

Clínica médica B. de la Facultad de Medicina de Barcelona
(Profesor M. Soriano) Departamento de Laboratorio.

Sencilla prueba de floculación para demostrar un aspecto de la labilidad coloido-proteica del suero.

por J. J. Permanyer

(Recibido para publicar el 27 de abril de 1949)

Durante la última década han aparecido, entre otras, dos nuevas reacciones de labilidad coloidal que han logrado una notable difusión en todos los países, nos referimos a la prueba de la cefalina-colesterol de Hanger y a la del enturbiamiento por el timol propuesta por Mac Lagan.

Ambas reacciones practicadas en suero fresco, aunque erróneamente consideradas por algunos autores como pruebas de funcionalismo hepático, señalan, principalmente, determinadas alteraciones cuantitativas y cualitativas de las fracciones proteicas del suero. Estas alteraciones se refieren, según comprobaciones electroforéticas, al descenso de la albúmina que posee un poder estabilizador y antifloculante y al aumento de las globulinas β y sobre todo de la γ . Los trabajos de Kunkel (1) y cols. demuestran cómo el incremento de la γ globulina y la positividad de la reacción de Hanger se producen con un paralelismo bastante notable. Saifer admite que la floculación es debida a la combinación en forma estequiométrica de la cefalina-colesterol con la globulina γ "activa", entendiéndose por tal aquella fracción de γ globulina que no siendo inhibida por la fracción albúmina es capaz de combinarse con la suspensión de cefalina-colesterol. También la prueba del enturbiamiento por el timol parece relacionarse, según Mac Lagan, con la fracción γ -globulina, si bien más recientemente Cohen y Thompson² la hallaron positiva en aquellos procesos en que existe conjuntamente un aumento de la β - y γ -globulinas. En definitiva, pues, dichas reacciones, lo propio que las del oro coloidal, Takata y formol gelificación constituyen los procedimientos de que se vale la química clínica actual para evidenciar uno de los aspectos de las variaciones del equilibrio coloido-proteico al que nosotros designamos por "desviación a la derecha" (Soriano y Permanyer 4), habida cuenta que en el diagrama elec-

troforético corriente, la globulina β y γ se hallan situadas en su extremo derecho y también porque los sueros que poseen un aumento de la γ globulina sobre las otras fracciones acostumbran generalmente a desplazar la banda de coagulación hacia la derecha.

Este tipo de desviación es bastante característico de un grupo de enfermedades en las que la particular respuesta del S. R. E. es sin duda el mecanismo patogenético de aquélla y cuya presencia se pone de manifiesto por la positividad de las citadas reacciones de floculación; de ahí que su empleo en clínica venga de un modo indirecto a satisfacer, en determinados casos, las necesidades del diagnóstico y valoración pronóstica.

Pertenecen a este grupo de procesos que humoraimente se traducen por una desviación a la derecha del cuadro proteico, como más caracterizadas, las siguientes enfermedades:

Hepatitis.

Cirrosis hepática.

Procesos hepato-esplénicos diversos.

Estenosis rectal linfogranulomatosa (Enf. de N. Favre).

Endocarditis lenta.

Kala-Azar.

Mieloma.

Ciertas supuraciones crónicas (perinefritis, absceso y gangrena pulmonar, etc.).

Determinadas formas de tuberculosis crónica fibrosa.

Utilizando el método de las pruebas combinadas (Permanyer 5) en el cual se practican simultáneamente varias reacciones de labilidad coloidal, dicha desviación se caracteriza como datos más relevantes por la positividad de la reacción de Takata y similares (cefalina-colesterol y timol), formol gelificación del suero (positividad variable) y banda de Weltmann alargada (7'5-10) o seudonormal (6-7).

Una de las reacciones que últimamente hemos ensayado es la de la cefalina-colesterol, cuyo valor para el diagnóstico de las enfermedades hepáticas es quizás superior al de la reacción de Takata, siendo muy útil en el diagnóstico diferencial de las ictericias (obstructiva y parenquimatosa). Trabajando, pues, en la prueba de Hanger y teniendo en cuenta la afirmación de Mac Lagan sobre la importancia de la función "ol" en el determinismo de estas reacciones de floculación, nos propusimos averiguar la importancia del colesterol en el reactivo cefalina-colesterol. A este fin, partiendo de una solución alcohólica de colesterol puro (Merck) al 1/300 preparamos una suspensión coloidal en agua destilada, para obtener la cual probamos diversas técnicas hasta adoptar la que más adelante describimos.

Al objeto de obtener los resultados más concordantes posibles

con los de la prueba de cefalina-colesterol, practicamos una serie de tanteos variando la concentración del colesterol, cantidad de reactivo añadido, forma de obtener la suspensión, etc., hasta conseguir en forma definitiva la siguiente prueba.

