

## *Prueba Sellek-Frade del acetato de cobre para el diagnóstico y pronóstico de las hepatopatías*

*Revisión de la literatura mundial (\*)*

Por los Dres.:

ANTONIO SELLEK Y ALEJANDRO DEL FRADE

Las pruebas de turbidez y de floculación hepáticas, aparte de sus imperfecciones, tienen en clínica para el diagnóstico y pronóstico de las hepatopatías un enorme valor. Según el profesor Lemaire<sup>25</sup> de la Facultad de Medicina de París, ellas son suficientemente precisas y la interpretación de sus resultados, tomados en conjunto no se presta, ni a confusiones ni a conclusiones equívocas.

Popper<sup>49</sup> señala que estas pruebas a pesar de su naturaleza inespecífica, son útiles para el diagnóstico, aplicándolas dentro de un sistema en el que unos resultados, sirven de complemento a otros. Ellas han sido aplicadas ampliamente en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas; aunque no se consideran, como un fiel resultado de la función hepática.

En la V Convención Bienal de la Sociedad Cubana de Médicos Laboratoristas Clínicos, celebrada en la Habana en diciembre de 1955 y posteriormente (1956-57), presentamos una nueva re-

acción de turbidez y floculación, usando como reactivo exclusivo una solución apropiada de acetato de cobre. A través de sucesivas comunicaciones describimos para la ejecución de la misma un método *standard*, un procedimiento *cuantitativo* y un *ultramicrométodo*.

Encontramos la prueba más sensible que las de Takata-Ara y paralela a las de Hanger y MacLagan. Se estudió la reacción originalmente en 100 normales, en 1,000 enfermos no hepáticos y en numerosas hepatopatías, hallando la misma negativa en los dos primeros grupos y con un 100% de positividad en las cirrosis y hepatitis virales. También se encontró positiva en el 75% de los casos de agenesia de las vías biliares.

Durante un período de diez años (1955-65), la reacción ha sido usada en millares de hepatopatías y publicados trabajos sobre ella en los siguientes países de América, Europa y Asia: Argentina, Albania, Brasil, Cuba, Colombia, Chile, Estados Unidos, España, Francia, Honduras, Hungría, Italia, México, Perú, Rumanía y Thailandia.

Aparte de comunicaciones, se han hecho sobre ella tesis de grado en las Universidades de México<sup>11, 12</sup> y San Mar-

(\*) Trabajo del Departamento de Laboratorio Clínico Central del Hospital Infantil "Pedro Borrás Astorga", F entre 27 y 29, Vedado, Habana, Cuba, que fue presentado en el XI Congreso Médico y VII Estomatológico Nacional, (sección de Pediatría), celebrado en la Habana del 23 al 26 de febrero de 1966.

cos de Lima<sup>8,9,11,12,16</sup> y figurado en editoriales de la revista "The Lancet" de Londres<sup>16</sup> o específicamente dedicados a ella como el de "La Semana Médica" de Buenos Aires.<sup>51</sup>

Los trabajos mundiales consagrados a ella, en líneas generales concuerdan y se complementan. A continuación transcribimos los hechos más destacados de las referidas publicaciones, siguiendo un orden cronológico de publicación.

Sanford,<sup>5</sup> profesor de Patología Clínica de la Universidad de Minnesota y consultante de la División de Laboratorio Clínico de la "Mayo Clinic", expresa que el laboratorio químico del cuerpo lo es el hígado y que si bien nuevas pruebas de función hepática han sido propuestas, las cuales pueden o no añadir, alguna información respecto a la condición hepática, sin embargo si esta prueba es barata y simple de realizar, ella resulta valiosa y en este sentido Sellek y Frade, han desarrollado una prueba interpretada como de función hepática, la cual es similar a la de turbidez de MacLagan e indica un aumento de las globulinas o una inversión del cociente serina globulinas en el suero sanguíneo. Sanford describe luego los detalles técnicos de la prueba reiterando ser valiosa y digna de probarse.

Wollenweber<sup>6</sup> en la revista "Current Medical Digest", señala que la prueba es de valor por su simplicidad y por requerir sólo el uso de un reactivo. El expresa haberla usado encontrando que es particularmente útil para seguir los casos de hepatitis infecciosas. En las cirrosis portal, los resultados corren paralelos con los de la prueba de Hanger.

Fraga,<sup>10</sup> profesor de la Escuela de Medicina de la Universidad de México, efectúa 1,000 (mil) pruebas, las cuales compara con las reacciones de Van Den Bergh, Takata-Ara, Hanger, Timol y Zinc, con las modificaciones en el suero

sanguíneo de las proteínas totales, así como de la serina y globulinas, encontrando concordancia paralela con las pruebas anteriores, aún cuando en su concepto la prueba Sellek-Frade, le parece más sensible que las citadas. Expresa además haber encontrado una línea casi superpuesta con la dosificación de las globulinas, correspondiendo casi siempre la positividad de la prueba con un aumento de la globulina gama. Ella es negativa en todos los casos tomados como control, así como en los de abscesos hepáticos, nefríticos y estados reumáticos sin ataque hepático; en tanto que se encontró positiva, en todos aquellos en los que estaba comprometido el funcionamiento hepático. Dice Fraga que la prueba es no sólo de utilidad, sino indispensable al clínico en el estudio de las enfermedades hepáticas.

