

***Técnicas inmunológicas básicas realizadas en el laboratorio de seroinmunología de la clínica reumatológica "Centro-Viggo Petersen" del hospital de Lariboisiere. París.***

Por el Dr. FRANCISCO GARCÍA BERTRAND(\*)

Consideramos importante para el desarrollo inmunológico de la reumatología en Cuba la divulgación de algunas de estas técnicas y ponernos a la disposición de cualquier compañero que tenga interés en las mismas. Se señala la procedencia de los reactivos ya que esto pudiera quizás constituir una referencia útil.

**BUSQUEDA DEL FACTOR REUMATOIDEO:**

- a) *Reacción modificada de Waaler Rose:*  
I) *Reactivos:*

Glóbulos rojos humanos O RH (—) de preferencia. Es posible utilizar glóbulos rojos humanos O RH (+) del Instituto Pasteur.

Hemaglutinina liofilizada del Instituto Pasteur en ampulas de 1 ml. diluida en los volúmenes indicados.

Suero fisiológico como tampón.

Suero del enfermo descomplementado a 56°C durante 30 minutos.

Preparación de los glóbulos rojos sensibilizados al 1%.

Lavar los glóbulos rojos por lo menos tres veces (en suero fisiológico-centrifugar 5 minutos a 2 500).

Ejemplo:

0. 4 ml. del "asiento globular" lavado + 19.6 de solución de ClNa al 9% = 20 ml. al 2%.

Frasco No. 1 de glóbulos rojos sensibilizados:

15 ml. al 2% + 15 ml. de hemaglutinina = 30 ml. de G. R. sensibilizados.

Frasco No. 2 de glóbulos rojos no sensibilizados:

5 ml. restantes + 5 ml. de solución de ClNa al 9% = 10 ml. de G. R. no sensibilizados.

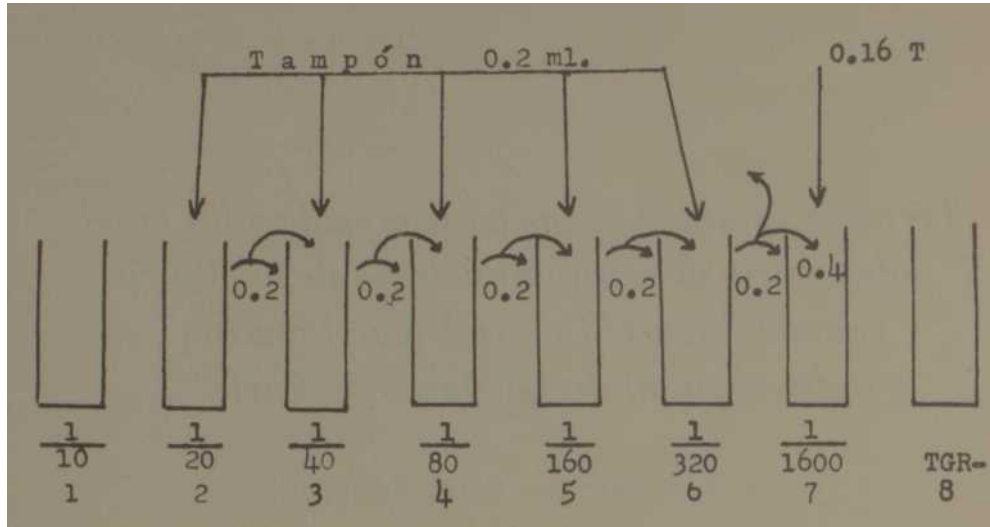
1/2 hora a baño María a 37°C.

II) *Reacción de hemaglutinación:*

Suero al 1/10.

Con una pipeta de 0.2 ml echar 0.2 ml de suero diluido al 1/10 en los tubos 1.8 luego 2 y dejar la pipeta para finalizar

(\*) Instructor de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de La Habana. Jefe del Servicio de Medicina Interna del Hospital "Enrique Cabrera", Altabana, Cuba



las diluciones. Cuando se llega al tubo 7 sólo se echa 0.04 ml de la dilución del tubo 6 al tubo 7, después se bota el resto (de acuerdo con el esquema se pasa de la dilución al 1/320 a la dilución al 1/1600). En el tubo 8 se añade 0.2 ml de G. R. sensibilizados y 0.2 ml de G. R. sensibilizados en los otros 7 tubos.

