

MORENO DE ORBE, M.—Rev. Esp. Enf. Ap. Dig. y Nutr., 14, 390, 1955.
MORIN, M.; MOUCHET, A., y MILE, GAUTIER, M.—Arch. Mal App. Dig. et Mal. Nutr., 43, 481, 1954.
MOSSBERGER, J. J.—J. Neuropath. and Exper. Neurol., 6, 391, 1947.
MOUTIER, F.—Arch. Mal. App. Dig. et Mal. Nutr., 34, 101, 1945.
MOUTIER, F., y CORNET, A.—Encyclopedie Medico-chirurgicale. Estomac-intestin, I, 9,022 C.
NEMOURS-AUGUSTE.—Cit. MOUTIER y CORNET.
OHM.—Cit. MOUTIER y CORNET.
PARMENTIER y LASNIER.—Cit. DE LUNA.
PEREZ GIER, J.—Rev. Clin. Esp., 59, 412, 1955.
PLUMMERS y STABINS.—J. Pediatr., 37, 899, 1950.
PORCHER, DUPUY e HILLEL.—Cit. MOUTIER y CORNET.

PROCTOR.—Cit. GOLDSBERRY.
RUKITANSKI.—Cit. DE MIGUEL.
ROUX, J.—Gaz. Med. Franc., 55, 755, 1948.
RUBELL, LIX y CLELLAND.—J. Pediatr., 40, 3, 1952.
RUTZ.—Cit. GOLDSBERRY.
SANDWEIS, D. J., y cols.—Amer. J. Dig. Dis., 6 (6-III-39).
SCHULMBERGER, H. G.—Arch. Pathol., 52, 43, 1951.
SMITH.—Cit. DE MIGUEL.
SZLÉ, R.; PIÑEIRO SORONDO, J., y MOSTO, D.—Úlcera de estómago y duodeno. Estudio anatomoclínico y terapéutico. Libr. El Ateneo. Buenos Aires, 1930.
TEDESCO, MME.—Cit. MOUTIER y CORNET.
TIEBLE, P.—Deutsch. Ztschr. f. Chir., 150, 275, 1919.
TIEGEL, THORLING y MICHAELSON.—Cit. MORENO DE ORBE.
VONDERAKE.—Cit. DE MIGUEL.
WRIGHT, L. T., y SCOTT, B. E.—J. Pediatr., 37, 905, 1950.
WEBER y cols.—Cit. MORENO DE ORBE.

ORIGINALES

METODO PARA LA DETERMINACION DE LA ANTIESTREPTOKINASA EN EL SUERO

J. M. SEGOVIA, A. ORTEGA, M. JIMÉNEZ CASADO,
L. PARIS, J. OUTEIRIÑO y J. M. ALÉS.

Instituto de Investigaciones Clínicas y Médicas.
Director: C. JIMÉNEZ DÍAZ.

INTRODUCCIÓN.

La etiopatogenia de la fiebre reumática (F. R.) ha sido siempre muy discutida y se han propuesto numerosas teorías para explicarla. En los últimos años se han encontrado argumentos clínicos, bacteriológicos e inmunológicos que permiten asignar a la infección estreptocócica un papel primordial en el desencadenamiento de esta enfermedad. Como es sabido, el papel del estreptococo en la génesis del reumatismo no es una idea nueva. A principios de este siglo, numerosos autores (POYNTON y PAYNE, MEYER y COLE, etc.) sostuvieron que la F. R. era una infección estreptocócica, y en este sentido se publicaron trabajos en los que se pretendía haber aislado estreptococos en los enfermos reumáticos, no sólo en la faringe, sino también en la sangre, derrames articulares, etc. (CECIL, NICHOLS y STAINSBY). ROSENOW llegó a describir un estreptococo especial, el "Str. cardio-arthritis", con una afinidad especial para las válvulas cardíacas y las articulaciones, que él consideró como el agente específico de la F. R. Por el contrario, otros autores (SCHOTTMÜLLER, DAWSON, FISCHER, LICHTMANN y GROS) no pudieron confirmar estos hallazgos, por lo que la teoría estreptocócica del reumatismo no progresó, siendo casi olvidada en favor de otras hipótesis patogénicas.