Castillo y López Fernández,<sup>7</sup> profesores de la Cátedra de Clínica Médica de la Universidad de la Habana, publicaron en 1957 un trabajo con la prueba Sellek-Frade en casos de cirrosis hepáticas, comprobadas por estudios histológicos, bien por laparoscopia, por la intervención quirúrgica o la necropsia.

En casos de cirrosis portal la prueba resultó positiva intensa dentro de cinco minutos. En cuatro casos de cirrosis postnecrótica se comportó como en la portal, dando precipitado a los cinco minutos. Solamente en un caso de cirrosis biliar, consecutiva a una obstrucción del colédoco la prueba resultó negativa, al igual que las otras reacciones. En un estudio posterior sobre 20 casos, bien definidos de cirrosis portal, se obtuvo una positividad inmediata antes de los cinco minutos.

En casos de enfermedades diversas: nefrosis, abscesos hepáticos y pulmonares, hipertensión esencial, etc., la prueba se comportó como negativa. En dos

casos de sangramiento profusos (hematemesis) se hizo la prueba inmediatamente con resultados intensamente positivos a los cinco minutos. En un caso la intervención y en otros la necropsia, confirmaron la existencia de una cirrosis portal avanzada con várices esofágicas y la ausencia de lesiones ulcerosas del tubo digestivo.

Green los profesores Castillo y López Fernández que la prueba Sellek-Frade por su sencillez de ejecución y los resultados que ofrece, tiene grandes ventajas en la práctica, como son la rapidez de sus resultados y que está al alcance del médico práctico, en lugares apartados de centros científicos u hospitalarios.

Nodarse,<sup>17</sup> profesor titular de la Cátedra de Laboratorio Clínico de la Universidad de la Habana, en su obra titulada "Interpretación Semiológica de los Análisis Clínicos" describe la misma con los detalles técnicos de su realización y expresa que la prueba Sellek-Frade del acetato de cobre, es concordante con las más empleadas en la exploración de la función hepática y su sensibilidad en la mayoría de los casos es mayor que el Takata-Ara, Hanger y timol.

El profesor MacLagan<sup>13</sup> en su trabajo "Los tests de floculación en la función hepática" hace referencia a la misma y en un editorial de la prestigiosa revista británica "The Lancet"<sup>16</sup> dedicado al estudio de la función hepática se expresa que "Sellek y Frade han desarrollado una prueba rápida y simple de turbidez y floculación, con resultados que parecen ser muy satisfactorios y los cuales son comparables a los encontrados con la prueba del timol de MacLagan".

En una comunicación presentada ante la XII Convención de la Asociación Italiana de Médicos Analistas y Pató-

logos celebrada en Palermo, Faberi y Polini de los Hospitales Riuniti y S. Camilo de Lellis de Roma, sustentan haber practicado la prueba en 102 casos (30 normales) y 72 pacientes con enfermedades hepáticas. Ellos encontraron una muy buena correlación con las pruebas de Takata-Ara, Hanger y MacLagan y recomiendan su uso en Italia.

Delgado<sup>15</sup> realiza la reacción en Santiago de Chile en 114 pacientes; de los cuales 74 tenían lesiones hepáticas. Ellos pertenecían a distintos servicios del Hospital de Niños "Manuel Arriarán" y a casos proporcionados por el servicio de Maternidad del Hospital San Borja. Sus conclusiones son las de que la prueba ha demostrado: a) Para el estudio de las hepatopatías es una reacción sensible, precisa y de fácil manejo. b) Se necesita escasa cantidad de suero. c) Los casos positivos están en relación con la lesión hepática, modificándose la intensidad de la misma con la mejoría clínica del paciente. f) En las ictericias hepáticas es positiva y está en relación con las pruebas de Hanger y timol. g) En las ictericias hemolíticas es negativa.