Prueba del colesterol

a) *Reactivo*. — Disolver 1 gr. de colesterol puro en 300 c.c. de alcohol de 96°, sea en el baño María, sea dejando un par de días el frasco que contiene la solución dentro de la estufa a 37° y agitando de cuando en cuando. El colesterol se disuelve perfectamente quedando una solución límpida. Aunque no es imprescindible y sólo para visualizar mejor los resultados, añadimos 0.2 c.c. de una solución alcohólica (alcohol de 96°) de azul victoria al 10 %. El reactivo de colesterol se conserva indefinidamente por cuanto los primeros ensayos los ejecutamos con una solución que poseíamos hacía tiempo y que utilizábamos para la preparación del antígeno de Meinicke.

b) *Preparación de la suspensión*. — En un matraz de Erlenmeyer limpiado con alcohol y seco, se depositan 2 c.c. del reactivo de colesterol (a) utilizando una pipeta que sirve exclusivamente para reactivos alcohólicos y previamente pasada por alcohol y secada.

En otro matraz se colocan 32 c.c. de agua destilada (o sea 16 c.c. por cada 1 c.c. de reactivo) neutra, a la temperatura aproximada de 20° C. (15-25° C.). Para obtener la suspensión basta verter rápidamente el agua sobre el reactivo. La suspensión coloidal de colesterol vista al trasluz y agitando ligeramente el matraz o tubo que la contiene, muestra unas nubosidades características. Siendo su preparación rápida y sencilla, aconsejamos verificarla en el momento de ser utilizada y en la proporción necesaria.

c) *Técnica de la reacción*. — Para cada prueba se utiliza un tubo de hemolisis (90x13mm.) en el cual se depositan 0.2 c.c. del suero problema y a continuación se añaden 4 c.c. de suspensión de colesterol (b); se mezcla por inversión, sin agitar, y se dejan los tubos a la temperatura del laboratorio.

d) *Lectura de los resultados*. — La lectura se verifica a las veinticuatro horas, interpretando los resultados en la siguiente forma:

Negativo: si los tubos permanecen sin ninguna floculación. En ocasiones la suspensión se enturbia visiblemente, pero sin flocular.

Positivos: 1.º, débil (+) si el floculado está formado por un pequeño sedimento; 2.º, mediano (++) si existe un importante floculado, pero queda todavía suspensión sin flocular, y 3.º, intenso (+++) si la floculación es completa.

Experimentación y discusión

Vamos a resumir los ensayos verificados a fin de estudiar las condiciones de la reacción. Para valorar la sensibilidad de los mismos, éstos fueron ejecutados empleando diversos sueros a los que simultáneamente se les practicó la prueba de Hanger, Takata-Ara, gelificaciones por el formol y ácido láctico, y banda de Weltmann.

Se prepararon dos suspensiones de colesterol a distinta concentración, 1x10 y 1x16, las cuales se ensayaron en tres series de los mismos sueros según la pauta siguiente:

- 1.^a serie: Suero, 0'2 c. c.; suspensión 1x10, 2'5 c. c.
- 2.^a serie: Suero, 0'2 c. c.; suspensión 1x10, 4 c. c.
- 3.^a serie: Suero, 0'2 c. c.; suspensión 1x16, 4'— c. c.

Con la primera serie se trabaja con una cantidad de colesterol igual a la de la tercera serie (técnica definitiva), pero con una dilución del suero distinta (1x12'5 en vez de 1x20). Los resultados fueron discordantes acusando los de la primera serie un mayor número de falsas positividades en relación con los de la tercera serie y la prueba de Hanger. En cambio, con la segunda serie que supone una mayor cantidad de colesterol siendo igual la dilución del suero, los resultados obtenidos fueron sensiblemente iguales a los de la tercera serie y a los de la prueba de Hanger.

De ello se deduce que, dentro de ciertos límites, la dilución que sufre el suero posee mayor importancia que el contenido en colesterol de la suspensión, siendo la proporción óptima, entre suero y suspensión de colesterol, la de 0'2x4 c. c., (o sea al 1x20). Esta relación de volúmenes (1x20) empleando una suspensión de colesterol 1x16 (3.^a serie) es la técnica definitiva que adoptamos por concordar los resultados obtenidos, en 150 casos, casi en absoluto, con los de la cefalina-colesterol (véase en detalle en un artículo próximo). La importancia del factor dilución ha sido comprobado recientemente por Lowe y Mawson (6) y también por Dreyfus (7).

La suspensión de colesterol a 1x16 obtenida según la técnica anteriormente expuesta proporciona resultados de igual sensibilidad durante los cuatro días siguientes a su preparación, aumentando progresivamente aquélla (maduración y envejecimiento) en los días posteriores aun cuando el tubo control permanezca sin flocular.

Los resultados no muestran divergencia entre las temperaturas de 10° y 25° C. Tampoco se observaron diferencias imputables a la acción lumínica, tanto en la prueba del colesterol como en la de Hanger, de acuerdo con Tettamanti y Mingrone (8).

