

Como puede afectar el resultado de la Reacción de Wassermann la presencia del amboceptor natural anticarnero

POR EL DR. ERNESTO CERVERA.

INTRODUCCION. Hideyo Noguchi (1) fué el primero que hizo notar que la reacción de Wassermann está sujeta a una causa de error que depende de la presencia en el suero humano de cantidades variables de amboceptor natural anticarnero. Muchas de las muestras de suero humano por él examinadas contenían en 0.1 cc. hasta 20 unidades de amboceptor anticarnero, mientras que algunas otras estaban completamente desprovistas de este amboceptor. Ahora bien, así como lo ha demostrado este experimentador, 4 unidades de amboceptor natural impiden que se revele una unidad de anticuerpo sífilítico, de manera que si hay 8 unidades de amboceptor natural anticarnero y dos unidades de anticuerpos sífilíticos la reacción es negativa. Con el objeto de remediar este inconveniente, y poder diagnosticar hasta fracciones de unidad de anticuerpos sífilíticos, Noguchi recomendó el uso del sistema hemolítico antihumano, ya aconsejado por Tschernogubow (2) con el fin de simplificar el suerodiagnóstico de la sífilis.

Con el mismo objeto se ha propuesto suprimir el amboceptor natural anticarnero tratando el suero del paciente por glóbulos homólogos, o bien ajustar el sistema hemolítico anticarnero a la cantidad de hemolisina ya existente en el suero humano.

Ahora que se están haciendo grandes esfuerzos en el extranjero (particularmente los que están realizando en Filadelfia Kolmer y sus colaboradores) con el objeto de normalizar la reacción de Wassermann, nos ha parecido oportuno estudiar este punto, aunque sólo sea para tener una opinión fundada en la observación personal que cuando se sujeta a la disciplina científica, siempre enseña más de lo que se puede aprender en los libros.

En materia de reacción de Wassermann, existe un caos tal en la técnica, que muchas veces de un mismo suero examinado en distintos laboratorios, se comunican resultados discordantes, de lo cual se aprovechan los escépticos para enderezar sus críticas más agudas contra el método.

Owen y Martín (3) opinan que el juicio más acertado acerca del suero-diagnóstico de la sífilis, es el que ha emitido Wedder, quien dice: «Tengo la impresión que la de Wassermann debe ser una reacción del más sorprendente mérito para haber sobrevivido a toda la técnica chapucera que se ha perpetrado en su nombre».

SISTEMA HEMOLITICO ANTIHUMANO.—Tschernogubow no describe cómo obtuvo su amboceptor antihumano, ni dice cuál era su dosificación. Noguchi lo prepara inyectando conejos en la cavidad peritoneal 5 o 6 veces con dosis crecientes (hasta 20 cc.) de glóbulos humanos lavados, dejando intervalos de 5 días entre las inyecciones. El suero lo recoge 8 ó 9 días después de la última inyección. Deben lavarse bien los glóbulos porque la inyección al conejo de pequeñas cantidades de suero humano conduce a la formación de precipitinas que pueden perjudicar en la reacción.

Dice que el suero debe producir la hemolisis completa de un cc. de suspensión de sangre humana (un cuarto de gota) en presencia de 0.025 cc. de suero fresco de cuy, en dosis inferiores a 0.01 cc., y que cuando esto escribía estaba usando un suero cuya titulación era de 0.001 cc.

Craig (4) obtiene la sangre por punción venosa, lava los glóbulos con solución salina al 0.85% hasta que este líquido no de las reacciones de la albumina (para lo cual bastan generalmente cuatro lavados), añade cantidad suficiente de solución salina para hacer una emulsión fácil de inyectar, y con intervalos de 48 horas aplica en la vena marginal de la oreja del conejo, seis inyecciones de un cc. de eritrocitos lavados. Generalmente con estas inyecciones se obtiene un buen amboceptor; pero si no fuese así, entonces se pondrán dos o tres inyecciones más de la misma cantidad de glóbulos. Hace la dosificación de siete a nueve días después de la última inyección, y opina que con su método de inyecciones frecuentes, rara vez se mueren los conejos de anafilaxia, y se obtiene en poco tiempo un amboceptor suficientemente activo.

En una memoria que escribimos en colaboración con el Dr. Antonio Silva (entonces practicante del Laboratorio del Hospital Militar) (5) y que presentamos al VI Congreso Médico Nacional reunido en la ciudad de Toluca, decimos que el amboceptor que se obtuvo aplicando, con intervalos de cinco días, una serie de inyecciones intravenosas de glóbulos humanos, de $\frac{1}{2}$, 1, 1 y $\frac{1}{2}$ y 2 cc.

respectivamente, seguida después de ocho días de otras dos inyecciones, una de 4 cc. y otra de 5 cc. de glóbulos humanos también con cinco días de intervalo, y sangrando a los ocho días de la última inyección, fué más activo que el otro que se preparó aplicando diariamente una inyección intravenosa de glóbulos humanos puros, de 5 y 10 cc. respectivamente, poniendo ocho días después, tres inyecciones intraperitoneales, de los mismos glóbulos, en dosis de 15, 18 y 20 cc., con intervalos de tres días, y sangrando una semana después de la última dosis.