En 1959 Sellek y Frade<sup>18</sup> y <sup>21</sup> realizaron un estudio comparativo de la prueba del acetato de cobre y el de la actividad de las transaminasas glutámica oxalacética y glutámica pirúvica en el suero de pacientes con hepatopatías, llegando a las siguientes conclusiones: es evidente que aunque los resultados de la prueba Sellek-Frade y los de las transaminasas glutámica oxalacética y glutámica pirúvica, coinciden en las hepatitis virales, ícteros obstructivos, esteatosis hepáticas, etc., la determinación de la actividad en el suero de las referidas transaminasas no puede sustituir a la prueba del acetato de cobre en el diagnóstico de las hepatopatías, por su fracaso en las cirrosis hepáticas y no tener las características de simplicidad,

estabilidad de los reactivos, costo insignificante, preparación rápida y fácil de los reactivos, corto espacio de tiempo para su ejecución y preciso control clínico en segundos. Además de que la determinación de las transaminasas glutámica oxalacética y pirúvica del suero, son afectadas por daños en otros órganos y contener la bilis normal según Shansky, Shamagranoff y Sherry, grandes cantidades de transaminasa glutámica oxalacética, lo cual enmascara frente a la clínica los verdaderos resultados.

En resumen Sellek y Frade estiman que la dosificación de la transaminasa glutámica oxalacética del suero, debe excluirse del estudio de las afecciones hepatobiliares, pues ofrece un elevado porcentaje de positivos en cuadros clínicos diversos, ajenos al estado funcional de las células hepáticas. La medida de la transaminasa glutámica pirúvica es más segura y específica y su empleo debe combinarse en los períodos tempranos de las hepatitis infecciosas a las pruebas de Hanger, timol y acetato de cobre.

Nguyen-The-Minh<sup>21</sup> en la Cátedra de Terapéutica Clínica Médica de la Facultad de Medicina de París en el Hospital "Saint Antoine", servicio del profesor André Lemaire, estudia el mecanismo de la prueba y encuentra que en el 92% de los casos, que una prueba positiva traduce hiperglobulinemia y más precisamente una hipergamaglobulinemia. En sus estudios de 14 casos de cirrosis hepáticas, 13 veces la reacción era fuertemente positiva y la intensidad de la floculación, parecía corresponder a la gravedad de la evolución clínica. El hecho de más interés es el de que la reacción, según Nguyen-The-Minh se muestra positiva en un estadio en el que la cirrosis se manifiesta por un hígado grueso, siendo monosintomática,

entre tanto la laparoscopia muestra su naturaleza cirrótica.

Los resultados de la reacción Sellek-Frade son enteramente comparables a los de las reacciones de MacLagan, Gros y Hanger. Mas ella parece ser más sensible que las pruebas clásicas; pues la misma se revela como positiva, cuando las pruebas clásicas son todavía negativas.

De 11 casos de cirrosis hepáticas de etiología imprecisa, se encuentran 8 reacciones positivas. En los tres casos negativos se trataba de cirrosis no descompensadas y el hígado no era hipertrofico.

De 8 casos de hepatitis viral en 8 la prueba resultó positiva. La positividad es franca o débil y se hace negativa una semana después de la desaparición del íctero. En las hepatitis virales como en la cirrosis, la sensibilidad de la prueba es más grande que las de las pruebas clásicas. En 2 casos de amebiasis hepáticas la prueba fue negativa en ambos. En 20 casos de ícteros obstructivos el resultado fue el siguiente: de 14 casos de ícteros obstructivos por litiasis la prueba es negativa en 12. Los dos casos positivos estaban complicados por angiocolitis. De seis casos de ícteros neoplásicos, cinco veces la reacción era completamente negativa y una vez débilmente positiva.

En resumen dice Nguyen-The-Minh, la prueba de Sellek-Frade es una reacción simple, más sensible que las pruebas clásicas. Ella es más específica de cirrosis donde muestra una positividad fuerte o muy fuerte. Francamente positiva en las hepatitis y negativa en el curso de los ícteros obstructivos. Ella representa un elemento de diagnóstico diferencial de gran valor en los casos de etiología difícil en clínica, por consiguiente es ella una prueba meritoria,

para ser grandemente empleada en las hepatopatías.

Castillo,<sup>28</sup> profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad de Lima, realiza en el Laboratorio Clínico del Hospital 2 de Mayo, la reacción en más de seis mil casos y dice textualmente: "Desde 1957 en que los doctores Antonio Sellek y Alejandro del Frade, del Hospital Municipal de Infancia de la Habana, me distinguieron con el privilegio de su técnica, la venimos empleando sistemáticamente; primero con la lógica reticencia de una nula experiencia, después comparativamente con las reacciones ya conocidas y últimamente con la certidumbre de que la reacción Sellek-Frade sola es capaz de evidenciar el daño hepático, tanto en extensión como en profundidad; según la extensión del mesénquima. En esta técnica se conjugan fidelidad en sus expresiones, bajo costo, fácil ejecución, menor tiempo y finalmente un reactivo que puede guardarse indefinidamente en refrigeración".

Granato y Boavista,<sup>29</sup> en un trabajo de la Primera Cátedra de Clínica Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Brasil, en un intento y a fin de estudiar el valor de la prueba Sellek-Frade, han hecho la comparación simultánea entre los resultados de la reacción y varias de floculación: Hanger, Ducci, MacLagan, Neefe, Wuhrman y Wunderly, así como la dosificación de las globulinas séricas. Ellos estudian 150 pacientes de los cuales 116 presentan enfermedades hepáticas: hepatitis infecciosas, cirrosis hepática y Shistomiasis hepatoesplénica. Resultados concordantes se encuentran en cerca de 2/3 de los casos (62%). Sólo en uno la discordancia fue favorable a la reacción Sellek-Frade.

