130	140	150

Cada tubo va marcado con su **correspondiente** valor de coloración. Los valores numéricos son teóricamente arbitrarios, pero, por poderse reproducir suficientemente, bastan para la **standardización** cuantitativa. Cuando se anota el valor de las coloraciones, los números se dividen por 10 y dan por resultado desde **0,5 hasta 15**. Cada día ha de prepararse un standard de coloración fresco. Para la comparación de los colores hallados en la

prueba con los del standard, se necesita el empleo de luz blanca o azul de poca intensidad.

Técnica.

1) Utilizamos una serie de 10 tubos, de iguales dimensiones que los de las soluciones standard. En el primer tubo colocamos 1 C.C. de la solución fosfato tampón de pH 7,4 y en los restantes 0 c.c.5. Al primer tubo se le agrega 0,1 C.C. de l.c.r. agitamos bien y pasamos 1 C.C. al tubo 2 ; luego transferimos 1 C.C. al tubo 3 y procedemos así hasta el último tubo el que desechamos 1 C.C.

2) Añadimos a todos los tubos 2 C.C. del sol de oro, agitando uniformemente.

3) Dos horas más tarde se añade 1 gota de la solución Ghatti 3 a cada tubo agitando cuidadosamente. La lectura puede realizarse inmediatamente o varias horas más tarde.

4) El valor **colorimétrico** de cada tubo de la prueba es determinado por medio de la comparación con el color standard. Vimos ya los distintos valores a tener en cuenta en esta nueva técnica propuesta por Lange en el capítulo de las reacciones coloidales en l.c.r.

REACCIÓN DEL BENJÚÍ COLOIDAL

Reactivos.

1) Solución de cloruro de sodio de 0 gr. 1 por litro.

2) Solución alcohólica de benjúí. Tomamos 10 grs. de resina de benjúí que se colocan en 100 C.C. de alcohol absoluto, se agita y se dejan en reposo por 48 horas ; pasado este tiempo se decanta o filtra, a través de papel de filtro de' poros grandes.

3) Suspensión coloidal de benjúí. Tomamos 0,3 c.c. de la solución alcohólica de benjúí y se vierten lentamente en 20 C.C. de agua destilada calentadas a 35°. Esta suspensión debe prepararse cada vez que se practica la reacción.

Técnica.

1) Utilizamos 16 tubos de hemolisis, colocando en el tubo 1, 0,75 C.C. de l.c.r.; en el tubo 2, 0,5 C.C. y en el 3, 0,5 C.C. Agregamos al tubo 1, 0,25 C.C. de la solución de cloruro de sodio y al tubo 2, 0,5 C.C. de la misma solución. Al tubo 3 agregamos 1,5 C.C. de la solución salina y agregamos a los tubos restantes 1 C.C. de dicha solución. Del contenido del tubo 3, bien agitado, tomamos 1 C.C. y lo llevamos al tubo 4 ; agitamos bien y llevamos 1 C.C. al tubo 5 y así continuamos en la misma forma, hasta el tubo 15, del cual tomamos 1 C.C. y lo desechamos. El tubo 16 actúa de testigo.

2) Agregamos a cada tubo 1 C.C. de la suspensión de benjúí coloidal, agitamos cuidadosamente y dejamos 6 horas a temperatura ambiente.

Lectura.

Se designa como 0 la reacción negativa, es decir cuando no se observa en el tubo floculación alguna. Como 1 se designa

la floculación parcial, es decir que en el fondo del tubo se observa un pequeño precipitado y el líquido que sobrenada permanece opalino, y finalmente se designa como 2 cuando la floculación es total, es decir que el benjuí ha precipitado totalmente y el líquido que sobrenada aparece límpido e incoloro.

REACCIÓN DEL MASTIC COLIDAL

Reactivos.

- 1) Solución madre de **mastic**. Disolvemos 10 grs. de resina de **mastic** en 100 C.C. de alcohol absoluto y filtramos a continuación.
- 2) Para el uso tomamos 2 C.C. de la solución madre y la mezclamos con 18 C.C. de alcohol absoluto. Mezclamos bien y la vertemos con rapidez en 80 C.C. de agua recientemente destilada.
- 3) Solución de cloruro de sodio al **1,25 %**.
- 4) Solución de carbonato potásico al **0,5 %**.
- 5) Solución alcalino-salino **obtenida** por mezcla de 99 c.c. de la solución 3 y 1 C.C. de la solución 4.

Técnica.

- 1) Utilizamos **6** tubos de hemolisis colocando en el tubo 1, **1,5** C.C. de la solución alcalino-salino y 1 C.C. en cada uno de los tubos restantes.
- 2) Añadimos al tubo 1, **0,5** C.C. de **l.c.r.** mezclamos bien y pasamos 1 C.C. al tubo 2.
- 3) Transferimos 1 C.C. del segundo al tercer tubo y así sucesivamente hasta el tubo 5, del cual se descarta 1 C.C. El tubo 6 es utilizado como testigo.
- 4) A cada tubo añadimos 1 C.C. del reactivo de **mastic**, mezclamos bien y dejamos en reposo a temperatura ambiente durante **12 a,24** horas, o bien se deja en la estufa durante 6 a 12 horas.

Los tubos en que la reacción es positiva están indicados por la formación de un precipitado que se deposita dejando claro el líquido que sobrenada.

REACCIÓN DE TAHSTA-ARA (147)

Reactivos.

- 1) Solución de cloruro de sodio al **0,3 %**.
- 2) Solución de carbonato de sodio anhidro al **10 %**.
- 3) Reactivo de Takata-Ara que se obtiene por la mezcla en partes iguales de las siguientes soluciones:
 - a) **Solución** de bicloruro de mercurio al **0,5 %**.
 - b) Solución de **Fuchsina** básica al **0,02 %**, recientemente preparada.

Técnica.

- 1) En 4 tubos de hemolisis colocamos 1 c.c. de la solución de cloruro de sodio y a los tubos 1 y 2, 1 C.C. de **l.c.r.**

2) Agitamos bien el tubo 2 y pasamos 1 C.C. al tubo 3 ; mezclamos bien éste y pasamos 1 C.C. al tubo 4; agitamos bien éste y desechamos 1 C.C.

3) Añadimos a cada tubo una gota de la solución de carbonato de sodio y **0,3** C.C. del reactivo de Takata, agitamos, dejamos a temperatura ambiente, y procedemos a la lectura inmediatamente, a los 5, 15, 60 y 90 minutos. Los resultados se expresan por +++ si la precipitación ocurre inmediatamente, como +- si aparece entre 5 y 30 minutos como + si aparece opalinidad a los 30 minutos. La reacción se considera negativa si la mezcla queda clara o cuando hay ligera opalinidad luego de 30 minutos.

REACCIÓN DE TAKATA-ARA EN UN SOLO TUBO. TÉCNICA DE UCKO

Reactivos.

- 1) Solución de carbonato de sodio al 10 %.
- 2) Solución de bicloruro de mercurio al **0,5** %.

Técnica.

1) En un tubo de hemolisis colocamos 1 C.C. de **l.c.r.** y le agregamos una gota de la solución de carbonato de sodio y **0,1** C.C. de la solución de bicloruro de mercurio.

Se procede a la lectura de igual manera que en la técnica anterior.

REACCIÓN DE LA TINTA CHINA

Tec. de Schube y Harms (1478).

Reactivos.

- 1) Solución al **0,1** % de ácido oxálico.
- 2) Suspensión coloidal de carbón al 1 %.

Tinta china	1 c.c.
Agua destilada c.s.p.	100 C.C.

Técnica.

1) En cuatro tubos de hemolisis colocamos 1 C.C. de agua destilada.

2) Agregamos al tubo 1, 1 C.C. de **l.c.r.** y agitando bien pasamos 1 C.C. al tubo 2 y así sucesivamente hasta el tubo 4 en que un C.C. de la mezcla es descartado.

3) Añadimos a cada tubo **0,1** C.C. de la solución de ácido oxálico y **0,4** C.C. de la suspensión de carbón. Agitamos bien los tubos y dejamos en reposo 12 horas.

La prueba se considera positiva, si hay completa floculación y el líquido sobrenadante es claro. Si eso ocurre en cualquiera de los tubos la reacción se considera positiva.

ALCOHOL

Investigación cualitativa.

Destilamos **l.c.r.**, tomamos 1 C.C. del destilado y le agregamos una gota de solución de bicromato de potasio al 1 % y una gota de ácido sulfúrico concentrado y calentamos suavemente. En los casos de **l.c.r.** con alcohol se obtiene una coloración verde por formación de sulfato de cromo.

Investigación cuantitativa.

Fundamentos. — El alcohol es oxidado a ácido acético por la acción de una mezcla de dicromato de potasio y ácido sulfúrico. El exceso de dicromato de la muestra, es estimado por la transformación del **yoduro** de potasio en yodo, y titulación del yodo liberado con tiosulfato de sodio.

Reactivos.

1) **Solución** de dicromato de potasio **0,1736 N.**

Disolvemos 8 grs. 521 de dicromato de potasio, previamente pulverizado y secado a **150°**, en un litro de agua.

1 C.C. de la solución es capaz de oxidar 2 C.C. de alcohol a ácido acético.

2) **Solución** de tiosulfato de sodio, **0,02/N.**

Disolvemos 10 grs. de tiosulfato de sodio cristalizado (5 moléculas de agua) en agua destilada recientemente hervida y enfriada. Diluimos a **2.000** C.C., guardando la solución en frasco cerrado, para evitar la absorción del anhídrido carbónico. Se titula con sol. de lodo 0.02 N.

3) **Solución** de almidón.

Disolver **0,50** de almidón en 250 C.C. de agua destilada estéril. Es conveniente prepararla fresca. Usamos en cada **determinación** de 2 a 5 C.C.

4) **Solución** saturada de ácido **pírico**. Prácticamente se saturan 14 grs. por litro.

5) **Yoduro** de potasio, en cristales.

6) **Acido** sulfúrico concentrado.

Técnica.

1) Colocamos **10 c.c.** de **l.c.r.** en un matraz de Kjeldahl de 300 C.C. de capacidad y con cuello largo. Agregamos **10** C.C. de la solución saturada de ácido pírico y conectamos el frasco al aparato de destilación. El vapor del agua destilada, **pas**a lentamente al frasco conteniendo el **l.c.r.** La mezcla tiene **tendencia** a formar espuma durante los primeros minutos, por lo que es necesario trabajar con llama baja del mechero.