Colocar los tubos al baño de María a 37°C durante una hora, dejarlos una noche al refrigerador. Leerlos después de dejarlos 30 minutos a la temperatura del laboratorio.

Resultados: La más fuerte dilución del suero dando aglutinados visibles. Es mejor mirar al espejo cóncavo de Kahn. Para la lectura mover los tubos hasta que no haya sedimento (todo teñido).

*Negativo:* si el resultado < 1/20 *Positivo:*  
si el resultado = 0 > 1/20

b) *Test del Látex Gainmaglobulina en tubos:*

Extracción sin anticoagulante en un paciente en ayunas recoger el suero por centrifugación. Descomplementar ese suero a 56°C durante 30 minutos.

I) Reactivos:

a) Tampón.

CINa..... 7.5 g  
Glicocola ..... 10.0 g  
Agua Dest. q.s.p..... 1 000 ml  
Añadir NaOH (N) .. 2.5 ml

b) Partículas de Látex Lab. Osi- Difco-Pasteur.

c) Gainmaglobulina al 1%.

Para 100 ml:

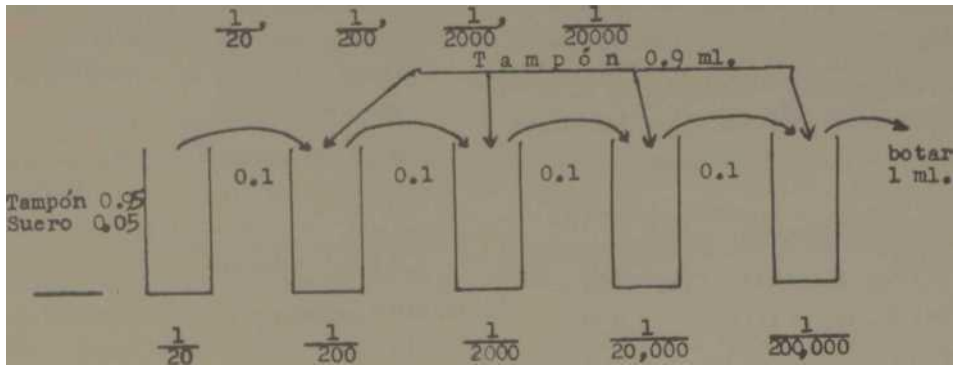
Látex ..... 1 ml  
Gainmaglobulina al 1% ..... 5 ml  
Tampón q.s.p ..... 100 ml

Llevar al baño de María a 37°C para sensibilizar.

*Nota:* El Instituto Pasteur tiene en el mercado, en un solo producto, todos los reactivos necesarios (látex-globulina-glicocola).

II) *Diluciones del suero-reacción (pipetas de 0.1 ml)*

En una primera fase se hacen diluciones al



El volumen en cada tubo debe ser de 0.9 ml.

Agregar una cantidad igual de solución de Látex-Globulina.

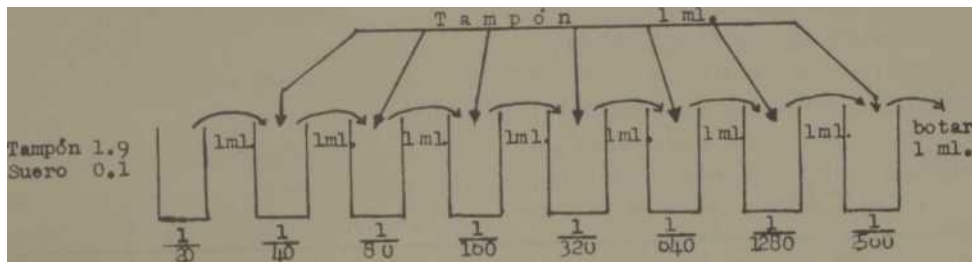
Llevar al baño de María a 56 C durante 1 hora y 30 minutos.