PROCEDIMIENTOS PARA PRIVAR LOS SUEROS DE HEMOLISINAS —

Para absorber con glóbulos de carnero la hemolisina natural anticarnero que contienen la mayor parte de los sueros humanos, varias técnicas se han recomendado, siendo la más usada la que consiste en poner el suero inactivado en contacto con los glóbulos durante una hora, a la temperatura de la pieza o del incubador, y separar después los glóbulos por centrifugación.

Simón (6) aconseja inactivar el suero humano calentando a 56 grados C. solamente 10 minutos, mezclar íntimamente 0.4 cc. de suero con 1.6 cc. de una suspensión de glóbulos lavados de carnero al 2.5%, calentar otros 10 minutos a una temperatura de 37 a 40 grados C. en baño maría y centrifugar. Se recordará que termina la operación cada cc. de líquido contiene 0.2 de suero.

Kolmer (7) ha adoptado este método, practicado la absorción a 38 grados C en baño maría. Los resultados por él obtenidos confirman los de Simón; pero también hace notar que en ocasiones el suero sometido a este procedimiento puede adquirir ligeras propiedades anticomplementarias.

En un artículo reciente Kanh (8) recomienda un método sencillo para eliminar el amboceptor natural del suero humano. Este método consiste en sacar los tubos del baño maría en donde han sufrido la inactivación usual; alinearlos en un porta-tubos, dejar caer una gota de glóbulos concentrados en todos los tubos que contengan aproximadamente un cc. de suero y agitar ligeramente. En los que contienen menos de un cc. de suero, una fracción de gota es depositada en el interior del tubo y este se inclina para que se haga la mezcla. Los glóbulos rojos que se emplean son los mismos que servirán para hacer la suspensión que se utilizará en las reacciones de Wassermann; pero en el último lavado la centrifugación se hace a razón de 1.600 revoluciones por minuto durante 14 minutos. La gota es puesta con una pipeta que vierta 25 o 30 gotas por cc. (1/25 o 1/30 de cc.) Luego se dejan transcurrir 10 minutos que se aprovechan para nivelar los tubos, se centrifuga durante seis u

ocho minutos, y los sueros decantados quedan listos para hacer las reacciones.

Desgraciadamente este método tan fácil, no es tan seguro como cree su autor. Nosotros estudiamos varios sueros por este procedimiento y pronto pudimos convencernos de que 10 minutos no bastaban en todos los casos para privar completamente de amboceptor al suero.

Primero era determinada la cantidad de amboceptor natural contenida en 0.2 cc. de suero humano, después eran sometidos los sueros a la técnica de Kahn y por último se comprobaba el resultado, poniendo en un tubo 0.2 cc. del suero correspondiente, dos unidades de complemento y 1 cc. de glóbulos al 5% en un volumen total de 5 cc., agitando y poniendo los tubos en baño maría a 37 grados C. media hora.

Como viéramos que de 6 sueros que se sometieron a la acción de los glóbulos durante 10 minutos, dos conservaron cierta cantidad de amboceptor natural, y que uno conservó todavía parte de su amboceptor, después de 20 minutos de exposición a los mismos glóbulos, resolvimos prolongar en lo sucesivo media hora el tiempo de la absorción. Aun así, hubo cinco sueros que conservaron algo menos de una unidad hemolítica, y para los estudios que emprendimos solo aprovechamos 100 sueros que quedaron completamente desprovistos de sus hemolisinas. Al aplicar el procedimiento de Kahn, procuramos que las cantidades fueran exactas. Se comprende que con las aproximaciones que permite el autor, tales como el fraccionamiento de las gotas de glóbulos concentrados cuando los tubos contienen menos de un c.c. de suero, y el uso de gotas de distinto tamaño ($1/25$ o $1/30$ de c.c.), la técnica es menos uniforme y los resultados menos precisos.

MÉTODOS QUE SE HAN RECOMENDADO PARA AJUSTAR EL SISTEMA HEMOLÍTICO A LA CANTIDAD DE HEMOLISINAS CONTENIDA EN EL SUERO QUE SE EXAMINA.—Distintos métodos se han descrito para compensar el efecto de la hemolisina natural anticarnero contenida en el suero humano.

Kaliski, en el segundo tiempo de la reacción no pone todo el sistema hemolítico, sino únicamente los glóbulos. Después de 10 minutos de incubación, examina los tubos testigos de los sueros. Si la hemólisis es total, deja que la reacción se efectue con el amboceptor natural solamente, y si la hemólisis es parcial o nula, introduce el amboceptor artificial. Kolmer hace notar sin embargo, que en cinco por ciento de los casos que estudió, no obstante haber puesto las dos unidades de amboceptor, porque la hemólisis era insuficiente, los resultados no fueron satisfactorios, debido a que la disolución de

los glóbulos no fué completa en los tubos testigos de los sueros. No se podía invocar en este caso una acción anticomplementaria, porque repetidas las reacciones, sin otra variación que añadir simultáneamente el amboceptor y los glóbulos, la hemolisis fué completa en los tubos testigos.