A partir de la segunda guerra mundial, y coincidiendo con el hallazgo de técnicas bacteriológicas e inmunológicas más precisas, se han pu-

blicado numerosos trabajos (SWIFT, COBURN y PAULI, ANDERSON, KUNKEL y MAC CARTY, RANTZ, HARRIS y HARRIS, RAMMELKAMP, STOLLERMAN, etcétera) que han arrojado nueva luz en el estudio de la etiopatogenia de la F. R. sobre la base de una infección por estreptococos con modalidades peculiares y de mecanismo aún no bien aclarado.

Los argumentos principales en favor de la etiopatogenia estreptocócica de la F. R. son los siguientes: a) Tanto en los brotes como en las recidivas de la enfermedad, se puede aislar de las secreciones nasofaríngeas de los pacientes el estreptococo hemolítico A en un gran número de casos. b) Se puede demostrar en el suero de los enfermos la presencia de anticuerpos antiestreptocócicos (antiestreptolisinas, antiestreptokinasa, antihialuronidasa, anticuerpos frente a la proteína M, etc.). c) El tratamiento de las infecciones estreptocócicas con antibióticos ha ejercido una profilaxis efectiva sobre la frecuencia de la F. R. y sobre sus recidivas. d) En algunos animales de laboratorio se ha podido producir experimentalmente cuadros parecidos clínica y anatomopatológicamente a la F. R. mediante la inyección de estreptococos o de sus productos.

No es nuestro propósito ahora entrar en el análisis del posible mecanismo patogénico de la F. R. Los problemas planteados son numerosos y llenos de gran interés. Sólo queremos referirnos a la aparición en el enfermo reumático de anticuerpos frente al estreptococo hemolítico que acaso puedan tener por sí mismos una significación patogénica decisiva, pero que, por otra parte, y éste es el objetivo del presente trabajo, tienen un gran valor para el diagnóstico serológico de las infecciones estreptocócicas.

Se admite actualmente que dentro de la clasificación de LANCEFIELD de los estreptococos hemolíticos, sólo los que pertenecen a los grupos A y C son patógenos para el hombre. Los es-

treptococos C se encuentran pocas veces, por lo que prácticamente puede considerarse al grupo A como el principal agente patógeno que en el hombre, además de la F. R., puede producir escarlatina, erisipela, nefritis, amigdalitis y curonidasa.

Los estreptococos pueden provocar en el organismo infectado la producción de una gran variedad de anticuerpos debido a la riqueza de antígenos bacterianos que poseen, unos de naturaleza exocelular y otros endocelulares. Los exoantígenos son: toxina eritrogénica, estreptolisina O, estreptolisina S, hialuronidasa, estreptokinasa, desoxirribonucleasa, oxirribonucleasa, leucocidina, proteinasa y amilasa. Entre los endoantígenos tenemos: proteína M, proteína T, antígeno C (polisacárido de grupo) y beta-glucuronidasa.

Los anticuerpos que se han estudiado en enfermos con infección estreptocócica han sido: antiestreptolisinas (TODD, MAC CARTY, STOLLERMAN y TARANTA, etc.), antihialuronidasa (MAC LEAN, TILLET, HARRIS y HARRIS, etc.) y antiestreptokinasa (CHRISTENSEN, TILLET y GARNER, STOLLERMAN, etc.) en lo que se refiere a los exoantígenos. También se han realizado pruebas de aglutinación frente a estreptococos vivos (aglutinación L de KALBAK) y estreptococos muertos (aglutinación O de THULIN), sobre las que ha trabajado en nuestro país A. Foz.

En este trabajo nos proponemos comunicar el método que empleamos en nuestro laboratorio para la determinación de la antiestreptokinasa estreptocócica, dentro del estudio sistemático que estamos realizando sobre la enfermedad reumática en sus aspectos clínicos, bacteriológicos y serológicos.

FUNDAMENTO.

TILLET y GARNER demostraron en 1933 que ciertas razas de estreptococos hemolíticos segregaban un producto fibrinolítico al que denominaron *fibrinolisisina* estreptocócica. MILSTONE, KAPLAN y CHRISTENSEN demostraron más tarde que este producto de los estreptococos no actuaba directamente sobre la fibrina, sino que activaba un factor presente en el suero humano (*profibrinolisisina* o *plasminógeno*), el cual se convertía entonces en la sustancia activa (*fibrinolisisina* o *plasma*), capaz de actuar líticamente no sólo sobre la fibrina, sino también sobre otros sustratos como el fibrinógeno, hemoglobina, caseína, gelatina, etc. El enzima estreptocócico no era por tanto directamente fibrinolítico, por lo que estos autores propusieron cambiar el nombre de fibrinolisisina estreptocócica por el más adecuado de *estreptokinasa*. Recientemente, MÜLLERTZ y LASSEN (1953) han demostrado que la estreptokinasa no actúa directamente sobre el plasminógeno, sino que convertiría un *proactivador* sérico en el *activador*, el cual sería el que transforma el plasminógeno en

plasma. (Como la fracción del suero que contiene el plasminógeno contiene también el proactivador, nosotros con fines prácticos seguiremos considerando que la estreptokinasa actúa directamente sobre el plasminógeno).