En cuanto al *mecanismo de la prueba* es sabido que las reacciones en que el suero sufre una determinada dilución en medio hipotónico, las fracciones globulínicas debido a su insolubilidad flocu-

lan tanto más intensamente cuanto mayor es su asimetría molecular que es máxima en las γ -globulinas. Por otro lado al verificarse la dilución disminuye notablemente el poder estabilizante de la fracción albúmina.

Para comprobar el factor dilución en la prueba que estudiamos, nos basta tratar el suero con agua destilada en lugar de la suspensión de colesterol, manteniendo la misma relación de volúmenes (1x20) y observaremos como en un gran número de casos existe una correspondencia entre la floculación producida a las 24 horas y la obtenida con el colesterol y cefalina-colesterol.

Este mismo extremo ha sido comprobado por Dreyfus (7) comparando la simple dilución con agua destilada y la prueba del enturbiamiento por el timol, de lo cual deduce que la positividad de dicha prueba es debida en parte a la dilución del suero en medio hipotónico. Análoga observación ha hecho Sols (10) con respecto a la reacción de Kunkel (11). Recientemente, también Hejda (9) ha dado a conocer una reacción de resultados bastante concordantes con la de Takata mediante la floculación parcial de las proteínas al diluir el suero en agua destilada.

Aparte de este factor se admite, como anteriormente se ha indicado, la existencia de un proceso de combinación entre la globulina γ "activa" y el colesterol u otro hidroxiderivado aromático (fenol, timol, naftol, etc.). Este fenómeno da al colesterol el valor de visualizar específicamente el aumento de la globulina γ "activa", en las debidas condiciones de dilución, del suero patológico, cuyo proteínograma acuse la llamada desviación a la derecha.

Resumen

Se expone una prueba simplificada de floculación empleando como reactivo una suspensión acuosa de colesterol cuya preparación es de gran simplicidad.

Los resultados obtenidos con esta prueba y su aplicación en clínica son en todo semejantes a los de la reacción de la cefalina-colesterol de Hanger.

Summary

150 tests carried out on serums of different diseases simultaneously with the cephalin-cholesterol test with concordant results permit to deduct that the "cholesterol test" depends on the qualitative and quantitative alterations of the γ globuline fraction, in relation with the quantity and quality of the albumin fraction. The importance of the factor dilution of the serum (1 X 20) on the concentration of the cholesterol employed in the suspension has been shown. The proposed test has the advantages of greater simplicity and cheapness; moreover, its results are subject to less technical errors.

Reagents

Alcoholic cholesterol solution. — 1 g. of pure cholesterol and 300 ml. of 96 per cent alcohol are heated in a water bath till dissolution, or allowed to remain in the oven at 37° C. for two days the same purpose. The addition of 0.2 ml. of a 10 per cent alcoholic solution of Victory blue for each 100 ml. of reagent makes easier appreciation of results.

Colloidal suspension of cholesterol. — Put in a flask 32 ml. of neutral distilled water, and in another 2 ml. of the cholesterol solution. Pour *rapidly* the former on the latter. A fine suspension, stable for some days will result, but preferably it must be prepared each time before use.

Procedure

In the bottom of a small test tube (90 × 130 mm.) put 0.2 ml. of fresh serum and add 4 ml. of the cholesterol *suspension*, mixing by inversion without shaking and allowing to stand at room temperature. Preparation of a control tube with the reagent is advisable.

Examine the tubes 24 hours later. A small sediment = +, partial flocculation (some cholesterol remaining in solution) = ++, and complete flocculation = +++ . Negative serums do not give any sediment; but occasionally a turbidity, as compared with the control tube.

Bibliografía

1. Kunkel, H. G.; Ahreus, E. H.; Eisenmenger, W. J.: *Gastroenterology*, **11**, 499 (1948).
2. Saifer, A.: *J. Clin. Invest.*, **37**, 737 (1948).
3. Cohen, P. Ph. y Thompson, F. L.: *J. Lab. Clin. Med.*, **32**, 475 (1948).
4. Soriano, M. y Permanyer, J. J.: Sesiones de la Clínica Médica, B., 19 de Marzo (1949).
5. Permanyer, J. J.: Tesis doctoral y Síntesis Médica 1945-46, Cap. de Laboratorio Clínico (1946).
6. Lowe, E. B. y Mawson, C. A.: *Lancet*, **11**, 950 (1948).
7. Dreyfus, citado por Lowe y Mawson.
8. Tettamanti, R. y Mingrone, R.: *Prensa Med. Arg.*, **35**, 1135 (1949).
9. Hejda, B.: *Rev. Med. Liège*, 195 (1948).
10. Sols, A.: Comunicación personal.
11. Kunkel, H. G.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **66**, 217 (1947).