Con el objeto de remediar estos inconvenientes, Kolmer propone que al hacer la reacción de Wassermann se agregue un tubo adicional con 0.2 c.c. de suero, complemento y glóbulos. Al terminar la primera incubación, si la hemolisis es completa en este tubo, no se añade amboceptor; pero si la hemolisis es parcial, se ponen entonces las dos unidades usuales de hemolisina.

Se comprende sin dificultad que los resultados del método de Kaliski son más precisos que los de la reacción de Wassermann, sin ser completamente exactos, porque entre esos sueros que no reciben amboceptor, unos tendrán dos unidades, otros cinco, otros veinte, etc., y la diferencia con la reacción de Wassermann en estos casos estriba solamente en que se suprimen dos unidades de amboceptor: las que se añaden habitualmente con los glóbulos en el segundo tiempo de la reacción. De manera que en los ejemplos citados anteriormente, las reacciones de Kaliski se harán con dos, cinco o veinte unidades de amboceptor, y las de Wassermann con cuatro, siete y veintidos unidades.

Seelman (9) propuso un método sencillo para dosificar el amboceptor anticarnero contenido en el suero humano y hacer la corrección correspondiente al practicar la reacción de Wassermann.

Parte del principio de que en los tubos que contienen la misma cantidad de amboceptor, se produce la hemolisis en el mismo tiempo y aprovecha los tubos de una dosificación de amboceptor, en los cuales se ponen cantidades conocidas de hemolisina, para calcular las cantidades desconocidas de hemolisina anticarnero que contiene el suero humano.

Sus reacciones las hace con la cuarta parte de las cantidades que se recomiendan para el Wassermann, y dispone su dosificación de amboceptor en una serie de siete tubos los cuales reciben 0.25 c.c. de suero de cuy diluido al décimo 0.25 c.c. de suspensión de glóbulos de carnero al 5%, y dosis crecientes de amboceptor, diluido de tal manera, que dos unidades estén contenidas en 0.14 c.c.

Estas dosis de amboceptor diluido son: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.13 y 0.14 c.c. respectivamente. Al mismo tiempo se dispone por cada suero que se examina un tubo que contiene 0.05 c.c. de dicho suero, 0.25 c.c. de complemento diluido al décimo y 0.25 c.c. de suspensión de glóbulos de carnero al 5%. Pone los tubos en baño maría a 37.5 grados C. media hora y cuando la hemolisis es de 75% en el tubo que contiene 0.14 c.c. de amboceptor, se agita este

tubo y se compara con los tubos de la otra serie, que como ya dijimos contienen los sueros. Todos aquellos tubos de esta serie que presenten el mismo grado de hemolisis, contendrán 0.14 c.c. de amboceptor.

Si el complemento es medianamente activo la hemolisis es completa en este en 10 a 12 minutos.

La misma operación se hace con los tubos que contienen 0.12, 0.1 y 0.8 de amboceptor, cuando en cada uno de ellos la hemolisis sea de 75%, y los tubos de la segunda serie que concuerden con ellos, contendrán respectivamente: 0.12, 0.1 y 0.8 de amboceptor. Si no hay una correspondencia absoluta entre las dos series, y por ejemplo, el grado de hemolisis de un tubo de los que contienen los sueros, está comprendido entre los tubos de la dosificación de amboceptor, que contienen 0.06 y 0.08 de hemolisina, entonces se dirá que el suero humano examinado contiene 0.07 de amboceptor.

Al practicarse la reacción de Wassermann los sueros que contienen 0.14 c.c. de amboceptor natural (dos unidades) no reciben amboceptor artificial. Los que contienen: 0.12, 0.1, 0.08, 0.06, 0.04 y 0.02 c.c. de amboceptor natural, reciben respectivamente: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 y 0.12 c.c. de amboceptor artificial; y los que contienen menos de 0.02 c.c. de amboceptor natural, reciben la dosis completa de amboceptor artificial (dos unidades).

Nosotros hemos hecho algunos ensayos con el procedimiento de Seelman; pero como la técnica que seguimos para la reacción de Wassermann, difiere en cuanto a las cantidades, de la que él sigue en su laboratorio, tuvimos necesidad de hacer una adaptación.

La dosificación del amboceptor la dispusimos conforme al siguiente cuadro:

| | CANTIDADES EXPRESADAS EN C. C. | | | | | |
|-------------------------------------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|------|
| Solución salina al 8 x 1000 | 3. | 3.1 | 3.2 | 3.3 | 3.4 | 3.45 |
| Amboceptor anticarnero diluido al 1 x 200 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.05 |
| Complemento diluido al 1/10 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Suspensión al 5% de glóbulos de carnero | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. |

En frente de esta serie, y en el mismo porta-tubos, colocamos por cada suero que se iba a dosificar, un tubo adicional con 3.3 c.c. de solución salina al 8 x 1000, 0.2 c.c. de suero del paciente, 0.5 c.c. de complemento y 1 c.c. de la suspensión de glóbulos.

Las comparaciones se hacían exactamente como describe Seelman, solamente que el primer tubo de nuestra dosificación contenía dos unidades y media de amboceptor, y el sexto tubo, un cuarto de unidad de amboceptor.