La profibrinolisisina o plasminógeno puede ser activada también por el cloroformo, la tripsina, por activadores tisulares, activadores presentes en las orinas normales, en la leche (ASTRUP), por la reacción antígeno-anticuerpo (UNGAR), etcétera. La fibrinolisisina o plasma que resulta de esta transformación puede originar diversos cuadros patológicos (púrpuras fibrinolíticas, fenómenos hemorrágicos extensos, liberación de histamina y reacciones de tipo anafiláctico, etcétera) que se empiezan a conocer en la actualidad.

Normalmente en la sangre existe un sistema antagonista de la fibrinolisisina, que frena la acción de ésta, y se denomina *antifibrinolisisina* de naturaleza termolábil.

El poder lítico que "in vitro" ejerce la fibrinolisisina sobre los distintos sustratos que hemos enumerado (fibrina, fibrinógeno, caseína, etc.) ha permitido el desarrollo de numerosos métodos de laboratorio para la determinación de la fibrinolisisina, de los cuales los más empleados han sido el fibrinolítico (destrucción de un coágulo de fibrina) y el fibrinogenolítico (descaracterización del fibrinógeno que le impide coagular cuando se añade trombina). Nosotros empleamos este último por considerar que permite una lectura más fácil de los resultados.

La infección por el estreptococo hemolítico A produce en el organismo afectado dos órdenes de reacciones: a) Por una parte, *pone en marcha el sistema fibrinolítico* (es decir, la estreptokinasa convierte al proactivador del suero en activador (MÜLLERTZ y LASSEN), el cual actúa sobre el plasminógeno y lo transforma en plasma). Acaso, como reacción, se produzca un aumento de la antifibrinolisisina que normalmente existe en el suero, ya que no suele haber en los enfermos reumáticos manifestaciones clínicas exponentes de un exceso de fibrinolisisina (o plasma). De igual forma, las estreptolisinas hemolíticas y la hialuronidasa estreptocócica darán lugar, respectivamente, a fenómenos hemolíticos y facilitarán la difusión a través de los tejidos de la infección estreptocócica.

b) Por otra parte, la estreptokinasa, por su carácter de antígeno, *desencadena la producción de anticuerpos antiestreptokinasa*, de igual forma que se producen anticuerpos frente a las estreptolisinas y frente a la hialuronidasa.

Esto último, es decir, la reacción del organismo infectado en el sentido de producción de anticuerpos frente a las exotoxinas del estreptococo, es lo único que nos interesa ahora y lo que investigamos en el suero del enfermo.

A nuestro juicio, no se ha prestado la atención debida en el estudio de la patogenia de la F. R., a la posible acción específica de estas toxinas estreptocócicas, que

seguramente pueden condicionar o explicar muchos puntos aún oscuros en el mecanismo íntimo de producción del reumatismo y de las nefritis. Los trabajos de MEYER y los de HARRIS y HARRIS están orientados sobre la acción de la hialuronidasa estreptocócica en su papel de factor de difusión de la infección por estos gérmenes en la F. R., pero no conocemos estudios similares sobre la acción de las otras exotoxinas.

Para la determinación "in vitro" de los anticuerpos antiestrestreptokinasa, hemos de disponer de un sistema fermentativo revelador, en el que al ser introducidos los anticuerpos contenidos en el suero del enfermo, se produzcan cambios que hagan posible dosificar la cuantía de tales anticuerpos.