En un trabajo de la Cátedra de Enfermedades Nerviosas y Mentales de la Universidad de Bari, Cazzato estudia el

comportamiento de la reacción Sellek-Frade en 30 pacientes esquizofrénicos, encontrando una positividad de varios grados en el 66.6% de los casos. El discute las conclusiones de los resultados a la luz de las relaciones entre variaciones hematoproteicas, reacciones de eucoloidia sérica y estados de dishepatismo.

El profesor André Lemaire,<sup>30</sup> de la Facultad de Medicina de la Universidad de París y Nguyen-The-Minh, en un trabajo titulado "Los tests de floculation dan les maladies du foie" expresan lo siguiente: "Por la divergencia de sensibilidad y especificidad de cada una de estas pruebas, debemos escoger las que se complementan y al practicarse simultáneamente permitan la mejor discriminación de los procesos patológicos del hígado, que clínicamente presentan manifestaciones similares. Ellos proponen la asociación de tres reacciones:

La prueba del timol de MacLagan.

La reacción al acetato de cobre de Sellek-Frade.

La reacción del rojo coloidal de Ducci.

En un íctero reciente la positividad pronunciada de las pruebas de MacLagan y Sellek-Frade, sugiere en seguida una hepatitis infecciosa y la ejecución repetida de estas reacciones, permitirá la observación de su evolución, su negatividad habla en favor de una obstrucción de las vías biliares. Su divergencia especialmente una prueba de timol negativa o subnormal, mientras que la de Sellek-Frade es muy positiva, debe hacer pensar en la eventualidad de un brote icterico en el curso de una cirrosis. Igualmente una reacción de Sellek-Frade, siendo fuertemente positiva, con una prueba de MacLagan débil o negativa sugiere cirrosis.

Celsi y Trevisán, en un trabajo realizado en la Primera Cátedra de Clínica Médica de la Universidad de Buenos Aires (Prof. Egidio S. Mazzei), titulado

"Valor diagnóstico de la reacción Sellek-Frade en las enfermedades hepatobiliares", se examina la prueba en un total de 259 casos, entre pacientes internados en las Salas V y VII del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y del consultorio de "Hepatología" anexo.

Ellos obtuvieron una reacción positiva en el 97.2% de 36 casos de hepatitis y en el 98% de 49 casos de cirrosis. En casos de ícteros obstructivos no complicados se hallaron cifras normales en el 100%; mientras que en los ícteros complicados la prueba era positiva en el 87.5%. Es la prueba de mayor valor dicen Celsi y Trevisán para el diagnóstico diferencial de los ícteros.

La prueba de Sellek-Frade concluyen los autores, por su sencillez y corto espacio de tiempo para su ejecución, por la estabilidad y larga conservación de los reactivos, sensibilidad para señalar daño hepatocelular o alteraciones del equilibrio coloidal en afecciones diversas no hepatobiliares, reúne las condiciones necesarias, para ser empleada con ventaja en la batería de pruebas que componen el hepatograma.

Solari y Botaro,<sup>32</sup> del Hospital Galliera de Génova, servicio de la II Cátedra de Clínica Médica (Prof. G. Michetti), realizaron un estudio de la prueba de Sellek-Frade en 100 enfermos. Ellos practicaron conjuntamente las reacciones de Takata-Dohmato, MacLagan, Kunkel y Wunderly-Wuhsman y en la mayoría de los casos estudian mediante electroforesis los distintos factores globulínicos. Ellos encuentran que la prueba del acetato de cobre es constantemente positiva en las cirrosis y hepatitis crónicas en las cuales hay la mayor destrucción de la arquitectura del lóbulo hepático y manifestaciones imponentes de proliferación del sistema retículoendotelial, con hipoproteinemia consi-

guiente. En cuanto al comportamiento de la reacción con las otras pruebas de inestabilidad coloidal, se nota concordancia de los resultados. Destacan dichos autores como en las hepatitis crónicas de evolución fibrótica, la reacción es especialmente sensible; siendo constantemente positiva en todos los casos en que las otras pruebas de eucolodia no se han precisado todavía.

Los autores concluyen su trabajo con las siguientes palabras "Podemos afirmar la validez de la reacción Sellek-Frade como prueba de una alteración del cuadro proteínico, y corroboramos su utilidad en el diagnóstico de las afecciones hepáticas, y justificamos ampliamente su inclusión en la constelación de las pruebas de eucolodia".

Galmarini,<sup>40</sup> presentó ante la Sociedad Argentina de Gastroenterología celebrada en Buenos Aires el día 3 de noviembre de 1961 un trabajo titulado "Valoración de la reacción turbidométrica del acetato de cobre".