El procedimiento efectivamente es muy sencillo, pero requiere una vigilancia cuidadosa. Hay que estar comparando los tubos constantemente para ver en cuales se hace la hemolisis simultaneamente, y cuando son varios sueros los que se están dosificando, es preferible tener otra persona para que vaya anotando los resultados. Además el baño maría se hace indispensable para que los tubos que se sacan a cada instante, se pongan inmediatamente en equilibrio de temperatura, cosa que no sería posible en el incubador.

Téngase también presente que este procedimiento solo permite ajustar el sistema hemolítico cuando los sueros humanos tienen como máximo dos unidades de amboceptor, si se emplea la técnica original del autor, y dos unidades y media, si se aplica la adaptación que hemos hecho; pero cuando la cantidad de amboceptor natural es mayor, no queda otro recurso que eliminarlo. Seelman así lo reconoce, y por esto dice que no es raro encontrar sueros que produzcan la hemolisis con mayor rapidez que en el tubo que contiene 0.14 cc. de amboceptor (dos unidades) y que si la diferencia es ligera no se le da importancia; pero si es mayor, se practica la absorción del amboceptor natural, y se añaden las dos unidades usuales de amboceptor artificial.

Kolmer y Rule en su artículo ya citado, dicen haber obtenido excelentes resultados ajustando el sistema hemolítico anticarnero conforme a la técnica siguiente:

Por cada suero que se examina disponen 10 tubos, depositando en cada uno de ellos 0.1 cc. del suero inactivado. En el noveno tubo que va a servirles como tubo de reacción, añaden además antígeno.

Diluyen entonces el amboceptor hemolítico de tal manera que la unidad esté contenida en 0.5 cc. de esa dilución, cuando es dosificada con un cc. de complemento al 1 por 20 y un cc. de suspensión de glóbulos al 2.5%. De la dilución anterior ponen 0.1 en el primer tubo, 0.2 en el segundo, 0.3 en el tercero, 0.4 en el cuarto, 0.5 en el quinto, 0.6 en el sexto y 0.7 en el séptimo. Luego añaden en cada uno de los tubos un cc. de complemento al 1 por 20, y en los ocho primeros tubos solamente, por ser los de la dosificación del amboceptor, un cc. de glóbulos al 2.5%. Después de una hora de incubación en baño maría, se conoce cual es el tubo que contiene la unidad de hemolisina, y entonces agregan dos unidades de amboceptor natural y un cc. de glóbulos al noveno tubo, que es el de la reacción y al décimo tubo que es el testigo del suero que se examina. Si el último tubo donde se hizo la hemolisis es el tercero, entonces como este tubo contiene 0.3 cc. de amboceptor artificial, que unido al amboceptor natural contenido en 0.1 cc. de suero del enfermo, forma la unidad de amboceptor, pondremos en el noveno

tubo, que es el de la reacción y en el décimo, que es el testigo, o.8 de la dilución de amboceptor artificial, para que en combinación con el amboceptor natural se ajusten las dos unidades.

Cuando la hemolisis es completa en el 8º tubo que no tiene amboceptor artificial, esto indica que el suero examinado contiene suficiente cantidad de hemolisinas naturales para hacer la reacción.

El tubo testigo de antígeno que es uno sólo, cualquiera que sea el número de sueros que se examinan, recibe también dos unidades de hemolisina y un cc. de glóbulos, de manera que si la dilución de amboceptor es tal que la unidad esté en $\frac{1}{2}$ cc. este tubo recibirá un cc. de dicha dilución.

Otra ventaja que encuentran los autores a su procedimiento para ajustar el sistema hemolítico a la hemolisina natural de cada suero, es que como la unidad hemolítica se determina en presencia del suero humano, no hay que preocuparse por el poder anticomplementario que pudiera tener el mismo suero, porque de hecho queda contrarrestado.

Este método da resultados uniformes cuando los sueros contienen menos de una unidad hemolisina natural en 0.1 cc.; pero no cuando encierran mayor cantidad. En efecto, cuando la hemolisis es completa en el 8º tubo, se considera que 0.1 cc. del suero examinado contiene hemolisinas naturales en cantidad suficiente para hacer la reacción, sin preocuparse por el número de unidades hemolíticas que pueda contener. Los sueros que encierren dos unidades de hemolisinas naturales, sí tendrán la cantidad suficiente; pero los que contengan más de dos unidades, aportan un exceso de amboceptor que seguramente será perjudicial.

No deja de tener sus analogías este procedimiento con el que propuso Ronchése (10) para la dosificación de la hemolisina natural anticarnero en los sueros frescos, cuando la cantidad es inferior a una dosis, y que está fundado en el mismo principio que los métodos *por resta* usados en química analítica. Ronchése se propone buscar la fracción de dosis de hemolisina natural contenida en 0.1 cc. de suero humano fresco, y Kolmer trata de determinar cual es la combinación de las dos hemolisinas, natural y artificial, necesaria para ajustar la unidad hemolítica.

El método de Kolmer, tiene en mi concepto otro inconveniente para ser adoptado en el trabajo diario: tener que añadir ocho tubos más por cada suero que se examina, lo cual consume mucho tiempo y material.