2) Recogemos el destilado en un tubo de 175 X 22 milímetros, en el que hemos colocado 5 C.C. de la solución de **dicromato** de potasio y 5 C.C. de ácido sulfúrico concentrado. El tubo es enfriado colocándolo **en** agua fría. Disponer el tubo del aparato de destilación de manera que el destilado caiga por las paredes del tubo y se disponga en capa sobre la mezcla del ácido **crómico**.

3) La destilación se continúa hasta recoger aproximadamente 12 C.C. del destilado, lo que requiere 15 a 30 minutos. Retiramos el tubo en ese momento y suspendemos la destilación.

4) El tubo presenta dos capas, una incolora del destilado y otra coloreada en naranja por el ácido crómico. Mezclamos cuidadosamente por rotación, y dejamos la mezcla a temperatura ambiente durante 25 minutos.

5) Llevamos el tubo a baño maría hirviendo por 15 minutos y luego de ese tiempo enfriamos. En este momento se produce la oxidación del alcohol. El contenido del tubo presenta un color verdoso azulado, lo que nos indica un exceso de ácido crómico.

6) Transferimos el contenido del tubo a un Erlenmeyer de 500 C.C. enjuagando varias veces el tubo con agua destilada, que se lleva también al frasco de Erlenmeyer.

7) Agregar 200 C.C. de agua destilada y 1 ó 2 grs. de yoduro de potasio.

8) Titulamos el yodo puesto en libertad, por el agregado de tiosulfato de sodio 0,02 N, hasta que el líquido presente un color amarillo pálido.

9) En este momento, adicionamos 2 c.c. de la solución de almidón y continuamos agregando tiosulfato hasta que el color azul haya desaparecido.

Cálculos.

Experimentalmente se ha demostrado que cada C.C. de la solución de tiosulfato de sodio 0,02 N equivale a 0 miligr. 2302; de alcohol etílico.

B R O M O

Método de Walter.

Fundamentos. — El l.c.r. desalbuminado es tratado por una solución de cloruro de oro, dando una coloración que es comparada con una solución tipo de bromuro de potasio.

Reactivos.

1) Líquido desalbuminante.

Acido tricloroacético	10 grs.
Acido fosfotúngstico	5 grs.
Agua destilada c.s.p.	100 C.C.

2) Solución de cloruro de oro.

Cloruro de oro	0 gr. 25
Agua destilada c.s.p.	100 C.C.

3) Soluciones tipo de bromuro de potasio.

- a) 1 gr. en 200 C.C. de agua destilada.
- b) Dilución al medio de la solución a).
- c) Dilución al cuarto de la solución a).

Técnica.

1) En un tubo de centrífuga colocamos 3 C.C. de **l.c.r.** y le añadimos **0,3** C.C. del líquido desalbuminante, agitamos y dejamos en reposo 10 minutos y procedemos a la centrifugación.

2) Colocamos en un tubo 2 C.C. del líquido sobrenadante, y en otros tres tubos, 2 C.C. de cada dilución de la solución de bromuro de potasio.

3) Agregamos a cada tubo **0,44** C.C. del reactivo áurico.

4) Dejamos en reposo 5 minutos y procedemos a la comparación **colorimétrica**.

Cálculo.

Usando el tipo a) :

$$\frac{T}{M} \times 0,5 = \text{miligrs. de bromuro de sodio } \%$$

Usando el tipo b) :

$$\frac{T}{M} \times 0,5 = \text{miligrs. de bromuro de sodio } \%$$

Usando el tipo c) :

$$\frac{T}{M} \times 0,125 = \text{miligrms. de bromuro de sodio } \%$$

BISMUTO**Investigación cualitativa.****Reacción. de planas.**

Tomamos 1 C.C. de **l.c.r.** y le agregamos una gota de ácido nítrico, **0,5** C.C. de glicerina, una gota en solución de **yoduro** de potasio al 5 % y **cinco** gotas de ácido clorhídrico.

En los casos positivos aparece un color amarillo por la formación de triyoduro de bismuto.

CLOROFORMO**Investigación cualitativa.**

Hervimos algunos C.C. de **l.c.r.** con algunos C.C. de solución de alcoholato de potasio y una pequeña porción de naftol. En los casos positivos aparece una coloración azul que por acción del ácido clorhídrico pasa al rojo.

SULFAMIDADOS. TÉCNICA DE SÁNCHEZ (170)

El método está basado en la reacción cromática que produce el p-dimetilaminobenzaldehído al condensarse con el **amino** grupo de la sulfanilamida que se **traduce** en una coloración amarillo oro.

Reactivos.

1) Disolvemos 0 **gr.20** de p-dimetilaminobenzaldehido en 10 C.C. de alcohol a **70°**, favoreciendo la disolución por calentamiento en baño maría ; llevamos a un volumen de 40 C.C. **con** agua destilada y acidulamos con 20 gotas de ácido acético glacial. Agitamos y dejamos en reposo durante 2 horas y filtramos. A cada 10 C.C. del filtrado agregamos cuatro gotas de ácido sulfúrico al 50 % en volumen y llevamos a 20 C.C. con agua destilada.

2) **Preparación** de la escala.

Necesitamos una solución al **1/10 .000** de la sulfanilamida tipo y una serie de 11 tubos de colorimetría de 10 a 11 mm. de diámetro y 10 cms. de altura, iguales e igualmente calibrados, de vidrio perfectamente incoloros y numerados del 1 al 11.

Colocamos en cada uno, respectivamente, mediante pipeta de 1 C.C. dividida al centésimo: **0,05 C.C.**; **0,075 C.C.**; **0,1 C.C.**; **0,15 C.C.** y **0,5** de la **solución** tipo de sulfanilamida al **1/10.000**, lo cual equivale a concentraciones de sulfanilamida de: **0,000005 grs.**; **0,0000075 grs.**; **0,00001 gr.**; **0,0000 15 grs.** y **0,00005 grs.** Completamos el volumen hasta 1 C.C. con agua destilada y vertimos luego 1 C.C. del reactivo **p-dimetilaminobenzaldehídico** en cada uno de los tubos y agitamos.

3) Solución ácido tricloroacético al 10 % .

Técnica.

1) En un tubo de centrífuga colocamos 2 C.C. de **l.c.r.** y 2 C.C. de la solución de ácido tricloroacético. Agitamos, y dejamos en reposo durante **30** minutos procediendo luego a una enérgica centrifugación.

2) Medimos 1 C.C. del líquido claro sobrenadante que se coloca en un tubo de colorimetría en el cual previamente habíamos colocado 1 C.C. del reactivo, agitamos y comparamos la intensidad de la coloración **obtenida** con la de los tubos de la escala.

Debe tenerse en cuenta para el cálculo, que 1 C.C. del líquido utilizado, corresponde a **0,5 C.C.** de **l.c.r.**

Cuando se dosifique cualquier otro derivado sulfamidado se puede utilizar la escala de sulfanilamida y los resultados **obtenidos** se multiplican por un quebrado que tiene como numerador el peso del compuesto que deseamos investigar y como denominador el peso molecular de la sulfanilamida.

Los pesos moleculares de los compuestos sulfamidados más frecuentemente utilizados son los siguientes :

Sulfanilamida	172
Sulfapiridina	249
Sulfatiazol	255
Sulfaguanidina	214
Sulfadiazina	250
Sulfametazina	278
Sulfamerazina	264

EXAMEN CITOLÓGICO

Su estudio comprende por una parte, la determinación de los glóbulos blancos por milímetro cúbico, examen cuantitativo, por otro, el porcentaje de las diferentes especies celulares, examen cualitativo.

Examen cuantitativo.

Numeración de glóbulos blancos. — El examen debe ser hecho en lo posible, inmediatamente después de la extracción, para evitar si el líquido coagula, que los elementos sean englobados en el coágulo y aprovechando que las células se encuentran en perfecta suspensión en el líquido.

La coagulación del l.c.r. puede evitarse colocando en uno de los tubos en que se recoge el líquido, una gota de heparina o de oxalato de potasio al 15 por ciento.

En líquidos con discreto aumento celular, la numeración puede realizarse sin alteraciones marcadas hasta las 24 ó 48 horas de la extracción. En cambio, en líquidos purulentos, la desintegración es rápida, por lo que conviene realizar el examen lo más pronto posible. Es utilizado en nuestro medio, cuando el examen debe diferirse, agregar, como aconseja Bonaba, una gota de ácido acético glacial por cada 5 c.c. de l.c.r. o bien llevar el l.c.r. a la heladera.

Para facilitar la observación de los elementos blancos, se aconseja utilizar diferentes colorantes.

Técnica. — Líquido colorante.

Se han aconsejado diferentes líquidos, nosotros hemos utilizado con buenos resultados cualquiera de los siguientes:

- a) Cristal violeta 0 gr. 20.
 Acido acético glacial 5 c.c.
 Agua destilada **c.s.p.**, 100 c.c.
 Filtrar.
- b) Azul de metileno 1 gr.
 Carbonato de potasio, 1 gr.
 Agua destilada **c.s.p.**, 100 c.c.

Calentamos a 60° durante 10 minutos, enfriar y agregar un cristal de timol para su conservación. Esta solución es preferible a la anterior, porque al no hemolizar los glóbulos rojos permite tener una idea de la riqueza en ella.

Material a utilizar.

- a) Pipetas para numeración de glóbulos blancos.
 - b) Cámaras cuenta glóbulos. Pueden utilizarse cualquiera de las que describimos a continuación:
- 1) Cámara de **Fuchs** Rosenthal:
 Esta presenta un retículo de 4 milímetros de lado, dividido en 16 cuadrados grandes de doble contorno y éstos a su vez, en 16 pequeños cuadrados de contorno sencillo. Cada cuadrado

grande corresponde a 1 milímetro cuadrado. La profundidad de la cámara es de 0,2 milímetros, siendo por consiguiente su capacidad de 3,2 milímetros cúbicos.

2) Cámara de Naggeotte:

La cuadrícula mide 10 mm. de lado, dividida por 40 rayas paralelas, separadas 0 miligr. 25. La profundidad de la cámara es de 1 mm. Su capacidad total es de 100 mm. cúbicos.

Cada rectángulo presenta un largo de 10 mm., un ancho de 0 mm. 25 y una altura de 1 mm., siendo el volumen de cada uno de ellos de 1 mm. 25.

3) Cámara de Neubauer.

Técnica.

1) Tomamos con la pipeta líquido diluyente hasta la marca I.

2) Aspiramos el l.c.r. hasta la marca II.

El tubo donde está el l.c.r. debe ser perfectamente agitado, a fin de obtener una suspensión perfecta de los elementos figurados. Lange aconseja no tomar directamente el líquido del tubo en que ha sido **recogido**, sino que previa agitación, debe ser transferido a un vidrio de reloj.