Después de dos años de estudiar cuidadosamente la prueba con aproximadamente 1000 (mil) determinaciones hechas en ese lapso de tiempo en forma personal, habiendo estudiado 120 hepatopatías, 40 enfermos extrahepáticos y 29 normales, confirma la inexistencia de resultados positivos en normales. En las enfermedades hepáticas encuentra la reacción positiva por ejemplo en las hepatitis virales en un 100% y en un 77% en las cirrosis. En cambio resultados normales encontró en los ícteros obstructivos.

Los resultados de la prueba según Galmarini, serían semejantes a los de las reacciones clásicas de Kunkel y timol. Su positividad guarda relación con la hipoalbuminemia y la hipergamaglobulinemia. Es para él una prueba de labilidad coloidal del suero sumamente práctica y recomienda su uso.

Padolechia, Panaro y Mejorano,<sup>41</sup> en el Instituto de Patología Médica Especial y Metodología Clínica de la Universidad de Bari, realizan un trabajo titulado "Experiencia Clínica e Investigación Fisiopatológica sobre la nueva prueba de labilidad coloidal de Sellek-Frade". Ellos llegan a las siguientes conclusiones: 1. La reacción Sellek-Frade como las otras pruebas de labilidad coloidal del suero es una prueba no específica y cuyo resultado positivo es debido en general a un aumento de las globulinas especialmente de la fracción gama. 2. Ella muestra un notable paralelismo con las reacciones de Wunderly y Takata-Gros. 3. La reacción es siempre negativa en sujetos sanos. 4. Ella posee un gran valor en el estudio de las hepatopatías. 5. En el íctero obstructivo de tipo calculoso, la reacción es siempre negativa, siendo en consecuencia útil, para seguir el curso de diversos estados morbosos. 6. Nos parece que esta nueva prueba es meritoria para ser usada de rutina en el Laboratorio Clínico.

Duarte, en la Clínica de la Maternidad "David Restrepo" de Bogotá, estudia la prueba y llega a la siguiente conclusión: "En embarazadas normales la reacción es negativa lo mismo que en niños con eritroblastosis o ictericia hemolítica, pacientes luéticos y embarazadas diabéticas. En las hepatitis virales la reacción es siempre positiva".

Vio<sup>42</sup> en el Instituto de Clínica y Terapéutica Quirúrgica de la Universidad de Bologna, realiza un estudio sobre el comportamiento de la prueba Sellek-Frade del acetato de cobre en 84 pacientes ictericos con el fin de estudiar su utilidad práctica en el diagnóstico diferencial de los ícteros. El encuentra la reacción de Sellek-Frade positiva en el 100% de los ícteros hepatocelulares y negativa en el 100% de los ícteros

mecánicos y en un 100% de los hemolíticos. La prueba de Jirgl fue positiva en el 97.8% de los ícteros mecánicos y negativa en el 91.5% de los ícteros hepatocelulares y en el 100% de los hemolíticos.

Los resultados obtenidos según Vio, demuestran que la prueba Sellek-Frade, por si sola no es suficiente, para el diagnóstico de determinado tipo de íctero, pero que asociada a la prueba de Jirgl, se eleva con este fin notablemente su valor.

Muntoni<sup>43</sup> en el Instituto de Medicina Preventiva de la Universidad de Cagliari (Cerdeña), efectúa un estudio de la reacción Sellek-Frade en el diagnóstico de las afecciones hepáticas en 131 casos, encontrando una positividad constante de la prueba en las cirrosis y en las esclerosis por estasis y negatividad frecuente en los ícteros colostáticos.

Al comienzo de las hepatitis virales la reacción puede ser negativa. En el período de efervescencia de las hepatitis virales sus resultados constituyen un útil criterio pronóstico.

Vietoritz<sup>43</sup> de Hungría, estudia la prueba en 105 casos de hepatitis agudas y crónicas, cirrosis hepáticas, intoxicaciones y colangitis. En 57 casos de ícteros obstructivos y 18 de descompensación cardíaca y en 100 pacientes con enfermedades diversas. El llega a las siguientes conclusiones: 1. En las hepatitis agudas epidémicas las reacciones de Sellek-Frade y Mallen muestran una más temprana positividad que la prueba de turbidez del timol. La curación clínica es también más tempranamente indicada. La negatividad puede ser lograda en un tiempo más corto. 2. En casos de hepatitis crónica cirrótica, similarmente a la prueba de Mallen, la reacción Sellek-Frade da resultados más seguros que la

prueba del timol. 3. En casos de lesiones hepáticas por alcoholismo ella muestra una positividad al mismo tiempo que la del timol y más tempranamente que la de Mallen. 4. En casos de ícteros obstructivos sin complicación las tres pruebas son negativas. Cuando existe lesión del parénquima hepático o complicaciones por infección una positividad de diferente intensidad es observada. 5. En casos de descompensación cardíaca, la prueba da resultados positivos de variable intensidad. Ella muestra un decrecimiento de la intensidad de la positividad como resultado de una efectiva terapéutica y compensación.