Gráficamente, hemos recogido en la figura adjunta los pasos fundamentales de nuestro método: En I, la estreptokinasa actúa sobre el plasminógeno (contenido en la fracción globulínica de una mezcla de sueros humanos) y lo convierte en plasmina; en II, se representa el sistema revelador, que consiste en la coagulación del fibrinógeno por la trombina; en III, vemos que en los tubos que contienen suero humano con suficiente cantidad de antiestrestreptokinasa se "bloquea" la actuación de la estreptokinasa sobre el plasminógeno (porque los anticuerpos han neutralizado a la estreptokinasa) y, por tanto, no hay producción de plasmina. En este caso, el sistema revelador no es atacado, no hay fibrinogenólisis, y por tanto la transformación del fibrinógeno en fibrina al añadir la

trombina se produce en todos los tubos en los que hay anticuerpos antiestrestreptokinasa. En cambio, en los tubos correspondientes a las diluciones del suero problema en los que ya no hay anticuerpos, no hay "bloqueo" de la acción de la estreptokinasa sobre el plasminógeno, lo que da lugar a suficiente cantidad de plasmina para que se destruya el fibrinógeno que entonces es incapaz de coagular cuando se le añade trombina.

Como se ve, el suero del enfermo, que es el factor variable de la reacción, sólo suministra los anticuerpos. Los restantes elementos que intervienen en la reacción son fijos, por lo que deben ser ajustados previamente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO.

I. *Determinación de la unidad de estreptokinasa (Stk.).*—Es la primera fase del método, puesto que la cantidad de anticuerpos antiestrestreptokinasa de un suero problema tiene que ser expresada en la capacidad neutralizante que posee frente a una solución de Stk. cuya actividad para un sistema dado sea conocida.

La definición de la unidad de Stk. es convencional y sólo puede expresarse en función de la constancia de los otros elementos de la reacción. Para nosotros la unidad está contenida en el último tubo, en el que se impide la coagulación del fibrinógeno por la trombina, cuando la proporción de los otros factores y el tiempo de actuación de los mismos son los que se describen a continuación:

De la solución B de Stk., preparada como luego se indica, se hacen diluciones seriadas en 0,2 c. c. de puffer-salino. A cada tubo se añade 0,3 c. c. de la solución de