3) Agitamos bien la pipeta por algunos minutos, desechamos las dos o tres primeros gotas y procedemos a cargar la cámara.

4) Realizamos la numeración de los glóbulos blancos, observando con objetivo débil y ocular fuerte.

a) Si utilizamos la cámara de Naggeotte contamos los elementos de 8 rectángulos. Para el cálculo procedemos de la siguiente forma :

$$\frac{\text{Elementos contados}}{10} = \text{glóbulos blancos por mm. cúbico.}$$

El error cometido por la adición del líquido colorante, es despreciable.

b) Si empleamos la cámara de Fuchs-Rosenthal, contamos todos los elementos contenidos en el retículo.

$$\frac{\text{Elementos contados}}{3,2} = \text{glóbulos blancos por mm. cúbico.}$$

3) En casos de grandes aumentos celulares es aconsejable utilizar la cámara de **Neubauer**. Contamos los elementos blancos de todo el retículo.

$$\frac{\text{Células contadas} \times 10}{9} = \text{glóbulos blancos por mm. cúbico.}$$

Cuando exista una pleocitosis muy marcada, como suele verse en las meningitis, la cámara aparece llena de glóbulos. La numeración en estos casos, puede facilitarse contando los **elementos** en el cuadrículado central. Para ello contamos los elementos contenidos en 10 de los cuadrados centrales, que están a su vez divididos en 16 pequeños cuadrados.

Células contadas $\times 400 \times 10$
 $\frac{\quad}{160} =$ glóbulos blancos por mm. cúbico.

Numeración de glóbulos rojos. — Muchos autores aconsejan no utilizar los líquidos con sangre **macroscópica**. Sin embargo, tiene importancia conocer su número en caso de hemorragias **patológicas**, para seguir la evolución de la enfermedad. No puede darse una técnica general de laboratorio, pues la dilución a hacerse del **l.c.r.**, varía con el número de glóbulos rojos. La numeración se hace siguiendo las técnicas hematológicas generales.

Clasificación celular. — Cuando el número de elementos es pequeño, es posible hacer en la propia cámara el recuento diferencial de los distintos elementos blancos. Si hay un aumento grande procedemos de la manera siguiente:

1) Centrifugamos fuertemente la muestra de **l.c.r.** recién tomada extraída durante 15 a 20 minutos.

2) Decantamos el líquido sobrenadante, que puede ser utilizado para exámenes químicos o serológicos.

3) Con el sedimento realizamos frotis procediendo de igual manera que como se **hace** corrientemente con la sangre. No es aconsejable hacer frotis con el ansa de platino pues los elementos se deforman. Es recomendado por algunos autores, mezclar 1 gota de suero, con el sedimento, agitar bien para obtener una repartición uniforme de los elementos y realizar luego el frotis.

4) Dejamos secar el frotis en la estufa a **37°**.

5) Procedemos a la coloración utilizando el método de May Grunwald Giensa.

a) Cubrimos la lámina con el colorante de May Grunwald durante 3 minutos.

b) Agregamos igual número de **gotas** de **agua** destilada, tiempo de coloración, y dejamos actuar por un minuto.

c) Lavamos con agua destilada y coloreamos durante 7 minutos con una mezcla de media gota de colorante de Giensa por cada C.C. de agua destilada.

d) Lavar con agua destilada.

e) Observar al microscopio.

Método de coloración de Griffith - Roberts y Yeffers ⁽¹⁴⁸⁰⁾, para la diferenciación entre hemorragias viejas y recientes

Reactivos.

- 1) Solución saturada de Sudam III en alcohol al 50 %.
- 2) Glicerina q.p.

Técnica.

- 1) Hacemos un frotis con el líquido sanguinolento.
- 2) Dejamos secar al aire, lo que lleva de 15 a 30 minutos.
- 3) Sumergimos la lámina por 30 minutos en la solución de Sudam III.

- 4) Lavamos varias veces con agua destilada.
 - 5) Secamos con papel de filtro (jamás secar al aire).
 - 6) Cubrimos con glicerina, y colocamos un cubre-objeto.
- Los glóbulos rojos de la sangre fresca aparecen coloreados en amarillo homogéneo, en tanto que los de hemorragias viejas tienen su centro borroso, lo que les da apariencia de anillo.

Examen de líquidos sanguinolentos

Los líquidos contaminados con sangre, pueden ser utilizados, según diferentes autores, empleando ciertas fórmulas, que nos permitirían conocer la composición del l.c.r. antes de la mezcla con sangre.

El líquido debe ser recogido en tubo seco para evitar la hemólisis y en él se determinan los glóbulos rojos y blancos siguiendo las técnicas descritas, y se determina además su contenido en proteínas en el líquido sobrenadante luego de centrifugación.

Por otra parte se numeran los glóbulos rojos y blancos de la sangre periférica y se determinan los valores en proteínas del suero y el valor del hematocrito.

Las fórmulas que expresamos a continuación se deben a Salomon (1481) :

Cálculo de los glóbulos blancos. — Veamos los valores a tener en cuenta:

GRp. glóbulos rojos en la sangre periférica por mm. cúbico.

GBp. glóbulos blancos periféricos por mm. cúbico.

GR l.c.r. glóbulos rojos contenidos en el l.c.r. por mm. cúbico.

GB l.c.r. glóbulos blancos contenidos en el l.c.r. por mm. cúbico.

GB glóbulos blancos por mm. cúbico originales del l.c.r.

Los glóbulos blancos del l.c.r. original están dados por la fórmula :

$$GB = GB \text{ l.c.r. } \frac{GBp}{GRp} \times GR \text{ l.c.r.}$$

Cálculo de las proteínas.

GR l.c.r. glóbulos rojos en el l.c.r. por cm^3 .

GRp. glóbulos rojos de la sangre periférica por mm. cúbico.

PS. proteínas del suero en gramos %.

H valor del hematocrito en la sangre.

P l.c.r. proteínas del l.c.r. luego de centrifugación.

P proteínas originales del líquido.

Como regla general PS puede tomarse como '7 %, H como 43, y **GRp.** 5.100.000.

La fórmula propuesta por Salomon es la siguiente:

$$P = Plc.r. \frac{GR \text{ l.c.r.}}{GRp} \times PI \times (1 - 4)$$

Con la media de los valores dados más arriba queda reducida a la fórmula siguiente:

$P = \text{Pl.c.r.} - 0,0008 \text{ GR l.c.r.}$ que nos da los valores en proteínas del líquido original.

Como regla general, **para obtener** una aproximación procedemos así: para obtener los glóbulos blancos originales del l.c.r. sustraemos 1 GB por cada 500 GR: para obtener las proteínas originales del l.c.r. sustraemos 5 miligr. % por cada 5.000 glóbulos rojos o bien 1 miligr. cada 1.000 glóbulos rojos.

Examen de líquidos turbios o purulentos

Técnica.

Los tubos donde se recoge el líquido deben ser enviados inmediatamente al laboratorio.

1) Procedemos a la desalbuminación para la determinación de la glucosa, pues en las meningitis, la glucosa disminuye rápidamente.

2) Agitamos el tubo enérgicamente y realizamos la numeración de los glóbulos blancos. Debe procederse rápidamente pues la **formación** del coágulo hace imposible la cuenta exacta de los elementos. Es conveniente, para evitar este hecho, recoger el líquido en un tubo con heparina u oxalato de potasio..

3) Si el líquido es purulento, hacemos el frotis **con** líquido sin centrifugar y realizamos coloraciones May Grunwald - Giensa y Gram para la clasificación de los elementos blancos y el estudio bacteriológico directo.

4) Para la determinación de albúmina y cloruros, conviene centrifugar el líquido, y en el líquido sobrenadante hacer las determinaciones.

5) Procedemos de igual manera para la reacción de **Was-**sermann y la reacción de Lange.

REACCIONES DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO PARA LA SÍFILIS

Técnica de Kolmer (1482).

Material a utilizar.

1) Pipetas.

- a) De 1 C.C. graduadas a 0,01 C.C. hasta la punta.
- b) De 5 C.C. graduadas a 0,1 C.C.
- c) De 10 C.C. graduadas a 0,1 C.C.

2) Tubo de ensayo.

Tubos de vidrio de 85 × 13 mm. (diámetro interior) con fondo redondo y sin reborde en la boca del tubo.

3) **Probetas** de tapón de vidrio.

De 50 y 100 C.C.

4) **Soportes** para tubos de metal y provistos de 12 hileras de 3 orificios cada uno.

5) Baño maría de 8 C.C. de profundidad, de temperatura graduable a 55° y 37°.

6) **Heladera.**

Limpieza del material. — El material de vidrio debe ser preferentemente de vidrio químicamente puro y de ser posible, estéril. Los tubos y probetas deben ser lavados con agua corriente y jabón, luego enjuagados varias veces en agua corriente y dejados escurrir boca abajo y luego secados a aproximadamente 150° a calor seco.

Las pipetas se lavan también con agua corriente, y se esterilizan al horno. Si la cristalería estuviera sucia, se le sumerge en mezcla sulfocrómica por 48 horas, lavándola luego con agua corriente varias veces. Luego de lo cual, se esterilizan a 150°.

Preparación del suero fisiológico. — Se prepara una solución de 8,50 grs. por litro, de cloruro de sodio químicamente puro y bien seco. La solución se esteriliza. Si va a utilizarse inmediatamente, puede prescindirse de la esterilización.

Prueba de la solución salina. — La solución no debe ser ni hemolítica ni tener poder antihemolítico por sí misma. Para esta investigación procedemos de la manera siguiente :

Investigación del poder hemolítico. — 1) A 5 C.C. de la solución salina colocada en tubo de hemolisis se le agregan I ó II gotas de glóbulos rojos lavados, y se colocan a baño maría a 37° por una hora. Ni la menor traza de hemolisis debe aparecer, para que la solución pueda ser utilizada.

Preparación de los glóbulos rojos de carnero. — Se obtiene la sangre por punción yugular en el carnero. Se recogen en un frasco de vidrio, con perlas de vidrio, 10 C.C. de sangre, agitando inmediatamente por unos minutos para desfibrinar, y luego se pasa por una gasa, para retener los pequeños coágulos formados. La sangre es recogida en un tubo de centrifuga graduado, agregándole 2 ó 3 veces su volumen de suero fisiológico. Centrifugamos para separar los glóbulos rojos, y *eliminamos el liquido sobrenadante. Añadimos nuevamente a los glóbulos 2 ó 3 veces su volumen de solución salina, agitamos por inversión del tubo, y centrifugamos nuevamente. Volvemos a repetir el lavado con la solución salina. El liquido sobrenadante, debe permanecer incoloro. Si así no fuera, es conveniente utilizar otros glóbulos rojos, pues un nuevo lavado con suero fisiológico hace que ellos queden demasiado frágiles. Luego de decantado el suero fisiológico del último lavado, preparamos con la papilla globular una suspensión al 2 % en solución salina. En el momento del uso, agitamos la suspensión para asegurar una perfecta repartición de los glóbulos.