RESULTADOS QUE OBTUVIMOS PRIVANDO LOS SUEROS DE SU AMBOCEPTOR NATURAL. En cien casos hicimos la reacción de Wassermann antes y después de absorber la hemolisina natural anticar-

nero contenida en el suero humano. Como ya dijimos la absorción fué practicada conforme a la técnica de Kahn; pero prolongando media hora el contacto con los glóbulos y poniendo en todos los casos una gota de glóbulos concentrados (1/25 de cc) por cc. de suero.

Solo repetimos las reacciones con aquellos sueros que perdieron completamente su amboceptor y los resultados obtenidos son los que consignamos a continuación:

Influencia de la absorción del amboceptor natural anticarnero sobre los resultados de la reacción de Wassermann.

| Num de orden | Unidades de amboceptor anticarnero contenidas en 0.2 c.c. de suero calentado a 56° C. 1/2 h. | RESULTADO DE LA REACCION | |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| | | Antes de absorción. | Después de absorción. |
| 1 | Dos y media unidades. | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |
| 2 | Menos de una unidad. | Negativa. | Negativa. |
| 3 | Cinco unidades. | " | " |
| 4 | Menos de una unidad. | " | " |
| 5 | " " " " | " | " |
| 6 | Una unidad. | " | " |
| 7 | Diez unidades. | " | " |
| 8 | Dos unidades. | " | " |
| 9 | Menos de una unidad. | " | " |
| 10 | Tres y media unidades. | " | " |
| 11 | Cinco unidades. | " | " |
| 12 | Tres unidades. | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |
| 13 | Menos de una unidad. | " | " |
| 14 | " " " " | Negativa. | Negativa. |
| 15 | " " " " | " | " |
| 16 | " " " " | " | " |
| 17 | " " " " | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |
| 18 | " " " " | Negativa. | Negativa. |
| 19 | " " " " | " | " |
| 20 | " " " " | " | " |
| 21 | Diez unidades. | " | " |
| 22 | Una unidad. | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |
| 23 | Dos y media unidades. | Negativa. | Negativa. |
| 24 | " " " " | " | " |
| 25 | Menos de una unidad. | " | " |
| 26 | Cinco unidades. | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |
| 27 | Tres unidades. | Negativa. (1) | Debilmente positiva. |
| 28 | Treinta unidades. | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |

(1) El suero era de un sífilítico en tratamiento.

Consultando estas tablas se advierte que de los cien casos estudiados la absorción sólo fué útil en tres (sueros nos. 27, 58 y 98.)

Los sueros 27 y 58 cuyas reacciones negativas, se volvieron

Influencia de la absorción del amboceptor natural anticarnero sobre los resultados de la reacción de Wassermann.

| Núm. de orden | Unidades de amboceptor anticarnero contenidas en 0.2 c.c. de suero calentado a 56° C. 1/2 h. | RESULTADO DE LA REACCIÓN | |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| | | Antes de absorción. | Después de absorción. |
| 29 | Una unidad. | Negativa. | Negativa. |
| 30 | Veinte unidades. | " | " |
| 31 | Tres unidades. | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |
| 32 | Sin amboceptor. | | |
| 33 | Menos de una unidad. | Negativa. | Negativa. |
| 34 | Dos y media unidades. | " | " |
| 35 | Menos de una unidad. | " | " |
| 36 | Dos unidades. | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |
| 37 | Cinco unidades. | Negativa. | Negativa. |
| 38 | Dos y media unidades. | " | " |
| 39 | Menos de una unidad. | " | " |
| 40 | " " " " | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |
| 41 | Tres y media unidades. | " " " | " " " |
| 42 | Una unidad. | Negativa. | Negativa. |
| 43 | Menos de una unidad. | " | " |
| 44 | " " " " | " | " |
| 45 | Tres y media unidades | " | " |
| 46 | " " " " | " | " |
| 47 | Cinco unidades. | " | " |
| 48 | Menos de una unidad. | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |
| 49 | " " " " | " " | " " |
| 50 | " " " " | " " | " " |
| 51 | Una unidad. | Negativa. | Negativa. |
| 52 | Cuatro unidades. | " (2) | " |
| 53 | " " | " | " |
| 54 | Menos de una unidad. | " | " |
| 55 | " " " " | " | " |
| 56 | Cinco unidades. | " | " |
| 57 | Una unidad. | " | " |
| 58 | Cinco unidades. | " (3) | Debilmente positiva. |

(2) Sífilítico antiguo. Reacción de Jacobsthal Intensamente positiva.

(3) Reacción de Ronchese Intensamente positiva.

débilmente positivas, procedían de individuos sífilíticos como pudo demostrarse por la clínica y los otros métodos de suero diagnóstico.

En el caso No. 70 la absorción fué perjudicial porque el suero adquirió poder anticomplementario.

En las observaciones 52 y 94, los sueros también procedían de sujetos sífilíticos y sus reacciones de Wassermann negativas no se volvieron positivas, aunque se eliminaron cuatro unidades de amboceptor en el primer caso y diez en el segundo. El número 52 dió la reacción de Jacobsthal intensamente positiva y el número 94 dió esta reacción y la de Hetch intensamente positiva.