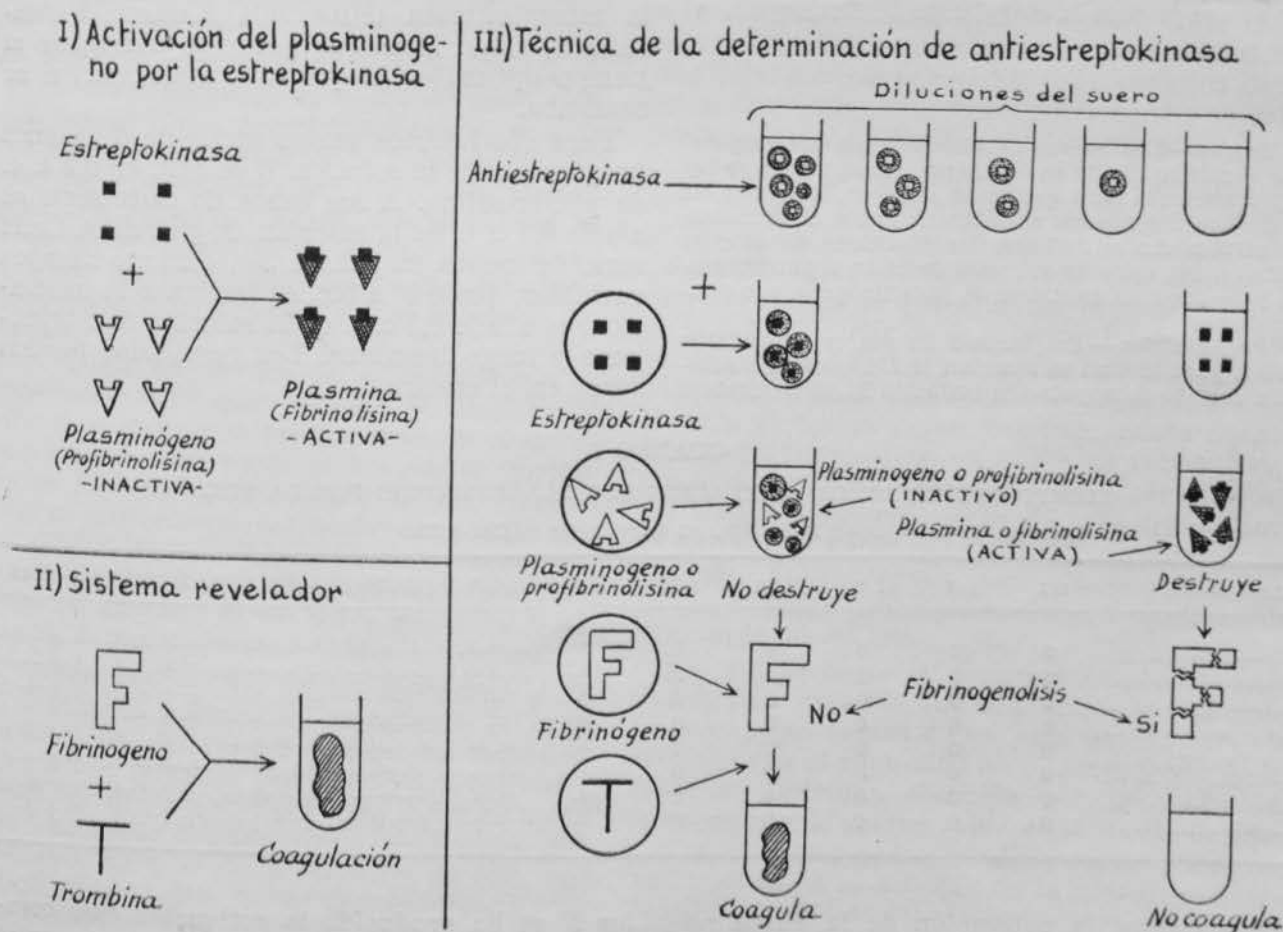


Fig. 1.

globulina que contiene el plasminógeno. Incubación en baño, a 37° C., durante quince minutos, tiempo en el cual se produce la transformación del plasminógeno en plasmina. Se añade luego 0,5 c. c. de la solución de fibrinógeno bovino al 0,33 por 100 y 0,2 c. c. de puffer-salino para ajustar el volumen final a 1 c. c. Incubación a 37° C. en baño durante media hora, al cabo de la cual se añade 0,05 c. c. de la solución de trombina. La coagulación se lee pasados cinco minutos. La unidad de Stk. se encuentra en el último tubo, en el que no se produce coágulo de fibrina.

II. *Determinación del título de antiestrepptokinasa en los sueros problema.*—Una vez calentado el suero a 56°, durante 40', como luego se indica, se hacen diluciones seriadas del mismo en 0,2 c. c. de puffer-salino desde 1/2 a 1/256. A cada tubo se añade 0,2 c. c. de una solución de Stk. en puffer-salino que contiene 10 unidades por c. c. determinadas según se ha descrito antes (por tanto, añadimos 2 unidades de Stk. a cada tubo). Incubamos en baño a 37° durante 30'. En este tiempo, la antiestrepptokinasa del suero se combina con la Stk. añadida y neutraliza su acción ulterior sobre el resto del sistema. Se agrega 0,3 c. c. de la solución de globulina (plasminógeno) a cada tubo y se incuba a 37° durante 15'. En los tubos en los que no haya suficientes anticuerpos para neutralizar la Stk. se producirá durante este tiempo la transformación del plasminógeno en plasmina. A continuación se añade 0,5 c. c. de la solución de fibrinógeno bovino al 0,33 por 100. Incubación en baño a 37° durante 30' al cabo de los cuales se añade 0,05 c. c. de la solución de trombina. Lectura de los resultados, pasados cinco minutos de incubación en el baño a la misma temperatura de 37°. Se hacen dos controles: en el A, van todos los factores de la reacción excepto la globulina (plasminógeno); en el control B, intervienen todos los elementos excepto el suero del enfermo. En el A, debe producirse coagulación; en el B, no.

Las unidades de antiestrepptokinasa las expresamos por centímetros cúbicos de suero y se calculan multiplicando por 10 la última dilución del suero problema en el que aún se produce la coagulación del fibrinógeno.

MATERIALES.

1. *Sueros.*—Los sueros problema deben ser empleados en el mismo día de su obtención, a menos que se tomen precauciones para que no se infecten. Nosotros los mantenemos congelados a -20° C. hasta el momento de su empleo. Antes de hacer las diluciones seriadas se calientan a 56°, durante 40', para destruir la antifibrinolisisina y la pequeña cantidad de plasminógeno que pueden contener.

2. *Puffer-salino.*—Empleamos un puffer de fosfatos a pH 7,4, para lo cual se mezclan 19,2 c. c. de una solución de fosfato monopotásico (solución M/15 de fosfato

monopotásico que se obtiene disolviendo 9,073 gr. en 1.000 c. c. de agua destilada) con 80,8 c. c. de fosfato disódico (fosfato disódico + 12 H₂O, 23,880 gr. disueltos en 1.000 c. c. de agua destilada). Un volumen de este puffer se mezcla con 9 volúmenes de suero salino fisiológico.