Si la sangre debe ser guardada 'por varios días, la recogemos en un frasco bien limpio, de capacidad del litro, y en el que hemos colocado para cada litro de sangre una mezcla de 30 C.C. de la solución de citrato de sodio al 2 % y 2 C.C. de formol. Mezclamos bien la sangre con la mezcla y la guardamos en la heladera. Esta sangre puede utilizarse durante 2 semanas.

Preparación de la hemolisina anticarnero. — Extraemos sangre de carnero, y luego de lavar bien los glóbulos como describimos más, arriba, preparamos una suspensión al 10 % en suero fisiológico. Inyectamos a uno 0 más conejos, con 5 c.c. por vía intravenosa, repitiendo esa operación 5 ó 6 veces, con intervalos de 5 días. Para el estudio de la actividad hemolítica anticarnero, sacamos a los 8 días de la última inyección una pequeña cantidad de sangre a los conejos y titulamos su poder hemolítico. Si esa titulación da una unidad en 0,5 C.C. de la dilución a 1/4.000 ó a una dilución mayor, sangramos el animal y separamos el suero. Se diluye este suero al medio con glicerol, y se conserva en la heladera en frasco de vidrio de 50 C.C. de capacidad.

Preparación del complemento. — Obtenemos el complemento por punción cardíaca de 3 cobayos, de un peso de 500 a 800 grs., en ayunas desde hace 12 horas. Extraemos de cada cobayo 5 a 10 cc. de sangre. Los cobayos en ayunas tienen un tenor en complemento menor que los alimentados, pero en estos últimos el complemento es más lábil, por lo que se prefiere el complemento de animales en ayunas. Las cobayas embarazadas tampoco deben utilizarse pues tienen un bajo tenor en complemento. La sangre extraída como hemos descrito, se lleva a la estufa a 37° durante 1 hora, desprendemos el coágulo con una varilla de la pared del tubo y separamos el suero por centrifugación. El suero debe ser claro y transparente. Puede obtenerse una mayor cantidad de complemento, sangrando totalmente a los animales.

Método de conservación del complemento. — Agregamos 0,3 grs. de cloruro de sodio por cada C.C. de suero. Guardamos este en frasco oscuro cerca del punto de congelación. El complemento así tratado dura varias semanas.

Método del acetato de sodio. (Rhami). — Añadimos 0 gr. 1 de acetato de sodio por cada c.c. del complemento. Se obtiene igual duración que con el método anterior.

Método de Somnenschein. — Mezclamos el suero en partes iguales con la solución de Somnenschein que tiene la siguiente constitución :

Acetato de sodio, 12 grs.

Acido bórico, 4 grs.

Agua destilada estéril, 100 c.c.

Método de liofilización. — Es el mejor método de conservación y consiste en realizar la evaporación del suero en el vacío. Mantenido a una temperatura de 8° a 10° conserva su actividad

por 1 año. Adicionándole 5 C.C. de agua destilada, el material se disuelve y puede ser empleado del mismo modo que el suero fresco.

Preparación del antígeno.

Se utiliza un extracto alcohólico, colesteroado y lecitinado de músculos cardíacos.

1) En un frasco de Erlenmeyer colocamos 30 grs. de polvo de corazón (**Difco**) y 100 C.C. de acetona q.p. Tapamos bien el frasco y dejamos 5 días a temperatura ambiente, agitando ligeramente 4 veces al día.

2) Se filtra por papel o bien se decanta. El filtrado se desecha.

3) Extendemos la sustancia que queda en el filtro sobre una lámina de vidrio y dejamos a temperatura ambiente hasta que el polvo esté bien seco. En ese momento lo llevamos a un frasco de Erlenmeyer al que agregamos 100 C.C. de alcohol absoluto. Tapamos el frasco y lo dejamos 5 días a temperatura ambiente, agitando ligeramente varias veces al día.

4) Filtramos por papel de filtro, haciendo al terminar la filtración una ligera presión sobre el residuo.

5) Medimos el filtrado y completamos a 100 C.C. con alcohol etílico absoluto. Añadimos 0 gr. 2 de colesterol disueltos en 10 CC. de éter. Agitamos enérgicamente el frasco y lo llevamos a baño maría a 55° por espacio de 1 hora para facilitar la disolución. Dejamos luego en reposo por 2 ó 3 días, agitando varias veces al día. Filtramos a través de papel de filtro.

6) El antígeno, así preparado, se conserva a temperatura ambiente en frasco bien tapado.

Preparación del l.c.r. — Se usa sin ningún tratamiento previo, pues no tiene suficiente cantidad de hemolisina anticarnero, que indique su eliminación, ni el suficiente complemento para realizar su inactivación. Si el líquido está contaminado con sangre es necesario someterlo a la **centrifugación**. Si el líquido tiene más de 3 días de extraído, se le calienta a 55°, durante 15 minutos, con el fin de eliminar las sustancias anticomplementarias. A igual tratamiento se someten los líquidos turbios.

Titulación de la hemolisina. — Se prepara una dilución de hemolisina al 1 % de la siguiente manera:

Hemolisina glicerizada al 50 %	2 C.C.
Suero fisiológico estéril al 8,5 por litro	94 C.C.
Fenol al 5 %, en suero fisiológico	4 C.C.

Esta solución en la heladera se conserva varias semanas. Diluimos la hemolisina a 1/1.000 (0,5 de la solución al 1/100 más 4,5 C.C. de suero fisiológico). En una serie de 10 tubos preparamos las siguientes diluciones de la hemolisina:

Tubos	Cantidad de hemolisina	Suero fisiológico	Dilución final
1	0,5 de la diluc. 1/1.000	0 C.C. 0	1/1.000
3	0,5 de la diluc. 1/1.000	0 C.C. 5	1/2.000
	0,5 de la diluc. 1/1.000	1 C.C.	1/3.000
4	0,5 de la diluc. 1/1.000	1 C.C. 5	1/4.000
5	0,5 de la diluc. 1/1.000	2 C.C.	1/5.000
6		0 C.C. 5	1/6.000
7	0,5 de la diluc. 1/4.000	0 C.C. 5	1/8.000
9	0,5 de la diluc. 1/5.000	0 C.C. 5	1/10.000
10	0,5 de la diluc. 1/6.000	0 C.C. 5	1/12.000
	0,5 de la diluc. 1/8.000	0 C.C. 5	1/16.000

Mezclar bien el contenido de cada tubo.

Preparamos complemento diluído 1/30 :

de complemento 0 C.C. 2
de suero fisiológico 5 C.C. 8

Por otro lado preparamos una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2 %.

En una serie de 10 tubos se realiza la titulación de la hemolisina, de acuerdo con el cuadro siguiente:

Tubos	0c.c.5 de las diluc. de hemolisina	c.c. de compl. al 1/30	c.c. de suero fisiol.	c.c. de gl. rojo al 2 %
1	1/1.000	0,3	1,7	0,5
2	1/2.000	0,3	1,7	0,5
3	1/3.000	0,3	1,7	0,5
4	1/4.000	0,3	1,7	0,5
5	1/5.000	0,3	1,7	0,5
6	1/6.000	0,3	1,7	0,5
7	1/8.000	0,3	1,7	0,5
8	1/10.000	0,3	1,7	0,5
9	1/12.000	0,3	1,7	0,5
10	1/16.000	0,3	1,7	0,5

Mezclamos bien el contenido de los tubos y dejamos a 37" a baño maría por 60 minutos. Procedemos luego a la lectura, observando los tubos en que se produce la hemolisis.

La unidad de hemolisina, es la dilución más elevada de hemolisina que produce una hemolisis completa. En las reacciones de fijación del complemento y en la titulación del complemento y del antígeno se utilizan 2 unidades de hemolisina. La solución de hemolisina se titula de tal manera que esas 2 unidades están contenidas en 0,5 C.C.

Un ejemplo aclarará fácilmente su comprensión. Si en nuestra experiencia la unidad es igual a 0,5 c.c. de la dilución a 1/10.000, 2 unidades equivaldrán a 0,5 c.c. de la dilución a 1/5.000. Debemos realizar, sólo la dilución de la cantidad de hemolisis necesaria para las pruebas de titulación y de fijación del complemento. Se han dado tablas para obtener a partir de la solución madre diluciones de manera tal que 0,5 C.C. contengan 2 unidades.

Titulación del complemento. — Empleamos el complemento diluido al 1/30. Diluimos el antígeno de tal manera que la cantidad utilizada en la reacción principal esté contenida en 0,5 C.C. La dilución se hace adicionando el antígeno gota a gota y agitando luego de cada adición. Se prepara el antígeno en cantidad suficiente para titular el complemento y la reacción de fijación de él mismo.

En una serie de 10 tubos realizamos la **titulación** de la manera siguiente :

Tubo	∞.c. de com- plem. diluí- a 1/30	c.c. de an- tígeno	Suero fisiol.	Hemolisina 2 unid. por C.C.	C.C. de dilu- ción de gló. bulo de car- nero al 2%
1	0,10	0,5	1,4	0,5	0,5
2	0,15	0,5	1,4	0,5	0,5
3	0,20	0,5	1,3	0,5	0,5
4	0,25	0,5	1,3	0,5	0,5
5	0,30	0,5	1,2	0,5	0,5
6		0,5	1,2	0,5	0,5
7	0,40	0,5	1,1	0,5	0,5
9	0,45	0,5	1,1	0,5	0,5
10	0,60	0,5	1,0	0,5	0,5
		0,0	2,5	0,0	0,5

Colocar a B. M. a 37° por una hora

Colocar en B. M. a 37° por una hora

Anotar cual es el tubo que da hemolisis con la más pequeña cantidad de complemento.

La unidad exacta de complemento es la más pequeña cantidad de complemento que produce hemolisis completa. El tubo más próximo, de dilución mayor, recibe el nombre de **unidad completa** y contiene 0,05 c.c. más de complemento. En la titulación del antígeno y en las reacciones de fijación del complemento, se emplean 2 unidades completas, **diluidas** de tal modo que estén contenidas en 1 c.c.

Como ejemplo 1 unidad exacta = a 0,3 c.c. de la dilución al 1/30.

Una unidad completa = a 0,35 c.c. de la dilución 1/30.

Dos unidades completas = 0,7 c.c. de la dilución 1/30.