Influencia de la absorción del amboceptor natural anticarnero sobre los resultados de la reacción de Wassermann.

| Núm. de orden | Unidades de amboceptor anticarnero contenidas en 0.2 c.c. de suero calentado a 56° C. 1/2 h. | RESULTADO DE LA REACCION | |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| | | Antes de absorción. | Después de absorción. |
| 59 | Una utilidad. | Negativa. | Negativa. |
| 60 | Cinco unidades. | " | " |
| 61 | Menos de una unidad. | " | " |
| 62 | Dos unidades. | " | " |
| 63 | " | " | " |
| 64 | Menos de una unidad. | " | " |
| 65 | Cinco unidades. | Debilitante positiva. | Debilmente positiva. |
| 66 | Sin amboceptor. | Intensamente positiva. | Intensamente positivo. |
| 67 | Diez unidades. | Negativa. | Negativa. |
| 68 | Menos de una unidad. | " | " |
| 69 | Una unidad. | " | " |
| 70 | Diez unidades. | Positiva de mediana intensidad. | Adquirió poder anticomplementaria. |
| 71 | Una unidad. | Negativa. | Negativa. |
| 72 | Sin amboceptor. | " | " |
| 73 | Tres y media unidades. | Negativa. | Negativa. |
| 74 | Una unidad. | " | " |
| 75 | Dos unidades. | " | " |
| 76 | Cuatro unidades. | " | " |
| 77 | Tres y media unidades. | " | " |
| 78 | Sin amboceptor. | " | " |
| 79 | Cinco unidades. | Negativa. | Negativa. |
| 80 | " | " | " |
| 81 | Menos de una unidad. | " | " |
| 82 | Cinco unidades. | " | " |
| 83 | Diez unidades. | " | " |
| 84 | Cinco unidades. | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |
| 85 | Diez unidades. | Negativa. | Negativa. |
| 86 | Cinco unidades. | " | " |
| 87 | Cinco unidades. | Positiva de mediana intensidad. | Positiva de mediana intensidad. |
| 88 | Veinte unidades. | " " " " | " " " " |
| 89 | Cinco unidades. | Negativa. | Negativa. |
| 90 | Seis y media unidades. | " | " |

En resumen solo se consiguió con la absorción del amboceptor que sueros sífilíticos que daban reacciones negativas las dieran debilmente positivas, y que uno, que la daba debilmente positiva, la diese intensamente positiva. Si nos hubiéramos conformado con hacer solamente este método, no hubiéramos diagnosticado los dos casos de sífilis de las observaciones 54 y 94.

DISCUSION.—Dos son los puntos que necesitamos precisar:

1º—¿Es verdaderamente útil eliminar el amboceptor natural anticarnero?

Influencia de la absorción del amboceptor natural anticarnero sobre los resultados de la Reacción de Wassermann.

| Mím. de orden | Unidades de amboceptor anticarnero contenidas en 0.2 c.c. de suero calentado a 56° C. 1/2 h. | RESULTADO DE LA REACION | |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | Después de absorción. | Antes de la absorción. |
| 91 | Dos y media unidades. | Negativa. | Negativa. |
| 92 | Seis y media unidades. | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |
| 93 | Una unidad. | Debilmente positiva. | Debilmente positiva. |
| 94 | Diez unidades. | Negativa. (4) | Negativa. |
| 95 | Menos de una unidad. | " | " |
| 96 | " " " " | " | " |
| 97 | Veinte unidades. | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |
| 98 | " " " " | Debilmente positiva. | " " |
| 99 | Menos de una unidad. | Negativa. | Negativa. |
| 100 | Una unidad. | Intensamente positiva. | Intensamente positiva. |

(4) Reacciones de Hech y Jacobsthal intensamente positivas.

2º—¿Qué procedimiento debe adoptarse para suprimir su influencia en caso de ser nocivo?

Para Noguchi, como ya dijimos, el amboceptor natural es una causa de error en la reacción de Wassermann: 4 unidades de amboceptor natural impiden que se revele una unidad de anticuerpo sífilítico.

Rossi (11) en 60 casos de sífilis obtuvo 50 reacciones positivas antes de eliminar el amboceptor y 56 después de eliminado.

Jacobæus (12) en 257 casos obtiene 10% más de reacciones positivas después de privar los sueros de amboceptor con glóbulos de carnero.

Olmstead (13) haciendo la absorción por el método de Rossi en 47 sueros que habían dado reacciones negativas, logra 5 reacciones positivas en individuos sífilíticos o que probablemente lo eran.

Ottemberg (14) habiendo estudiado 144 sueros que dieron reacción negativa y que contenían un exceso considerable de amboceptor natural, consiguió que 36 la dieran positiva después de la absorción, y todos ellos procedían de personas en las cuales había motivos para sospechar la existencia de la sífilis.

Rubinstein (15) examinó 64 sueros paralelamente por el método de Rossi y por el de Wassermann y encontró que en 7 casos la reacción débil o dudosa por el método habitual, se volvía francamente positiva después de «deseñsibilización».