Retirar y dejar una noche a 40°C.

Centrifugar 5 minutos (3 500) al frío de preferencia.

*Resultado:* La reacción es negativa en ausencia de aglutinación. Si el primer tubo es positivo, la positividad se sitúa entre 1/20 y 1/200. Si el segundo tubo es positivo ésta se sitúa entre 1/200 y 1/2 000, etc.

En el caso de positividad en el primer tubo se deben realizar diluciones más precisas de dos en dos pero con 8 tubos (hasta 1/2 560).



El volumen en cada tubo es de 7 ml. se agrega 1 ml de Látex Gammaglobulina sensibilizada. Después el mismo proceso que con la reacción a 5 tubos.

*Interpretación:* El test al Látex Gammaglobulina es considerado como positivo si es superior al 1/80.

#### TITULO DE ANTIESTREPTOLISINA DEL SUERO

Los estreptococos del grupo A producen dos estreptolisinas designadas por las letras S y O. La estreptolisina O sola es antigénica y es la antiestreptolisina O la que se precisa en el suero de pacientes.

Técnica inspirada en la de *Todd y KtUbak*. La reacción consiste en comparar el poder antiestreptolítico del suero a dosificar al de un suero ya dosificado.  
*Preparaciones pre'limin ares:*

1. *Solución tampón:*

PO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> H. 2H<sub>2</sub>O ..... 1.007 g.  
 PO<sub>4</sub>Na H<sub>2</sub>. IL.O ..... 0.39 g.  
 ClNa ..... 8.5 g.  
 Agua hidestilada q. s. p.  
 para 1 litro. (pH a 7.2)

2. *Solución de Clorhidrato de Cisterna:*

Clorhidrato de Cisterna .. Og.060  
 Solución tampón ..... 2 cm<sup>3</sup>

3. *Suspensión de glóbulos rojos humanos.*

La sangre es extraída con citrato. Los glóbulos rojos son lavados tres veces en la solución tampón y el asiento de centrifugación es puesto en suspensión en el tampón a razón de 2.25 de glóbulos por ciento (0.45 G. R. 20 mi.).

4. El suero patrón es diluido en el tampón de manera que la dilución contenga 1 Unidad de antiestreptolisina por cm<sup>3</sup>.  
 1 mi. disolvente -----» Antiestreptolisina liofilizada.  
 1 mi. ----- \* 110 unidades  
 0.1 mi. solución = 11 unidades  
 10.9 mi. tampón = 1 unidad X mi.  
 11.0 mi.

5. Los sueros a examinar son inactivados (Y<sub>2</sub> hora a 55°C) y diluidos al 1/50 en el tampón.  
 Tampón..... 2.5 mi.  
 Suero ..... 0.05 mi.

6. La estreptolisina es reactivada por adición un cuarto de hora antes de la reacción de 0.1 cm<sup>3</sup> de la solución de Clorhidrato de Cisterna para 2 cm<sup>3</sup> de estreptolisina.

D) *Titulación de la estreptolisina:*

La dosis de estreptolisina utilizada debe ser determinada cada día. Se dispone en tubos a hemolisis la serie siguiente:

	1	2	3	4	5
Solución Tampón	1.45	1.43	1.40	1.35	1.30
Suero etalón diluido a IU/ml.	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Estreptolisina reactivada	0.05	0.07	0.1	0.15	0.20
Glóbulos rojos	0.50	15 mts. baño María 37°C			0.50

45 minutos al baño María.

Centrifugar 3 minutos.

Escoger la dosis de hemolisis franca mínima (no considerar las trazas de hemolisis).