Para calcular la dilución a usar se divide 30 por' dicha dosis. En nuestro ej.

$$\frac{30,00}{0,70} = 42,9$$

Diluimos 1 C.C. del suero original con 42,9 C.C. de suero fisiológico.

Se aconseja diluir el complemento con el suero fisiológico frío, en lugar de utilizar solución salina conservada a la temperatura ambiente. El complemento no diluido y especialmente el diluido debe conservarse en la heladera. La exposición del suero diluido, por más de 1 hora, a la temperatura ambiente, lo deteriora rápidamente. Se encuentran a veces complementos hiperactivos, dando una unidad de 0,1 a 0,25 de la dilución del complemento 1/30; en esos casos se toma arbitrariamente 0,3 C.C. como unidad exacta, por que esas pequeñas cantidades no dan resultados satisfactorios.

Titulación del antígeno. — De acuerdo a Kolmer pueden omitirse las titulaciones de las actividades hemolíticas y anti-complementarias, utilizando el antígeno preparado de la manera dicha. Es necesario, sin embargo, titular la actividad antigénica, pudiéndose utilizar el método siguiente :

1) Diluimos el antígeno al 1/100 para lo cual a 9 C.C. 9 de suero fisiológico se le añaden 0,1 C.C. de antígeno, lentamente y agitando.

2) De esta solución se preparan diluciones más elevadas, en tubos de ensayo, de la manera siguiente:

Tubo	c.c. de anti- no 1/100	c.c. de suero fisiológico	Dilución final del antígeno
1	0,1	0,9	1/1.000
2	0,1	1,9	1/2.000
3	0,1	2,9	1/3.000
4	0,1	3,9	1/4.000
5			
6	0,1	5,9	1/6.000
7	0,1	6,9	1/7.000
8	0,1	7,9	1/8.000
9	0,1	8,9	1/9.000
10	0,1	9,9	1/10.000

3) Se mezclan cuatro sueros, intensamente positivos, diluidos al 1/10, calentados a 55° por espacio de 15 a 20 minutos. La titulación se hace de acuerdo con el cuadro siguiente:

Tubo	0.5 c.c. anti- geno dilu- ción a	c.c. de suero positivo di- luído 1/10	c.c. de compl. 2 unid. completas	c.c. de hemol, 2 unid.	c.c. glób. rojos car- nero al 2 %
1	1/1.000	0,5	1,0	0,5	0.5
2	1/2.000	0,5	1,0	0,5	0.5
3	1/3.000	0,5	1,0	0,5	0.5
4	1/4.000	0,5	1,0	0,5	0.5
5	1/5.000	0,5	1,0	0,5	0.5
6	1/6.000	0,5	1,0	0,5	0.5
7	1/7.000	0,5	1,0	0,5	0.5
8	1/8.000	0,5	1,0	0,5	0.5
9	1/9.000	0,5	1,0	0,5	0.5
10	1/10.000	0,5	1,0	0,5	0.5
11	0,5 s. fisiol.	0,5	1,0	0,5	0.5
12	1,0 s. fisiol.	0,0	1,0	0,5	0.5

B. N. a 37° por 1 hora

Procedemos a la lectura de los tubos, anotando el primer tubo en que no halla hemolisis. Se considera *unidad antigénica*, a la más pequeña cantidad de antígeno que provoca la inhibición completa de la hemolisis. En los tubos 11 y 12, que contienen respectivamente, el control del suero y del sistema hemolítico, la hemolisis, debe ser completa. Generalmente la unidad deberá ser 0,5 c.c. de las diluciones 1/2.000 a 1/4.000.

En las pruebas de fijación del complemento, se emplean 10 **unidades antigénicas**.

El antígeno es diluido de tal manera que 0,5 c.c. contengan las 10 unidades.

Ejemplo: Unidad antigénica 0,5 c.c. de la dilución 1/3.000.

Dosis (10 unidades antigénicas) 0,5 c.c. de la dilución 1/300.

Si la unidad corresponde a 0,5 de la dilución 1/5.000 o es mayor, se deberán emplear 20 unidades antigénicas. Los antígenos se conservan por un año aproximadamente a temperatura ambiente

Elección del procedimiento para las reacciones de fijación del complemento en el l.c.r., para la sífilis.

Existen dos métodos :

1) **Método cuantitativo** en que se emplean 5 dosis de l.c.r., y es el método a utilizar en los casos en que se controla el tratamiento de la sífilis.

2) **Método cualitativo** en que se utilizan 2 dosis y una tercera como control. Este método es suficiente para el diagnóstico e igualmente sensible y específico.

REACCIÓN CUANTITATIVA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO

Empleamos 6 tubos de ensayo y procedemos de la siguiente manera :

1) En los tubos numerados 2, 3, 4, 5 y 6 colocamos 0,5 c.c. de la solución salina.

2) A los tubos 1, 2 y 6 se le añaden **0,5** C.C. de **l.c.r.**

3) Mezclamos bien el contenido del tubo 2 y transferimos **0,5** al tubo 3, mezclamos bien su contenido y pasamos **0,5** al tubo 4, agitamos y transferimos **0,5** C.C. al tubo 5, luego de estar bien mezclados sacamos de éste **0,5** C.C. que desechamos.

Los tubos contienen respectivamente las siguientes cantidades de **l.c.r.** :

Tubo 1: **0,5** C.C.

Tubo 2: **0,25** C.C.

Tubo 3: **0,125** C.C.

Tubo 4: **0,0625** C.C.

Tubo 5: **0,03125** C.C.

Tubo 6: control, **0,5** C.C. de **l.c.r.**

4) A los 5 primeros tubos se le agregan **0,5** C.C. del antígeno **diluido** en la dosis adecuada y dejamos en reposo de 10 a 30 minutos.

5) Añadimos luego, 1 C.C. de complemento (2 unidades completas) a temperatura ambiente.

6) Preparamos los siguientes controles :

a) Control antígeno

0,5 C.C. de antígeno **diluido**

0,5 C.C. de **solución salina**

1 C.C. de complemento (2 unidades completas).

b) Control del sistema hemolítico

1 C.C. de solución salina

1 C.C. de complemento (2 unidades completas)

c) Control de hematíes

2,5 C.C. de solución salina

d) L.C.R. positivo } Preparados de igual
e) L.C.R. negativo } manera que el **l.c.r.**
 } en estudio.

7) Mezclamos bien los tubos, y llevamos a la heladera a **6° - 8°** de 15 a 18 horas.

8) A todos los tubos, excepto al testigo de glóbulos, se le añaden **0,5** C.C. de hemolisina que contengan 2 unidades, y además a todos los tubos se le agregan **0,5** C.C. de la suspensión de glóbulos rojos al 2 %. Agitar bien.

10) Mezclamos bien el contenido de los tubos y lo colocamos a baño maría a **37°** durante 1 hora. Procedemos a la lectura inmediatamente, o bien, después que los testigos del antígeno, del sistema hemolítico y los sueros **controles**, hayan presentado **hemolisis** completa. Este último método es preferible.

11) La lectura puede hacerse de la manera dicha, o colocar los tubos varias horas en la heladera, que facilitan la sedimentación de los hematíes no hemolizados.

Los resultados se expresan de la manera siguiente:

Se lee en cada tubo la inhibición de la hemolisis.

Hemolisis completa —	0
25 % de inhibición +.	1
50 % de inhibición ++	2
75 % de inhibición +++	3
100 % de inhibición ++++	4

El testigo de glóbulos no debe presentar hemolisis. Los testigos de suero, de antígeno, o del sistema hemolítico habrán de presentar hemolisis completa.

Interpretación de las reacciones.

El Comité Americano para la valoración de las pruebas de diagnóstico de la sífilis recomienda informar las reacciones solamente como positivas, negativas o dudosas. Esto es suficiente para el diagnóstico, pero el siguiente procedimiento es de gran valor para seguir al proceso del tratamiento antisifilítico. La interpretación de los resultados se hace de la manera siguiente:

a) **Reacción muy intensamente positiva**, cuando se produce fijación del complemento (++++) en los 5, 4 0 3 primeros tubos. A veces el líquido muestra menos fijación de complemento en el primer tubo que en los siguientes. Ejemplo de este tipo de reacción es el siguiente: 44444, 44440, 44400, 34400, etc.

b) **Reacción intensamente positiva**, cuando la fijación completa (++++) se produce en el tubo 1 y 2 o solamente en el dos. Ejemplos: 44310, 44200, 34200, 44000, etc.

c) **Reacción moderadamente positiva**, cuando la fijación completa (++++) se produce sólo en el primer tubo. Ejemplo: 43100, 42000, 40000, etc.

d) **Reacción débilmente positiva**, cuando la fijación parcial se produce en 1 o más tubos. Ejemplo: 32100, 21000, 10000, etc.

e) **Reacción dudosa**, cuando la reacción es positiva en el primer tubo.

f) **Reacción negativa**, cuando hay hemolisis completa en , todos los tubos.

REACCIÓN CUALITATIVA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO

1) Utilizamos 2 tubos y colocamos en cada uno 0,5 C.C. de l.c.r. (el tubo 2 sirve de control).

2) Agregamos al tubo 1, 0,5 C.C. de la dilución adecuada de antígeno. Al tubo 2 se le añaden 0,5 C.C. de suero fisiológico.

3) Dejamos en reposo 10 minutos y agregamos a cada tubo 1 C.C. de complemento, conteniendo 2 unidades completas ; lo mismo se hace con un testigo que lleva 1 C.C. de suero fisiológico (testigo del sis tema hemolítico).

4) Se prepara un testigo de glóbulos: 2,5 C.C. de suero fisiológico y 0,5 C.C. de la suspensión de glóbulos a 2 %.

5) Se agitan los tubos con suavidad y luego de dejarlos en la heladera a 6-8° durante 15 a 18 horas se coloca a baño maría a 37° durante 10 a 15 minutos.

6) A todos los tubos, excepto al testigo de glóbulos, se le añade 0,5 C.C. de hemolisina que contiene 2 unidades.

7) A todos los tubos, excepto al testigo de glóbulos, se le añaden 0,5 C.C. de la suspensión de glóbulos al 2 %. Agitamos bien.

8) Se colocan los tubos a baño maría a 37° durante 1 hora, al cabo de los cuales se leen los resultados. Puede hacerse una lectura más sensible leyendo 10 minutos después que los testigos de antígeno, del sistema hemolítico y del suero muestran hemolisis completa. Los testigos del suero, del sistema hemolítico y del antígeno habrán de estar completamente hemolizados. El testigo de glóbulos, por el contrario, no debe mostrar hemolisis. La lectura se hace de la siguiente manera:

Fijación completa ++++ reacción fuertemente positiva
 -Fijación tipo +++ reacción moderadamente positiva.
 Fijación tipo ++ ó + reacción positiva débil.
 Fijación tipo ± reacción dudosa.
 Hemolisis completa — reacción negativa.