Baldi y Ferrara,<sup>44</sup> de Salerno (Italia), han examinado un grupo de 74 enfermos con diversas afecciones del hígado y un grupo de 20 sujetos normales. En todos los pacientes se han practicado las reacciones de Takata-Ara-Ucko, MacLagan, Kunkel y Hanger. En sus investigaciones notan un discreto porcentaje de positividad del test de Sellek-Frade en las hepatitis virales aún cuando otras pruebas son negativas. En tales casos ha existido concordancia entre el test al acetato de cobre y el aumento de las transaminasas especialmente la pirúvica. En las hepatitis crónicas y cirrosis hepáticas, la prueba se ha revelado como constantemente positiva. En relación a la electroforesis se encuentra aumento de la globulina gama, que se observa en la cirrosis y hepatitis de evolución fibrótica. Como conclusión de sus investigaciones afirman Baldi y Ferrara, la validez de la prueba Sellek-Frade, como prueba de labilidad digna de incluirse en la batería de las reacciones clásicas (Hanger, MacLagan, etc.) y el paralelismo del comportamiento entre la reacción del acetato de cobre y la de Hanger, considerada como la más sensible entre las pruebas de labilidad coloidal del suero. Por otra parte

la facilidad de ejecución, la simplicidad de preparación y estabilidad del reactivo hacen de él un test al alcance de todos.

Viranuvatti y otros<sup>55</sup> estudian en la Universidad de Ciencias Médicas de Bangkok, Thailandia, las pruebas del acetato de cobre y la de lugol sobre 1104 casos. De sus investigaciones llegan a la conclusión que ambas pruebas dan resultados similares, aún cuando su mecanismo es distinto.

Ionescu y otros de Rumania,<sup>42</sup> describen su experiencia y los resultados obtenidos, con diversas pruebas de disproteïnemia, con especial referencia a la reacción Sellek-Frade.

Papadhimitri<sup>53</sup> en un artículo titulado "La prueba de Sellek-Frade (al acetato de cobre) en la hepatitis viral y su evaluación clínica", publicado en el Boletín de la Universidad de Tirana (Albania), llega a las siguientes conclusiones, después de realizar 303 determinaciones en 100 casos de hepatitis viral (29 formas benignas, 52 medianamente graves, 12 graves y 7 prolongadas). 1. El test de Sellek-Frade es una reacción inespecífica de labilidad coloidal del suero, que refleja a menudo hipergamaglobulinemia y parcialmente hiperbetaglobulinemia. 2. Existe un paralelismo entre las pruebas de Sellek-Frade y las de MacLagan, Wuchman-Wunderly. 3. Hay una correlación directa entre la frecuencia de la positividad de la reacción al acetato de cobre y el grado de intensidad de la hepatitis viral. 4. El mayor número de positivos se observa en el acmé del proceso en todas las formas y el menor durante la convalecencia. 5. Tanto por sus ventajas como por la particular simplicidad de su técnica y su valor clínico, el test de Sellek-Frade puede ser ampliamente usado en la práctica de nuestros Hospitales en Albania, usándola entre otras como criterio para determinar el



grado de alteración o la restitución funcional del hígado durante la evolución de la hepatitis viral, así como de otras hepatopatías.

Peg y Puyol<sup>57, 63</sup> de Zaragoza (España) en un trabajo presentado ante el V Congreso Internacional de Patología Clínica, celebrado en México, en 1963 titulado "Estudio químico-clínico de la reacción Sellek-Frade", practican la prueba en 103 pacientes afectados de enfermedades hepáticas, comparando los resultados paralelamente con las reacciones corrientemente utilizadas en la práctica: Cadmio, Weltman, Takata-Ara, MacLagan, Kunkel y gamaglobulinas. Ellos llegan a la conclusión de que la reacción Sellek-Frade, puede ser admitida con toda garantía, dentro de aquellas de que el médico dispone para el estudio de la labilidad de las proteínas séricas.

Gómez Andino,<sup>54</sup> Catedrático de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras, estudia la prueba en 703 casos (Hepatitis virales, cirrosis hepáticas, ícteros obstructivos y personas normales). Considera a la prueba de Sellek-Frade de alto valor diagnóstico. En las hepatitis virales (205 pacientes) la reacción del acetato de cobre dio un 97% de positividad y la de Hanger lo fue en un 93%. En individuos normales la reacción Sellek-Frade se comportó siempre como negativa.