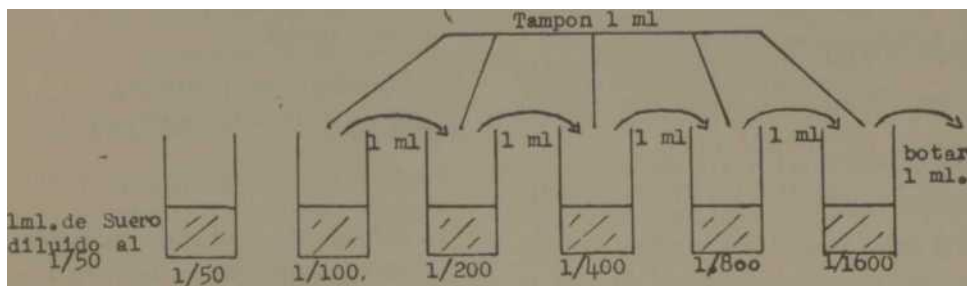
El cuadro indica las dosis a utilizar para la estreptolisina del Instituto Pasteur. Estas dosis pudieron ser diferentes para otra estreptolisina.

#### Búsqueda de los Rgocitos en el Líquido Sinovial.

Para poner en evidencia estas células especiales no se requiere ningún equipo en particular.

El líquido sinovial se recoge en un frasco o tubo con perlas de vidrio lo que permite la desfibrinación.

Centrifugarlo durante unos minutos.



#### III) Suero a titular (dilución al 1/50)

—Tampón 1 ml.

—Estreptolisina reactivada (0.08 (0.09 depende)

15 minutos al baño María a 37°C.

—Glóbulos Rojos 0.5

45 minutos al baño María a 37°C

Centrifugar

*Resultados:* Precisar en la serie correspondiente a cada 'Suero Titular' el primer tubo presentando una hemolisis parcial y en la 'Serie Gamma' el tubo donde se observa el mismo grado de hemolisis. Estos dos tubos contienen el mismo número de unidades antiestreptolíticas. Conociendo ese número y basándose en la 'Serie Gamma' y la dilución de suero utilizada en el tubo correspondiente a la serie 'Suero a Titular' es fácil de calcular el título antiestreptolítico del suero (No. de unidades por  $\text{cm}^3$ ).

Una gota del sedimento celular se echa entre lámina y cubre.

Dejar reposar cinco minutos.

Precisar con el microscopio de luz ordinaria, con o sin inmersión, el por ciento de polinucleares que presentan inclusiones refrigerantes bastante gruesas, mayores que las granulaciones normales de los polinucleares neutrófilos repartidas por todo el citoplasma o a la periferia, en corona, en número de 2 a 20.

La presencia de estas células es prácticamente constante en la poliartritis reumatoidea ya sea o positiva o bien o negativa.

#### TECNICA DEL COMPLEMENTO (DOSIFICACION EN UNIDADES 1/50) DE HEMOLISIS

Preparación del tampón veronal o solución de Mayer.

**Reactivos:**

Solución stock que se prepara con:

CI 2 Mg. - M-            203.31 g x litro  
 CI 2 C« -0.3M        147.03 g x 0.3 x  
    litro.

Preparar esta solución en pequeñas cantidades (50 o 100 mi.)

Para hacer 50 mi.

CI 2 Mg. (P. M.: 203.31 g.) M.  
 1 l.                            203.31 g.

1 l. = 1000 mi.

Para 100 mi .....\* 20.33 g.

Para 50 mi .....\* 20.33 = 10.16 g.

2

CI 2 Ca (P.M.: 147.03 g - 0.3 M) 1 l.

147.03 x 0.3 = 44.109

100 mi.                            4.41g.

50 mi.                              2.205g.

Preparación del tampón veronal o solución Mayer.

Se puede conservar, pero, cuando se prepara el diluyente C' entonces se debe utilizar en el día.

*Para un litro de tampón:*

a) Disolver en 700 mi. de agua destilada:

CINa ..... 41.50 g-  
 Veronal Sódico ..... 5.095 g.

b) Agregar:

CIH-N ..... 15.29mi.  
 Solución Stock ..... 2.50 mi.

c) Completar a 1000 mi.

*Dosificación del complemento:*

a) *Material:*

Tampón veronal o solución de Mayer.