Técnica para pequeña cantidad de l.c.r.

Cuando disponemos de escasa cantidad de l.c.r., se procede de igual manera a la técnica descrita, pero empleando sólo la mitad de los volúmenes utilizados en la técnica anterior.

Reacciones de la floculación para el diagnóstico de la sífilis **Reacción de Kahn**

Materiales y reactivos.

- 1) Tubo para la suspensión del antígeno, 5,5 por 1,5 C.C. de diámetro interior.
- 2) Tubos de ensayo, sin reborde, de aproximadamente 7,5 por 1,0 C.C..
- 3) Pipetas.
de 1 C.C. graduadas en 0,01
de 0,2 C.C. graduadas en 0,001
- 4) Soportes de metal con 3 hileras de 10 agujeros cada una.
- 5) Los tubos pueden ser agitados a mano, pero es preferible utilizar agitadores mecánicos, oscilando 275 a 285 oscilaciones por minuto, con una amplitud de 4 cms.
- 6) Solución de cloruro de sodio (ver técnica de fijación del complemento de Kolmer).
- 7) Preparación del antígeno.

Pueden utilizarse polvos de corazón "Difco".

a) En un frasco de Erlenmeyer, de 500 C.C. de capacidad colocamos 50 grs. de corazón de bovino pulverizado y le agregamos 250 C.C. de éter agitando fuertemente por espacio de 10 minutos. Luego filtramos, comprimiendo ligeramente el polvo contra las paredes del filtro, ayudándonos con una espátula, para extraer lo más totalmente posible el éter. El polvo que queda en el filtro, es colocado nuevamente en el frasco de Erlenmeyer, añadiendo 150 C.C. de éter, agitamos a intervalos frecuentes por espacio de 10 minutos. Filtramos siguiendo las mismas indica-

ciones que las dadas anteriormente. Volvemos a colocar nuevamente el polvo en el frasco de Erlenmeyer y realizamos una tercera extracción con 150 C.C. de éter y procedemos a una nueva filtración. Por último realizamos una cuarta extracción con 150 C.C. de éter.

En estas extracciones se aconseja utilizar nuevo papel de filtro en cada filtración, y raspar cuidadosamente el papel con una espátula luego de filtrado el éter, para evitar la pérdida de polvo de corazón.

Luego de la última filtración colocamos el polvo, todavía húmedo y bien extendido, sobre un papel de filtro o una lámina de vidrio y llevamos la estufa a 37°. Cuando el polvo no tenga más olor a éter está pronto para las maniobras ulteriores.

b) Pesamos el polvo seco y lo transferimos a un frasco de Erlenmeyer de 500 C.C., añadiéndole 5 C.C. de alcohol a 95° por cada gramo de polvo seco. Agitamos durante 10 minutos y dejamos a temperatura ambiente (aproximadamente a 21°) durante 3 días. El frasco no es agitado en ese tiempo, sino solo, durante 5 minutos antes de comenzar a filtrar. El filtrado alcohólico es el antígeno madre, y es guardado en frasco de vidrio a la oscuridad a la temperatura ambiente. Los corchos utilizados en la preparación y almacenamiento del reactivo, se cubren con una hoja de estaño.

c) Colesterolización. Se transfiere una parte del extracto alcohólico a un frasco de Erlenmeyer, agregando por cada C.C. del extracto 6 miligr. de colesterol. El frasco se sumerge en agua caliente y se le imprime movimientos de rotación, hasta que el colesterol se disuelve. Luego filtramos y el antígeno está listo para su titulación.

Titulación del antígeno.

1) *Prueba de dispersibilidad.*

a) En 5 tubos especiales (5,5 por 1,5 C.C. de diámetro interior) se colocan respectivamente 0,6, 0,8, 1,0, 1,1, 1,2 C.C. de solución de cloruro de sodio al 9 por litro.

b) En otros 5 tubos, iguales a los anteriores, colocamos en cada uno, 1 C.C. de antígeno colesterolado.

c) Preparamos la suspensión del antígeno, de la manera siguiente: la solución salina se vierte rápidamente sobre el antígeno. Debemos proceder rápidamente, sin dejar que los tubos se escurran. La mezcla se realiza bien, pasándola 6 veces de uno a otro tubo. Dejamos en reposo a temperatura ambiente no menos de 10 ni más de 30 minutos.

d) Disponemos 5 series de 3 tubos cada uno, colocando en cada serie, 0,05, 0,025 y 0,0125 C.C. de cada una de las suspensiones, usando pipetas de 0,2 C.C. graduadas en 0,001 C.C., llevando el líquido al fondo del tubo. Se comienza por la suspensión que tenga la más pequeña cantidad de antígeno y se continúa con las más concentradas.

e) Añadir a cada tubo 0,15 C.C. de la solución salina.

f) Agitamos bien los tubos a mano o por medio del agitador mecánico.

g) Añadimos 1 C.C. de la solución salina a los tubos que contengan 0,05 C.C.: de la suspensión de antígeno y 0,5 C.C. de la misma solución salina a los tubos restantes. Observamos cuáles tubos presentan agregados y cuáles son opalescentes.

Lectura. — Se considera como *título del antígeno*, la más pequeña cantidad de solución salina que agregada a 1 C.C. de antígeno, produce agregados capaces de ser dispersados completamente, por la **adición** de una nueva cantidad de solución salina, dando un medio opalino y sin cristales de colesterol. Si la prueba realizada muestra que 1 c.c. de antígeno, mezclado por 1 C.C. de suero fisiológico, la solución es completamente dispersada, se dice que el título del antígeno es 1:1. Si el agregado de 1,2 C.C. de solución salina a 1 C.C. de antígeno, resultaran aún suspensiones conteniendo partículas no dispersables, por el agregado de nuevas cantidades de solución salina, se continúa la titulación con cantidades mayores de 1,3 1,4 C.C., etc.

2) Prueba de la sensibilidad. — La sensibilidad del antígeno preparado es determinada por comparación con el antígeno de Kahn. Se obtienen 8 sueros positivos y 2 sueros negativos. De los ocho sueros positivos, seis serán débilmente positivos y dos débilmente positivos. Todos los sueros son calentados 30 minutos a 56° antes de la prueba. Si los sueros habían sido ya, previamente calentados, volvamos a calentar a 37° durante 10 minutos. Preparamos las suspensiones del antígeno, de acuerdo con el título obtenido, y dejamos madurar durante 10 minutos. Disponemos 20 series de 3 tubos cada uno. A las primeras 10 series le agregamos 0,05, 0,025 y 0,0125 c.c. del nuevo antígeno y 0,15 C.C. de cada suero. A la segunda serie, le agregamos las mismas cantidades del antígeno standard y 0,15 C.C. de los sueros. Agregamos a todos los tubos 0,15 C.C. de solución salina a cada tuba. Se agitan los tubos durante 3 minutos en el agitador mecánico. Agregamos 1 C.C. de solución salina a los tubos conteniendo 0,05 C.C. de la suspensión del antígeno y 0,5 c.c. a los tubos restantes.

Interpretación de los resultados. — Si los resultados obtenidos con ambos antígenos, son similares, el nuevo antígeno posee sensibilidad análoga a la del padrón. La sensibilidad podrá ser mayor o menor que la del padrón, en estos casos puede corregirse el antígeno.

Prueba de corrección. — Son necesarios los reactivos siguientes :

1º) **Alcohol colesteroiado.** 0 gr. 60 de colesterol se añaden a 100 C.C.. de alcohol a 95° colocados en un frasco de *Erlenmeyer*. Llevamos el frasco a agua caliente y por movimiento de rotación, favorecemos su dilución. Filtramos y guardamos en frasco oscuro.

2º) **Reactivo sensibilizante.** — 1) El filtrado etéreo, obtenido en la preparación del antígeno con 50 grs. de polvo de corazón, es filtrado nuevamente y evaporado con ayuda de un ven-

tilador hasta un volumen aproximado de 10 C.C. 2) El extracto etéreo concentrado, se coloca en una pequeña cápsula de porcelana (de 225 C.C. de capacidad) tarada, lavando con pequeñas cantidades de éter el frasco que son agregados a la cápsula. 3) **Continuamos la** evaporación hasta que no se perciba más el olor a éter. En este período pueden aparecer algunos C.C. de agua, que se extraen por medio de una pipeta capilar, del residuo viscoso y pardusco.

4) La cápsula es pesada nuevamente, para calcular el peso de los residuos.

5) Con una pequeña espátula transferimos el residuo a un frasco de Erlenmeyer de 100 C.C. añadiéndole 10 C.C. de alcohol absoluto por cada gramo de residuo.

6) Dejamos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Si se forma un precipitado, filtramos.

8) El filtrado se colesteroaliza, agregando 6 miligr. de colestero por cada C.C. del filtrado, colocando el frasco en agua caliente y rotándolo para facilitar la disolución.

9) Se filtra nuevamente y queda pronto para el uso. Guardar en frasco oscuro con corcho recubierto con papel de estaño.

Antígeno hipersensible. — Si el antígeno es más sensible que el padrón, es posible corregirle, diluyendo el antígeno con alcohol colesteroizado o concentrando los lípidos del antígeno. La dilución es el procedimiento más simple.

1) A 10 C.C. de antígeno hipersensible le agregamos 1 C.C. de alcohol colesteroizado al 15 %.

2) Realizamos una **comparación** con el antígeno padrón. Si los resultados son comparables se calcula la cantidad de alcohol colesteroizado a agregar al resto del antígeno.

3) Si el **antígeno** continúa siendo más sensible, se ensaya una nueva dilución **más** elevada, por ejemplo 25 %. Si por el contrario la sensibilidad del reactivo ha disminuído por debajo de la del tipo, se ensaya una dilución menor, por ejemplo 10 %.

Antígeno hiposensibles. — La corrección en estos casos se hace por dilución del antígeno, con alcohol colesteroizado si esa hiposensibilidad es debida a una excesiva concentración de lípidos, o por el contrario, si la menor sensibilidad se debe a la insuficiente concentración de lípidos, la corrección se hace añadiéndole una pequeña cantidad de reactivo sensibilizador, por ejemplo al 5 %. La técnica es la siguiente: a 10 C.C. de antígeno hiposensible le añadimos 0,05 C.C. del reactivo sensibilizador y procedemos a la comparación con el antígeno padrón. Si sigue siendo menos sensible, agregamos mayor cantidad del antígeno sensibilizador, y si por el contrario fuera más sensible, se le disminuye la cantidad del reactivo.