El mismo Rubinstein (16) estudió 400 sueros por la técnica de Wassermann y por un procedimiento suyo, que consiste esencialmente en mezclar 2 c.c. de suero calentado con 1 c.c. de glóbulos bien lavados de carnero, dejar en el refrigerador 20 minutos, centri-

fugar, de cantar y hacer la reacción con dosis crecientes de alexina, de tal manera que si el suero dessensibilizado es anticomplementario para una dosis de alexina, queden tubos con dosis superiores que no impidan la hemolisis. De los sueros examinados, 21 que daban reacción de Wassermann muy débil o gadosa, la dieron muy franca por el método indicado, y también dieron reacción de Hecht positiva. Cita el caso de un suero que en presencia de antígeno fijó 0.03 c.c. de alexina (reacción límite-negativa) y después de dessembilización fijó en las mismas condiciones 1 c.c. de alexina al uno por diez —0.1 c.c. de alexina pura (reacción fuertemente positiva).

Kolmer analizó 110 sueros, antes y después de absorción del amboceptor por el método de Simon. En tres por ciento de los casos obtuvo reacciones debilmente positivas con sueros que daban reacciones negativas antes de absorción, y en 35%, las reacciones fueron mas intensas después de suprimir el amboceptor natural. Estos resultados fueron obtenidos cuando se apreciaba la reacción inmediatamente después del segundo período de incubación; pero dejando los tubos toda la noche en el refrigerador, dos sueros más que pertenecían a sifilíticos en tratamiento, dieron reacción negativa antes de absorción y debilmente positiva después de perder su amboceptor natural. Este autor estima que cuando menos tres o cinco por ciento de los sueros que contienen pequeña cantidad de anticuerpos sifilíticos, pueden dar reacciones negativas falsas debido a la presencia del amboceptor natural, particularmente si se dejan los tubos en refrigerador toda la noche.

Kolmer también publica los resultados obtenidos con dosis variables de suero (0.2, 0.02 y 0.002 c.c.) antes y después de absorción, y concluye que las diferencias no se observan con sueros fuertemente positivos a la dosis de 0.2 c.c. sino más bien con sueros debilmente positivos que contienen muchas hemolisinas, o con sueros que aunque reaccionando fuertemente contienen grandes cantidades de hemolisinas y son usados en dosis pequeñas.

Nuestras observaciones también demuestran que la eliminación del amboceptor es útil, ya para hacer apreciable la reacción en sifilíticos que no la daban (dos casos en cien) ya para hacer más intenso el resultado (uno en cien).

Como se ve parece que muchos investigadores están de acuerdo para admitir que suprimiendo el amboceptor natural se obtienen resultados más precisos. El mismo Van Saun (17), que considera como un factor despreciable en la reacción de Wasserman el amboceptor natural, aconseja suprimirlo al hacer la fijación del complemento para gonococos, cuando los sueros contienen mucho.

Resuelto este primer punto, hay que definir ahora cual es el mejor medio para evitar esta causa de error.

El uso del sistema antihumano, recomendado por Tschernogubow y Noguchi, y aceptada por Emery (18), Thompson (19), Butler y Landon (20), Myer (21), Bronfsenbrenner y Schlesinger (22) y Ronchese (23), deja sin acción el amboceptor natural anticarnero; pero no se ha generalizado porque es más difícil inmunizar conejos con glóbulos humanos que con glóbulos de carnero y las isohemolisinas e isoaglutininas pueden perturbar su acción. Sin embargo, si se llega a encontrar un procedimiento para obtener sueros de índice elevado, entonces será el sistema de elección, porque ofrece además la ventaja de poder utilizar los glóbulos de la sangre que se examina.

Los procedimientos para ajustar el sistema hemolítico al amboceptor natural no son de recomendarse porque solo son aplicables cuando los sueros contienen a lo sumo dos unidades o dos unidades y media de amboceptor, y estas cantidades generalmente no son perjudiciales.

El método que consiste en absorber el amboceptor natural con glóbulos de carnero fué imaginado por Bauer (24); pero este investigador tuvo que abandonarlo porque los sueros a veces contenían propiedades anticomplementarias. Es decir, que un suero inactivado, puesto en contacto con los glóbulos, pierde su amboceptor, y añadido al sistema hemolítico activo para esos mismos glóbulos, estorba la hemolisis (fenómeno de Sachs-Friedberger).

Rossi, con el objeto de remediar este inconveniente, recomienda que la absorción se haga a 0 grados; pero este procedimiento no puede adoptarse para uso diario por ser muy complicado.

Kahn dice que con su procedimiento los sueros no adquieren poder anticomplementario; pero ya vimos que para que sea eficaz este procedimiento hay que prolongar el contacto con los glóbulos media hora, y en estas condiciones, un suero de los 100 que examinamos, (el número 70) se volvió anticomplementario.

Simon no dice si con su técnica los sueros se vuelven anticomplementarios; pero Kolmer que ha experimentado el procedimiento refiere que en ocasiones los sueros adquieren ligeramente esta propiedad.