3. *Estreptokinasa.*—Partimos del preparado comercial "Varidasa" (Laboratorios Lederle), del cual se hace una solución en puffer-salino. Se pesan 5 mg. del producto, que se disuelven en 3 c. c. de puffer. Esta solución (A) se puede conservar mucho tiempo en el refrigerador a -20° sin que pierda actividad. Una nueva solución (B) se hace añadiendo a 0,2 c. c. de la solución A 0,8 c. c. de puffer-salino.

4. *Plasminógeno.*—Como fuente del mismo empleamos una fracción globulínica obtenida de una mezcla de sueros humanos. Para ello, a un volumen del suero se añaden 19 volúmenes de agua destilada. Se precipita entonces la globulina, añadiendo ácido acético al 0,5 por 100 hasta pH 7,4. Se separa por centrifugación el precipitado y se redisuelve en 3 volúmenes de puffer-salino.

5. *Fibrinógeno.*—Usamos el fibrinógeno bovino de los Laboratorios Armour, fracción 1 de plasma bovino, que contiene un 40 a 50 por 100 de citrato sódico. Las soluciones, al 0,33 por 100 en puffer-salino, deben ser recientemente preparadas.

6. *Trombina.*—Preparado comercial de los Laboratorios Leo. Se disuelve el polvo contenido en una ampolla en 10 c. c. de puffer-salino, resultando una solución que contiene 60 unidades por c. c.

Las diferentes etapas del método que acabamos de describir son el resultado de diversas experiencias previas:

1. *Activación del plasminógeno por la estreptokinasa.*—No repetimos los argumentos ya conocidos que han permitido conocer la activación de la profibrinolisisina o plasminógeno por la estreptokinasa (MILSTONE, KAPLAN, CHRISTENSEN, etc.). Nosotros quisimos averiguar el tiempo óptimo en el que la transformación se realizaba.

Para ello hicimos varias series de diluciones progresivas de la solución B de Stk. en 0,2 c. c. de puffer-salino. A los tubos de cada serie se añade 0,3 c. c. de la solución de globulina. Cada serie de incuba en baño a 37°, durante tiempos variables, desde 5' a 50'. Al terminar la incubación, se añade 0,5 c. c. de la solución de fibrinógeno y luego trombina. Los resultados pueden verse en el cuadro I.

CUADRO I
TIEMPO ÓPTIMO DE LA ACTIVACION DEL PLASMINÓGENO POR LA STK.
Dilución de la solución B de Stk. en 0,2 c. c. de puffer-salino

| Incubación | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 | 1/512 | 1/1.024 | 1/2.048 |
|------------|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|---------|---------|
| 5' | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | +++ | +++ | +++ | ++++ | ++++ |
| 10' | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | +++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 15' | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 20' | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 25' | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | ++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 30' | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | ++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 40' | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | ++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 50' | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | ++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |

Como vemos, la activación de la globulina-plasminógeno por la Stk. es rápida, ya que a

los 5' se ha producido la activación casi completa, que es total entre los 15' y 20'. A partir

de los 25' se produce un desplazamiento de la unidad hacia la izquierda en un tubo, probablemente por la inactivación de la plasmina por el calentamiento. Por esto elegimos los 15' como tiempo óptimo de activación del plasminógeno por la Stk.

2. *Neutralización de la estreptokinasa por la antiestreptokinasa sérica.*—Las diluciones del

suero que contiene los anticuerpos frente a la Stk. se dejan incubar durante tiempos variables, desde 5' a 40', con 0,2 c. c. de la solución de Stk. equivalente a 2 unidades. El resto de la experiencia es igual a la descrita (15' de incubación con la globulina-plasminógeno, 30' de contacto con la solución de fibrinógeno y 5' de actuación de la trombina). Los resultados se recogen en el cuadro II.

CUADRO II

TIEMPO ÓPTIMO DE LA NEUTRALIZACIÓN DE LA STK. POR LA ANTISTK.