El profesor Shaposnik,<sup>55</sup> titular de la Primera Cátedra de Clínica Médica de la Facultad de Medicina de La Plata, en unión de Milman y Cacciatore, realizan un estudio de la prueba del acetato de cobre en 110 pacientes. Se correlacionó la prueba con otras de floculación, las fracciones proteicas por electroforesis, estudio histológico por punción biopsia o estudio necrópsico; en una parte de los enfermos. Además se realizó la prueba en sujetos normales que tenían otros "tests" de floculación normales; en

todos la reacción del cobre resultó negativa. Ellos llegan a las siguientes conclusiones: 1. La prueba del acetato de cobre es negativa en sujetos normales, es positiva en la mayoría de los casos de cirrosis y en una elevada proporción de casos de hepatitis. 2. En las ictericias obstructivas la reacción del cobre es negativa. 3. La reacción del cobre comparte con las otras pruebas de floculación el valor diagnóstico indirecto de disfunción hepática, demostrando la existencia de una labilidad proteica sanguínea. 4. Ofrece el valor práctico de su alta sensibilidad del reactivo, simplicidad de ejecución y bajo costo.

Pittera y otros<sup>59</sup> en el Instituto de Patología Especial y Metodología Clínica de la Universidad de Catania (Sicilia, Italia), realizan un estudio de la prueba de Sellek-Frade, en 204 casos de enfermedades hepáticas en fase aguda y en resolución, cirrosis hepática, atrofia amarilla aguda, íctero colostático, etc., comparada con otras pruebas de labilidad serocoloidal (Hanger, MacLagan, Ducci Close, Mallen, etc.). Ellos llegan a la conclusión de que aún careciendo de elementos para establecer el significado biológico de la misma, han podido observar que la prueba del acetato de cobre es la más sensible de todas y la más estrechamente correlacionada a la función hepática. Ella muestra asociada a su sensibilidad una alta especificidad en la investigación de las enfermedades del hígado. Las otras pruebas tienen una sensibilidad muy limitada y una escasa especificidad en la investigación de la función hepática.

#### COMENTARIOS

Una revisión de la literatura internacional revela, que casi la totalidad de los autores, están de acuerdo en considerar que la prueba de Sellek-Frade del acetato de cobre es positiva de un

96 a un 100% de los casos de cirrosis (Sellek-Frade, Castillo y López Fernández, Fraga, Solari y Botaro, Nguyen-The-Minh, Celsi y Trevisán, Victorisz, Muntoni, Shaposnik, Pittera etc.). La prueba en las cirrosis hepáticas es fuertemente positiva y la intensidad de la floculación, corresponde generalmente a la gravedad de la evolución clínica (Sellek-Frade, Nguyen-The-Minh, Palolechia, Pittera etc.). El grado de positividad de la reacción en diversas determinaciones en el curso de la enfermedad, constituye un elemento de valor para el pronóstico y evolución de la misma. Un hecho interesante lo es el de que la reacción puede ser positiva aunque débilmente en un estadio en el que la cirrosis se manifiesta, solamente por un hígado grande casi monosintomático y en el que la laparoscopia muestra su naturaleza cirrótica (Nguyen-The-Minh).

En las cirrosis compensadas la prueba da resultados negativos. Una retención de bromosulfaleína en estos casos es debida a trastornos circulatorios.

Se comprueba por las estadísticas mundiales de que la prueba Sellek-Frade en las cirrosis hepáticas, es más sensible que las reacciones clásicas de Takata-Ara, Hanger, MacLagan y Wunderly-Wuchman.

En las estadísticas de la primera Cátedra de Clínica Médica de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, ella sería positiva en el 98% de las cirrosis hepáticas; mientras que la del timol lo es en un 91.8% y la del cadmio en el 83.7% para el profesor Schaposnik, titular de la primera Cátedra de Clínica Médica de la Facultad de Ciencias Médicas de La Plata, la prueba del acetato de cobre en las cirrosis hepáticas tendría una positividad de un 96.6%.

Como es sabido en las cirrosis alcohólicas o nutritivas la prueba de turbi-

dez del timol, no aumenta o presenta valores moderadamente normales (Popper).

Para el profesor André Lemaire, titular de la Cátedra de Terapéutica Clínica de la Facultad de Medicina de París, la prueba del timol no es bastante sensible en cirrosis y en este sentido debe ceder el paso a la prueba Sellek-Frade. Para él cuando se observa una prueba de timol negativa o muy débilmente positiva; mientras que la de Sellek-Frade, es fuertemente positiva se puede considerar la eventualidad de pusee icterico grave en el curso de una cirrosis, hasta entonces latente. Una positividad débil de la reacción no contradice el diagnóstico de cirrosis.

En las cirrosis hepáticas hay una disminución en la concentración de la serina y un aumento de la globulina gama, lo cual puede variar según el estadio de la enfermedad y las condiciones físicas del paciente.

La prueba del acetato de cobre es muy útil, para el diagnóstico etiológico de las hepatitis virales (Castillo y López Fernández).