El antígeno una vez standardizado, es guardado a la temperatura ambiente y a la oscuridad, en frasco tapado con tapón de estaño.

Técnica de la reacción.

Reacción standard. — Las globulinas del l.c.r. son precipita-

das por sulfato de amonio y redisueltas en una cantidad de suero fisiológico equivalente a una $1/10$ del volumen original del l.c.r.

Precipitación de las globulinas y redisolución en el suero fisiológico.

Reactivos necesarios.

- 1) Suero fisiológico.
- 2) Solución saturada de sulfato de amonio.

Técnica.

- 1) Centrifugamos el l.c.r. y colocamos 1,5 C.C. del líquido sobrenadante en un tubo standard de Kahn.
- 2) Le añadimos 1,5 C.C. de solución saturada de sulfato de amonio, mezclando por inversión del tubo, y agitando luego enérgicamente.
- 3) Colocamos la mezcla al baño maría a 56° durante 15 minutos.
- 4) Luego de ese tiempo centrifugamos enérgicamente a 3.000 durante 15 minutos para sedimentar las globulinas.
- 5) Eliminamos el líquido sobrenadante, con ayuda de una pipeta capilar, o bien invirtiendo el tubo y dejando boca abajo sobre un papel de filtro.
- 6) Al precipitado se le añaden 0,15 C.C. de suero fisiológico y ayudamos la disolución, con una ligera agitación.

Técnica de la reacción.

- 1) Preparación de la suspensión antigénica. Se mezcla el antígeno con el suero fisiológico de acuerdo con el título del antígeno; si el título es 1 C.C. de antígeno y 1,2 C.C. de suero fisiológico procedemos del modo siguiente:
 - a) Colocamos 1 C.C. del antígeno en un tubo standard, 5,5 par 1,5, y en otro tubo igual 1,2 C.C. de suero fisiológico.
 - b) Vertimos el suero fisiológico sobre el antígeno rápidamente y sin esperar que escurra el líquido y pasamos la mezcla de un tubo a otro 6 veces para asegurarnos de su perfecta repartición,
 - c) Dejamos en reposo a temperatura ambiente, no menos de 10 ni más de 30 minutos.
- 2) Colocamos en el fondo de tres tubos de Kahn, 0,01 c.c. del antígeno de Kahn.
- 3) A uno de ellos le agregamos 0,15 C.C., medidos con pipeta de 0,2 C.C., de la solución de globulinas recientemente preparadas. A uno de los tubos restantes, le añadimos igual cantidad de la suspensión de globulinas de un líquido positivo y al último la suspensión de globulinas de un líquido negativo. Éstos últimos actúan de control. Conviene preparar muestra duplicada de todos los líquidos.
- 4) Añadimos a cada tubo 0,15 C.C. de solución salina con ayuda de una pipeta de 0,2 C.C.
- 5) Agitamos enérgicamente los tubos por 10 segundos.

6) Luego son agitados por medio del agitador mecánico durante 4 minutos.

7) A cada tubo se le añaden finalmente 0,5 C.C. de suero fisiológico.

8) Dejamos en reposo a la temperatura ambiente durante 15 minutos y procedemos a la lectura.

Expresión de los resultados. — Se utiliza el método de las cruces.

1) Reacción ++++. Se observan netamente las partículas en suspensión en un medio opalino o transparente.

2) Reacción ++++. Las partículas se distinguen bien aunque con menos facilidad que en el caso anterior, y sólo se distinguen si levantamos el tubo y se examinan individualmente.

3) Reacción ++. Las partículas son más finas y generalmente sólo se distinguen por inclinación del tubo, de manera que el líquido se esparza en una capa fina.

4) Reacción +. Las partículas son más finas que en el tipo 3).

5) Reacción dudosa, en que no es posible afirmar la presencia de partículas.

6) Reacción negativa. En medios opalinos y libres de partículas. El Comité Americano de evaluación de las pruebas para el diagnóstico de la sífilis, aconseja indicar los resultados sólo, positivos, dudosos o negativos.

Reacción microscópica de Kline

Reactivos.

1) Preparación del antígeno.

a) En un frasco de Erlenmeyer de 2 litros se colocan 200 grs. de polvo de corazón (Difco) y se le añade 1 litro de alcohol etílico absoluto.

b) Tapamos el frasco con un corcho envuelto en una lámina de estaño y agitamos a intervalos regulares, de manera energética durante 2 horas. La agitación puede hacerse con un agitador mecánico.

c) Filtramos, recogiendo el líquido en una probeta de 1 litro, a través de papel de filtro de buena calidad. Al final de la filtración se comprime la masa del polvo con una espátula hasta que el polvo esté casi seco.

d) El extracto alcohólico obtenido es colocado en una heladera a temperatura 6 a 8° por 24 horas. Durante ese tiempo se forma un precipitado blanco que es separado por filtración.

e) El filtrado se coloca en una cápsula de porcelana y se concentra al baño maría a una temperatura de 45 a 50°. La temperatura se determina con un termómetro colocado en el extracto. Durante la evaporación aparece en la periferia del líquido un festón irregular que desaparece cuando la concentración llega al punto conveniente. En ese momento retiramos el extracto del baño maría.

f) El extracto se vierte rápidamente en 500 C.C. de acetona q.p. colocado en una cápsula y **calentada** a 50°.

g) La cápsula es llevada a la estufa a 37" por 15 minutos. Al cabo de ese tiempo la acetona decanta, dejando un residuo céreo, de color pardusco, adherido a la cápsula. Este tiempo de incubación es importante porque con mayor tiempo o a temperatura más baja, el antígeno se **hace** más sensible y menos **específico**.

h) Se lleva luego la cápsula a la estufa a 50°, hasta que la pequeña cantidad de acetona se haya evaporado. Generalmente se requieren 30 minutos.

i) Recogemos bien la cera y la pasamos a un frasco con tapón de vidrio. Se le añaden 80 C.C. de alcohol absoluto, que ha sido previamente colocado en una estufa a 50 - 56" durante 30 minutos. A los 15 minutos agitamos suavemente y lo mismo hacemos a los 30 minutos. Retiramos el frasco y lo llevamos a la heladera a 6 - 8° durante 45 minutos.

j) Filtramos la **solución** y el filtrado se evapora a 50° obteniéndose una cera de color pardusco. La pesamos y por cada gramo de ella se le añade 10 C.C. de alcohol etílico absoluto a una temperatura de 50 - 56°. Agitamos el frasco unos minutos y lo llevamos a la estufa a 50° por 30 minutos, agitando luego ligeramente.

k) La solución, ligeramente turbia, es llevada a temperatura de 6 a 8° durante 30 minutos aproximadamente y luego se filtra. El filtrado limpio es el antígeno. El antígeno se guarda a temperatura ambiente en frasco de vidrio.

2) Cristalería.

a) Láminas. Se necesitan láminas de vidrio de 10 × 25 cms. aproximadamente. Sobre esas láminas perfectamente limpias se montan 12 anillos con parafina, de un diámetro interior de 33 milímetros- dispuestos en 2 hileras de seis anillos cada uno. Esos anillos pueden realizarse sumergiendo la boca de un tubo de ensayo con reborde, de 33 milímetros de diámetro, dentro de parafina fundida y de punto de fusión de 50 - 56° y aplicados rápidamente sobre la lámina de vidrio.

b) Pipetas. Se utilizan pipetas de 0,2 a 10 C.C. Las pipetas de 0,2 C.C. están graduadas en 0,001 C.C. Las pipetas utilizadas para el antígeno, son las de Wright, que proporcionan una gota de 0,008 C.C. (62 gotas por 0,5 C.C.).

3) Suero fisiológico. 0 grs. 50 de cloruro de sodio q.p. son disueltos en 1.000 C.C. de agua destilada. Esta debe tener un pH aproximado de 6.

4) **Acido** acético q.p. al 1 %.

5) Líquido céfalo raquídeo. Los líquidos con sangre, pus o contaminados con bacterias, o bien aquellos que hayan recibido suero, no pueden ser utilizados en la prueba. Conviene utilizar siempre l.c.r. centrifugado para eliminar cualquier partícula, y utilizar el líquido que sobrenada. En todos los líquidos, en que se realiza la reacción de Kline, se dosifica la glucosa, desechando los que den valores muy bajos de glucorraquia. Este es un hecho corriente en las meningitis bacterianas, y en los que el líquido

puede tener sustancias capaces de producir falsos positivos. Los líquidos recogidos sin precauciones de asepsia, y conservados a temperatura ambiente, pueden facilitar el desarrollo bacteriano que disminuye la glucosa y ocasionar la pérdida de las sustancias **reactivas**. Es aconsejable por lo tanto recoger los líquidos en tubos estériles y guardados en la heladera a 6° u 8°, hasta la realización de la prueba.

6) Preparación de las emulsiones de antígeno. En un tubo de ensayo colocamos **0,85** C.C. de agua destilada a pH aproximado de 6, **1,25** C.C. de colesterol q.p. al 1 % en alcohol etílico absoluto, **0,1** C.C. del antígeno y **2,2** C.C. de cloruro de sodio al **8,5** %.

Preparación del antígeno para la prueba de exclusión. — Colocamos 4 C.C. de la emulsión en un tubo de 12 milímetros de diámetro interior y se lleva a baño maría a 50° por 15 minutos. Se vierten en un tubo de **7,5** por **2,5** cm. y son centrifugados por 15 minutos. Se decanta el líquido, y con el tubo invertido se limpia su interior con un paño, casi hasta el nivel del sedimento. Se le agrega a éste 1 C.C. de la solución del cloruro de sodio al **8,5** grs. por mil. Se traspasa para el uso a un tubo estéril.

Preparación del antígeno para La prueba diagnóstica. — Se colocan 4 C.C. de la emulsión en un tubo de 12 milímetros de diámetro interior y se deja 15 minutos a 35°. Se vierte luego el líquido en un tubo de **7,5** por **2,5** ctms. Se centrifuga durante 15 minutos. Decantamos el líquido, limpiando el interior del tubo con un paño, casi hasta el nivel del sedimento. A este se le añade 1 C.C. de cloruro de sodio al **8,5** por litro y se traspasa para el uso a un tubo estéril.

Técnica de la reacción.

1) Con una pipeta de **0,2** C.C. graduada en 0,001 se colocan **0,05** C.C. de la solución al 1 % de ácido acético en cada una de las **12** cámaras de la lámina de vidrio, estando éstas inclinadas, por haber colocado debajo de ellas una varilla de 3 milímetros de diámetro.

2) Se colocan, ayudándose con una pipeta de 1 C.C., graduada en centésimos, **0,25** C.C. del líquido céfalo raquídeo en las **12** cámaras. La pipeta se lleva inmediatamente por encima de la superficie del ácido y con la punta de ella se toca en un lugar seco de la cámara.