Diluciones del suero que contienen la antistk.

| Incubación | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 | 1/512 | 1/1.024 |
|------------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|---------|
| 5'..... | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | ++ | 0 | 0 |
| 10'..... | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | ++ | ++ | 0 |
| 15'..... | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | + | + | 0 |
| 20'..... | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | + | 0 | 0 | 0 |
| 25'..... | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | 0 | 0 | 0 |
| 30'..... | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | + | 0 | 0 | 0 |
| 40'..... | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | + | 0 | 0 | 0 |

Se observa que la neutralización de la Stk. por el anticuerpo correspondiente es muy rápida, ya que a los 5' el título llega a 1/256, siendo máxima a los 15' con un título de 1/512. Esto es lógico dada la naturaleza de la reacción antígeno-anticuerpo. De todos modos, se observan fluctuaciones que desaparecen entre los 15' y los 30', por lo que elegimos este último tiempo como el más adecuado.

3. *Falta de actividad antiestreptokinasa de la globulina-plasminógeno.*—En diversas ocasiones hemos hecho determinaciones de la actividad antiestreptokinasa de la solución de globulina que empleamos como fuente de plasminógeno. En ninguna ocasión esta actividad ha pasado de 40 unidades de antiestreptokinasa, que, como veremos luego, queda por debajo de la que consideramos normal en los sueros no patológicos.

4. *Tiempo de lectura de la coagulación.*—Hemos observado que pasados 5' después de añadir la trombina se produce toda la coagulación posible en los tubos en los que el fibrinógeno no ha sido destruido por la fibrinolisis. Lecturas posteriores, realizadas de 5 en 5 minutos, hasta 45', no hacen cambiar la lectura primera, es decir, no aparece coagulación del fibrinógeno en ninguno de los tubos que a los 5 minutos no la había ya mostrado.

5. *Controles.*—Uno de los controles, el A, está destinado a poner de manifiesto la falta de activación del plasminógeno que pueda ir contenido en el suero problema cuya actividad antistk. se investiga. Para ello, a 0,2 c. c. del suero, calentado previamente a 56° durante 40', se añaden 0,2 c. c. de la solución de Stk. que contiene 2 unidades. No se agrega, como es lógico, globulina, y en su lugar se añaden 0,3 c. c. de puffer-salino. El sistema revelador (fibrinó-

geno y trombina), así como los tiempos de incubación, son los mismos que para el resto de los tubos. Si no hay activación de la globulina del suero problema, no habrá producción de plasmina y, por tanto, el fibrinógeno coagulará al añadir la trombina.

El segundo control, B, tiene por objeto saber si la cantidad de Stk. que se emplea en la reacción es suficiente para activar la globulina. En este tubo control van todos los elementos de la reacción menos el suero del enfermo. No se debe producir la coagulación del fibrinógeno.

6. *Otras observaciones.*—La cantidad de Stk. añadida a cada tubo es de 2 unidades con el fin de tener un cierto margen de seguridad, pues si se agregase exactamente una unidad, se corre el riesgo de que al hacer la dilución final de la Stk. (a partir de la solución B) se cometiera un pequeño error y nos quedásemos por debajo de la unidad, con lo que se quedaría sin activar la globulina y, por lo tanto, habría coagulación del fibrinógeno en todos los tubos. Esto, por otra parte, es una medida habitual en todas las técnicas inmunológicas de este tipo. Como es natural, al hacer el cálculo final del título de unidades antiestreptokinasa, tenemos en cuenta que el suero problema inactiva 2 unidades de Stk. en lugar de una.

Es preciso hacer la determinación de la unidad de Stk. cada día que se practica la reacción, ya que, como hemos dicho, esta unidad está en relación con el contenido en plasminógeno de la fracción globulina obtenida por precipitación de la mezcla de sueros. Aunque el "pool" de sueros es el mismo todos los días, caben pequeñas variaciones en la cuantía de la globulina obtenida, al precipitar con ácido acético, por pequeñas oscilaciones del pH final. No es aconsejable obtener de una vez una gran cantidad de

globulina para emplearla en días sucesivos, ya que puede producirse una activación espontánea del plasminógeno. En la técnica descrita por CHRISTENSEN se trabaja con la fracción III de Harward (precipitación por el alcohol) como fuente de plasminógeno. Esta fracción contiene una gran variedad de sustancias, algunas de las cuales influyen sobre la reacción Stk.-plasminógeno. En nuestra técnica, la globulina se obtiene diariamente, y al ajustar la unidad de Stk. en relación con ella y con la concentración del fibrinógeno (que también puede variar a pesar del cuidado que se ponga al hacer la solución), se tiene una gran seguridad para comparar los resultados de determinaciones realizadas en días sucesivos. El hacer esto nos parece preferible a la manera de dosificar la unidad de Stk. en la técnica de CHRISTENSEN, el cual conserva liofilizado un suero control que contiene 10 unidades de antiestreptokinasas por miligramo, frente al cual ajusta el resto de los componentes de la reacción. De todos modos, nosotros conservamos congelados sueros que tienen títulos altos de antistk. y que incluimos como controles en las determinaciones que se practican cada día. Hemos visto que los títulos obtenidos son constantes y se repiten siempre los mismos para cada uno de estos sueros controles.