Suero hemolítico de conejo antibemáticos de carnero.

Glóbulos rojos de carnero.

Sueros y líquidos a examinar.

*Preparaciones preliminares:*

1. Diluyente G' (utilizarlo en el día). Se obtiene, a partir del tampón veronal o solución de Mayer que se diluye al 1/5 (una parte de tampón veronal cuatro partes de agua destilada). El PH debe ser de 7.3.
2. Suero hemolítico de conejo antihe-matíes de carnero diluido a razón de 2 gotas en 25 mi. de diluyente C'.
3. Suspensión de glóbulos rojos de carnero. Los glóbulos de carnero serán lavados tres veces en el diluyente C' y el asiento de centrifugación es

II) Gamma	1	2	3 4	5	6
Suero patrón diluido a 1 U/inl	1 mi	0.9	0.8 0.7	0.6	0.5
Solución Tampón	0.9	1	1.1 1.2	1.3	1.4
Estreptolisina reactivada	De acuerdo a la titulación				
Glóbulos rojos	0.50	0.50	0.50 0.50	0.50	0.50
	45 mts. baño de María a 37°C.				

puesto en suspensión en las proporciones siguientes:

Para ..... ( 1 mi. de Culot  
(18 mi. de diluyente C\*)

Mezclar bien, agitando suavemente. Tomar un mililitro de esta suspensión de glóbulos rojos de carnero que se hemolizará en 14 mi. de agua destilada.

Verificar si la hemolisis obtenida tiene una densidad óptica de 700. Leer esta hemolisis en el espectro- fotómetro con una X igual = 541. Si la densidad óptica es superior a 700, ajustar la suspensión de glóbulos rojos de carnero siguiendo la constante:

$$V_f = V_i \times \frac{D_o}{700}$$

V<sub>f</sub> = Volumen final.

V<sub>i</sub> = Volumen inicial.

Ajustar la suspensión de glóbulos rojos de carnero:

V<sub>f</sub>—V<sub>i</sub> — Volumen de diluyente C' que es necesario añadir al volumen inicial para obtener una suspensión de glóbulos rojos de carnero en la cual la lectura de la hemolisis dará una densidad óptica de 700.

La suspensión de glóbulos rojos de carnero ajustada se sensibiliza con igual volumen de suero hemolítico de conejo antihematías de carnero (mantener al frío del refrigerador).

#### 4. Los sueros y líquidos a examinar:

La extracción se efectúa sin anticoagulantes. Una vez centrifugados líquidos y sueros son congelados el mismo día de la extracción.

#### b) Reacción propiamente dicha:

Diluir los sueros al 1/20 en el diluyente C' y en los líquidos articulares 1/10.

(Ver gráfico adjunto)

Las diluciones y las reacciones se realizan a bajas temperaturas.

Después de hacer las diluciones, colocar los tubos 40 minutos al baño María a 37°C. Enseguida después del baño María colocarlos al frío unos minutos antes de centrifugarlos a + 40°C — 2500 por minuto, durante 10 minutos.

#### RESULTADOS

Los cálculos se realizan dividiendo la cifra de la lectura en el espectrofotómetro entre la cifra de hemolisis total. La lectura de los tubos con hemolisis o deben dar lo más próximo a cero. Estos valores se llevan a la tabla logarítmica donde se obtienen nuevos valores que, llevados al papel logarítmico, establecen la recta que corta la línea central (50% de hemolisis). La perpendicular trazada desde este punto indicará la cifra que finalmente llevada a tabla de correspondencia precisará las unidades de complemento.

DOSIFICACION DEL COMPLEMENTO

(Número de Tubos)	1	2	3	4	5	6	7	—	To	T 100
(Diluyente C')	2.9	2.8	2.7	2.5	2	1	—	—	3	
(Agua destilada)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3
(Suero a examinar diluido al 1/20)	0.1	0.2	0.3	0.5	1	2	3	—	—	—
(Suspensión de glóbulos rojos de carnero sensibilizados)	1	1	1	1	1	1	1	—	1	1