En nuestro concepto primero que nada debe reducirse al mínimo la influencia del amboceptor natural, haciendo las reacciones con 2 c.c. de suero humano y leyendo los resultados al terminar la segunda incubación. Por otra parte es muy fácil poner un tubo adicional con suero inactivado, complemento y glóbulos, y reconocer, por la gran rapidez con que se hace la hemolisis en este tubo, cuales son los sueros que contienen mucho amboceptor, para privarlos de él. El método que recomendamos para hacer la absorción es el de Kahn; pero con la modificación ya señalada, es decir prolongando

el contacto con los glóbulos media hora. Si el suero llegase a adquirir propiedades anticomplementarias (lo cual aconteció solo una vez en los 100 sueros que examinamos) entonces siguiendo el consejo de Kolmer, se calentará en baño maría a 56 grados C. 10 minutos para destruir las substancias anticomplementarias termolábiles.

No recomendamos para la absorción el método de Simon tan elogiado por Kolmer, porque hemos visto varias veces que hay sueros que no quedan privados de amboceptor después de un contacto de 10 minutos en baño maría a 38 grados.

El resultado de la absorción no depende únicamente de la cantidad de amboceptor, porque hemos visto sueros que pierden hasta 20 unidades y otros que sometidos a la misma técnica, no quedaron completamente privados de amboceptor, por mas que solo contenían 5 unidades. Entre nuestras observaciones figuran 3 sueros que contenían 5 unidades de amboceptor, y que después de haber sido tratados por los glóbulos de carnero durante media hora, dos perdieron completamente su hemolisina natural, mientras que el otro conservó aproximadamente media unidad de amboceptor.

Es casi seguro que no todas las hemolisinas tienen las mismas afinidades por los glóbulos homólogos.

Además de los métodos de «dessensibilización» conviene siempre hacer las reacciones con suero fresco y la fijación del complemento en frío. Recordemos en efecto, que el suero número 52 después de perder cuatro unidades de amboceptor, siguió dando la reacción de Wassermann negativa, mientras que dió la reacción de Jacobsthal intensamente positiva, no obstante que fué practicada antes de privar al suero de amboceptor. Por otra parte el número 94 que contenía diez unidades de amboceptor, dió las reacciones de Hecht y de Jacobsthal intensamente positivas y la de Wassermann negativa, y a pesar de haberle quitado estas diez unidades de amboceptor natural, siguió dando la reacción de Wassermann negativa.

CONCLUSIONES

1^a—De los 100 casos estudiados, la absorción del amboceptor natural anticarnero fué util en 3.

2^a—Sólo un suero adquirió poder anticomplementario.

3^a—Para obtener mejores resultados fué necesario practicar la absorción durante media hora a la temperatura del laboratorio.

4^a—Probablemente el resultado de la absorción no depende solamente de la cantidad de amboceptor, sino también de sus afinidades por los glóbulos.

5^a—En algunos casos de sífilis la reacción de Hecht y la de Jacobsthal son más sensibles que la reacción practicada después de la absorción de hemolisinas.

V. Cervera

BIBLIOGRAFIA

- (1) Noguchi. Jour. Exper. Med. 1909, XI, 392.
- (2) Tschernogubow: Berl. Klin. Woch, 1908, XIV. 2107.
- (3) Owen and Martin. Jour. Lab. and Clin. Med. 1920, Vol. V, 252.
- (4) Craig: The Wassermann Test. 1918.
- (5) Cervera y Silva: Rev. de C. Med. de la Esc. Med. Mil. 1920, T. II, 6.
- (6) Simón; Jour. Am. Med. Assn. 1917, XXII, 1935-1537.
- (6) Kolmer John A. and Rule Anna: Am. Jour. of Syph. Vol. IV, 1920 135.
- (8) Kahn: Jour. Lab, and Clin. Med. 1911, Vol. VI, 215.
- (9) Seelman: Jour. Lab. and Clin. Med. 1918, Vol III, 626.
- (10) Ronchése: Reaction Bordet-Wassermann, 1919, 80
- (11) Rossi: Ztsch. f. Immunitätsf. orig., 1911, X 321.
- (12) Jacobaeus: Ztsch. f. Immunitätsf orig., 1911, VIII, 515-625.
- (13) Olmstead: Med. Rec., N. Y., 1914, XXXV, 341.
- (14) Ottenberg: Arch. Int. Med. 1917, XIX, 457-492.
- (15) Rubinstein: Zeit. f. Immun. 1913, Vol. 19.
- (16) Rubinstein: Traité pratique de Serologie, 1921, 195-196.
- (17) Van Saum; Jour. Lab. and Clin. Med., 1916, III, 59 60.
- (18) Emery: Clinical bacteriology, and hematology, 1912.
- (19) Thompson: Arc. Med., 1913, XI, 512.
- (20) Butler and Landon. U. S. Nav. Med. Bull., 1916, X. 1.
- (21) Myer: U. S. Nav. Med. Bull, 1917, XI, 175.
- (22) Bronfrenbrenner y Schlesinger: Am. Jour. of Syph., 1917 1406.
- (23) Ronchése: C. R. Soc. Biol., 10 novembre 1917.
- (24) Bauer: Ber. Klin. Wochen, 1908, No. 17.