RESULTADOS.

Hemos hecho el estudio del contenido en antiestreptokinasas de 42 sueros normales. En ningún caso el título ha sido superior a 80 unidades por c. c. de suero, por lo que consideramos a esta cifra como el límite superior normal. En 56 enfermos con reumatismo cardioarticular en diferentes fases de actividad, hemos encontrado valores de antiestreptokinasas variables de unos casos a otros. En 18 enfermos de este grupo, cuya V. de S. era normal, encontramos valores de antiestreptokinasas por debajo de 80 en 9 (50 por 100), y aumentados, aunque no demasiado, en los otros 9 enfermos. En los 38 enfermos de este grupo, con V. de S. acelerada, en 25 (67,7 por 100) el título de antiestreptokinasas estaba aumentado y en 13 (34,3 por 100) era normal. No es infrecuente encontrar en los enfermos con reumatismo activo títulos de 640, 1.280 unidades o más. Excepcionalmente hemos visto en un enfermo (F. Civ.) un título hasta de 40.960 unidades (!) por c. c. Como contraste, en 7 enfermos de artritis reumatoide cuya velocidad de sedimentación de los hematíes estaba muy acelerada, el título de antiestreptokinasas era normal en 3 y ligeramente aumentado (no pasaba de 160 unidades) en los 4 restantes. En 18 nefríticos hemos encontrado aumento del título de antiestreptokinasas en 10 de ellos sin relación con la V. de S. Es interesante que en

4 enfermos con corea de Sydenham, cuya velocidad era normal en 3 (y de 25 de índice en el cuarto), se han hallado títulos altos de antiestreptokinasas (640, 320, 2.560 y más de 5.120 unidades, respectivamente).

No es nuestro propósito ahora analizar el significado y el valor diagnóstico de la determinación de antiestreptokinasas en las diversas enfermedades en las que interviene de algún modo la infección estreptocócica. En trabajos posteriores daremos cuenta de los estudios sistemáticos que estamos realizando sobre estos procesos y del valor comparativo de las distintas determinaciones de laboratorio propuestas para el diagnóstico etiológico y de actividad de tales enfermedades, entre las que dedicamos una atención especial a la fiebre reumática. En el presente trabajo sólo hemos querido exponer el método que empleamos para la determinación del anticuerpo antiestreptokinasas.

RESUMEN.

Se describe un método personal de determinación de estreptokinasas en el suero, así como los resultados preliminares obtenidos con él en diferentes enfermos.

BIBLIOGRAFIA

- TILLET, W. S. y GARNER, R. L.—*Jour. Exp. Med.*, 58, 485, 1933.
 MILSTONE, H.—*Jour. Immunol.*, 42, 109, 1941.
 KAPLAN, M. H.—*Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 57, 40, 1944.
 CHRISTENSEN, L. R.—*Jour. Clin. Invest.*, 28, 163, 1949.
 FOZ, A.—*Rev. Esp. Reum.*, 5, 412, 1954.
 ASTRUP, T.—*Blood*, 11, 781, 1956.
 HARRIS, T. N. y HARRIS, S.—*Amer. J. Med. Sci.*, 217, 174, 1949.
 MEYER, K.—*Physiol. Rev.*, 27, 335, 1947.
 MCCARTY, M.—*Circulation*, 14, 1.138, 1956.

SUMMARY

A personal method is described for the assay of serum streptokinase together with the preliminary results attained with it on various patients.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine eigene Methode zur Bestimmung der Streptokinase im Serum beschrieben und die Resultate eines Vorstudiums mit derselben bei verschiedenen Patienten besprochen.

RÉSUMÉ

Déscription d'une méthode personnelle de détermination de streptokinase dans le sérum, ainsi que des résultats préliminaires qu'on obtient chez différents malades.