3) Las láminas se hacen rotar con suavidad durante 1 minuto.

4) Con una pipeta de Wright se deja caer 1 gota (aproximadamente 0,008 C.C.) de la emulsión diagnóstica de antígeno en cada una de seis cámaras.

5) A las otras seis cámaras, se le añaden de modo similar, 1 gota de la suspensión de antígeno para la prueba de exclusión.

6) Se le imprime durante 1 minuto un pequeño movimiento de rotación y luego, durante 4 minutos, se balancea de delante a atrás, con **cuidado**, pero rápidamente con una amplitud de $\frac{1}{2}$ a 1 cm.

7) Sin perder tiempo se examina al microscopio con 120^x aumentos.

Lectura.

De acuerdo con el tamaño y cantidad de los grumos se informa :

Reacción fuertemente positiva ++
 Reacción positiva +
 Reacción dudosa
Reacción negativa.

Nociones técnicas sobre el examen bacteriológico

Para el estudio bacteriológico del l.c.r. se siguen, en general, las mismas normas y se utilizan los mismos métodos que para el de cualquier otro producto orgánico. El desarrollo de las diversas técnicas que pueden ser utilizadas nos obligaría a dedicarle a este tema una extensión desproporcionada con la finalidad y el alcance de la obra. Por eso nos concretaremos a exponer algunos **conceptos** generales y algunos detalles referentes a la manera de llevar a cabo el examen de ciertos casos particulares.

Una circunstancia especial, la de que el l.c.r. se halla aislado de la flora bacteriana que habita las superficies de piel y mucosas en estado normal, simplifica grandemente la interpretación del hallazgo bacteriológico, siempre que se haya recogido el producto en condiciones correctas, al abrigo de la contaminación exterior. Por lo tanto, como norma general, se debe establecer que el hallazgo de una determinada especie en un l.c.r. en estudio, permite asegurar la condición de agente **etiológico** del proceso patológico existente. Nuestros conocimientos actuales de bacteriología nos indican que el correcto diagnóstico de una especie bacteriana, se basa en un estudio completo de sus caracteres morfológicos, de sus características culturales, de sus propiedades bioquímicas, de su composición antigénica y de su acción patógena. No siempre es posible utilizar todos esos elementos de juicio, pero en cada caso debe tenderse a determinar el mayor número de ellos de que sea posible disponer para acercarnos a un diagnóstico bacteriológico perfecto.

El examen directo tiene un gran valor de orientación y, a menudo, nos permite proporcionar al clínico datos de mucha utilidad para encarar la terapéutica. En la mayoría de los casos para obtener un material adecuado para el examen se debe someter al líquido a una centrifugación a gran velocidad y durante un tiempo prolongado. Los métodos de coloración del **frotis** preparado con el sedimento variarán según los casos, si bien son imprescindibles las técnicas básicas de Gram y Ziehl-Neelsen. El fracaso del examen no nos indica, como es bien sabido, que el **líquido** en estudio sea estéril, por lo que es siempre necesario recurrir al cultivo y a la inoculación animal, según las técnicas correspondientes a cada caso particular.

Los cultivos se deben efectuar utilizando diversos medios

según la orientación diagnóstica que se tenga. **Para un estudio bacteriológico general, con excepción de *Mycobacterium*, se emplean medios sólidos o líquidos ricos en proteínas (ascitis, sangre, suero, etc.).** Es conveniente efectuar cultivos en aero y **anaerobiosis**. Con frecuencia la colocación de algunos tubos en atmósfera de CO₂, al 10 % es útil (Brucellas, Neisseria). La prolongación de la incubación durante varios días es de valor en algunos casos.

La positividad del cultivo nos permite establecer con más probabilidad el diagnóstico de la especie en causa. Son elementos a. anotar cuidadosamente: el tiempo de aparición de las colonias, el tamaño de éstas, su forma, **color**, transparencia u opacidad, etc. La morfología microscópica de los organismos que han desarrollado debe establecerse cuidadosamente, teniendo en cuenta, para la interpretación, el polimorfismo que, en los cultivos, pueden presentar las diversas especies. En general la morfología más característica es la observada al examen directo del material original, procedente de las lesiones. Cuando se tiene un cultivo puede, a veces, obtenerse el aspecto típico inoculando un animal sensible y efectuando frotis de los exudados de las lesiones provocadas.

Obtenido un cultivo puro de la bacteria en causa, es necesario someterla a un estudio bacteriológico completo. Ya en los medios utilizados para el cultivo original se pueden poner en evidencia algunas características (hemolisis, por ej.), pero deben buscarse sistemáticamente con la cepa aislada las propiedades bioquímicas, serológicas y biológicas en general, de acuerdo con los principios generales de la bacteriología y siempre orientados por los hallazgos anteriores, sin olvidar que la bacteriología médica es una ciencia aplicada, que trata de establecer el diagnóstico lo más rápidamente posible y muy a menudo es necesario sacrificar la exactitud científica en aras de la premura.

Es aquí donde se pone en evidencia la sagacidad y prudencia del técnico, pues debe establecerse un límite que no se puede traspasar sin correr el riesgo de una grave confusión.

La acción patógena experimental es de primordial importancia en algunos casos (tuberculosis, por ej.), pero es un complemento valioso para establecer el diagnóstico bacteriológico completo en muchos otros. Por lo general sus resultados llegan demasiado tarde como para que sean de utilidad en la terapéutica del caso clínico.

Meningitis meningocócica.

Examen directo. — Al revés de lo que sucede habitualmente con los otros tipos de meningitis purulenta, puede ser difícil poner en evidencia el meningococo al examen directo. Según **FLACK** (1933), en líquidos claros el meningococo **sólo** es encontrado en un 33 % de los casos, en líquidos ligeramente turbios se lo puede poner en evidencia en un 61 % y en líquidos turbios en un 96 %.

Con el líquido claro sobrenadante después de centrifugación

se puede practicar una reacción de **precipitación** utilizando un suero. específico.

Cultivo. — Sembrando agar-ascitis o agar-sangre e incubando a **37°C**, se pueden observar colonias, a veces en un plazo relativamente corto (18 horas). Con frecuencia el desarrollo es favorecido utilizando una atmósfera de CO₂ al 10 %.

Estudios serológicos, con sueros monovalentes, pueden permitir una determinación del tipo. Conviene efectuar siembras en medios con glucosa, sacarosa y maltosa. El meningococo acidifica los medios con glucosa y maltosa, pero no actúa sobre la sacarosa.

En los casos en que no se han encontrado gérmenes al examen directo, puede ser de utilidad un enriquecimiento previo del **l.c.r.**, en la estufa a **37° C**. A veces se produce un desarrollo en el mismo líquido. En cuanto se produce enturbiamiento se siembra en los medios indicados.

Meningitis neumocócica.

Examen directo. — Las bacterias aparecen, en general, con relativa facilidad. En los casos de meningitis por el tipo mucoso, generalmente de origen **ótico**, aparecen a menudo **cocos** en cadena, que podrían ser tomados por estreptococos, más todavía porque la envoltura mucosa que en otras localizaciones **es tan** marcada, que en una coloración de Gram toma la apariencia de una cápsula evidente, en el caso del **l.c.r.**, falta con frecuencia. Observando bien se nota que entre los elementos de la cadena hay siempre una sustancia, teñida por la **fuchsina**, que los une y además, presentan signos de autólisis, pues al lado de elementos normales en forma y coloración se observan otros hidrópicos y mal teñidos.

Cultivo. — Se practica en los mismos medios que hemos indicado para el meningococo. Las pruebas corrientes de identificación del neumococo (lisis por la bilis, etc.) permiten efectuar el diagnóstico con rapidez. Si se dispone de sueros específicos, se debe practicar la determinación del tipo.

La inoculación al ratón, puede prestar gran ayuda para el diagnóstico.

Meningitis por *H. influenzae*.

Examen directo. — A menudo aparecen en gran cantidad. Junto a elementos de morfología típica, se pueden observar formas filamentosas.

Cultivo. — No hay que dejarse **engañar** porque el cultivo original sea positivo **aún** en medios que no contengan sangre, pues las **sustancias** nutritivas que acarrea el **l.c.r.** pueden ser suficientes para permitir el desarrollo. Pero los subcultivos no se obtendrán si el medio no contiene los factores X y V, necesarios para su crecimiento.

El establecimiento del tipo serológico, de ser posible, ayudará para la terapéutica específica.

Meningitis tuberculosa.

Examen directo. — Con frecuencia la investigación de bacterias ácido-resistentes será negativa al examen directo, aún tratándose de auténticas meningitis tuberculosas. Una centrifugación a gran velocidad y muy prolongada, es de todos modos, siempre necesaria. Diversos métodos de enriquecimiento han sido propuestos. Recientes estudios de **HANKS Y FELDMANN** (1484), utilizando métodos de floculación química y solventes de lipoides, parecen demostrar que el tratamiento por cloroformo, es de gran utilidad para el examen directo, porque ese disolvente tiende a disociar los grumos de bacilos y facilita su hallazgo. Pero estas investigaciones fueron efectuadas sobre líquidos preparados con cultivos, los resultados obtenidos sobre líquidos tuberculosos naturales no confirmaron totalmente lo observado en aquéllos. De todos modos, es una vía a estudiar cuidadosamente, pues es conocida la importancia clínica de un diagnóstico temprano de la enfermedad y es sabido que los métodos más sensibles dan resultados positivos con mucha mayor lentitud.

Cultivo. — Es perfectamente conocida la superioridad del cultivo sobre el examen directo, en lo que respecta a su sensibilidad para poner en evidencia el bacilo de Koch. En nuestro medio, la experiencia de **CANCELA FREIJO** (1485), confirmando lo observado por la mayoría de los autores y basada en la observación de 2.706 materiales, demuestra que el cultivo mejora los resultados del examen directo en más de un 65 %.

Deben utilizarse medios con y sin **glicerol**, para poder poner en evidencia el bacilo bovino.

El examen periódico de los tubos sembrados, antes de la **aparición** de las colonias macroscópicas, es de gran valor para apresurar el diagnóstico, así como fué destacado por diversos autores y especialmente por **SAENZ Y COSTIL** (1486).

Inoculación. — La inoculación al cobayo debe utilizarse siempre que sea posible, pues además de tener una sensibilidad por lo menos igual a la de los cultivos — ligeramente superior según la mayoría de los autores — su especificidad es prácticamente absoluta. Los cobayos deben ser periódicamente explorados por medio de reacciones tuberculínicas, **sacrificándolos** en cuanto éstas viran a la positividad.