En la hepatitis viral, la importancia de la reacción ha sido destacada por casi todos los autores. En ella según Sellek y Frade la reacción es positiva en el 100% de los casos. El grado de positividad es variable según el período evolutivo de la enfermedad. Durante el período de estado las cifras son altas, existiendo una correlación directa entre la positividad de la reacción y el grado de intensidad de la hepatitis viral. La persistencia de la positividad de la prueba en la convalecencia nos indica que la restitución del daño hepatocelular, no se efectúa satisfactoriamente y que nos encontramos frente a una forma prolongada o crónica o a una hepatitis que evoluciona a la cirrosis (cirrosis post-hepatitis).

Para Celsi y Trevisán de la Primera Cátedra de Clínica Médica de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, la reacción del acetato de cobre es positiva en el 97.2%, la del timol 100%, sulfato de zinc 91.6%, y la del sulfato de cadmio 33.3%. Nguyen-The-Minh la encuentra positiva en un 100%.

Galmarini en Buenos Aires, observa que la reacción en el período de estado de la enfermedad, da un 100% de positivos; aunque no en todos los casos los valores adquieren cifras patológicas, como sucede en el período pre o subictérico inicial. Observaciones similares han sido hechas por Muntoni de la Universidad de Cagliari y Solari, y Botaro de la Universidad de Génova.

Lo anterior se debe a que en el período inicial de la enfermedad, se presenta un aumento de la betaglobulina. La globulina gama se eleva con la evolución del proceso, siendo por ello que al comienzo la positividad de la prueba no existe de una manera constante; pero sí posteriormente cuando practicamos la reacción en serie.

Para Papadhimitri de la Clínica de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Tirana (Albania), el mayor número de positivos se observa en el acmé del proceso en todas las formas de hepatitis viral (benigna, medianamente grave, grave y prolongada) y el menor durante la convalecencia.

En la hepatitis viral como en las cirrosis, la positividad de la reacción está relacionada a un aumento de la globulina gama, lo cual existe en todos los procesos en que hay irritación o reacción mesenquimal.

En general la práctica señala que la reacción es de gran valor para conocer el curso evolutivo de la enfermedad y como guía del tratamiento. Su negatividad en exámenes repetidos asegura la

curación del enfermo. En los casos de hepatitis virales graves y necrosis hepáticas, con aumento masivo de globulina gama, la reacción es fuertemente positiva y sin embargo la transaminasa glutámica pirúvica, ofrece valores normales.

En los casos de ícteros obstructivos puros, la prueba es negativa en el 100% de los casos (Sellek y Frade, Celsi y Trevisán, Nguyen-The-Minh, Padolechia, Solari y Botaro, Baldi y Ferrara, Padolechia, Pittera, etc.). Al prolongarse la obstrucción cuando la fibrosis o la infección aparecen, la reacción se hace positiva. Una reacción negativa en presencia de íctero intenso con fosfatasa alcalina elevada, califica el proceso de obstrucción biliar extrahepática o de colestasis intrahepática.

Para Nguyen-The-Minh la prueba es positiva en el 100% de los ícteros complicados. Según Celsi y Trevisán su positividad es de un 87.5%. La reacción de Sellek-Frade dicen ellos, es la mejor prueba para el diagnóstico diferencial de los ícteros.

Para Vio de la Universidad de Bologna la prueba de Sellek-Frade no es suficiente por sí sola para el diagnóstico de determinado tipo de íctero; pero que asociada a la prueba de Jirgl, se eleva con este fin notablemente su valor.

Es indiscutible que la realización simultánea de la reacción Sellek-Frade y la determinación de la fosfatasa alcalina o de la prueba de Jirgl combinadas, permiten hacer el diagnóstico de íctero obstructivo, tanto del tipo puro como de aquel en que se ha desarrollado un compromiso del parénquima hepático, como ha sido personalmente confirmado por Sellek, Frade y Perelló en un artículo titulado "Valor de la reacción de Jirgl en el diagnóstico de los ícteros obstructivos".

En los casos de atrofia amarilla aguda del hígado por hepatitis infecciosa, la prueba es positiva en el 100% de los casos (Sellek y Frade, Padolechia, Pittera, etc.) En las de origen tóxico la prueba es negativa (Sellek y Frade). En las hepatitis tóxicas de origen químico, la prueba es negativa, al no existir proliferación de las células de Kupffer y elevación de la globulina gama.

Para Solari y Botaro de la Universidad de Génova, en las hepatitis crónicas a evolución fibrótica, la reacción es constantemente positiva y muestra una sensibilidad precoz comparada con las reacciones de Takata-Gros, Kunkel y MacLagan. Baldi y Ferrara expresan que de 32 enfermos de hepatitis crónicas en 29 fue positiva. Para Pittera de la Universidad de Catagnia, la reacción es positiva en el 100% de los casos. La positividad de la reacción en los casos de hepatitis crónicas se atribuye a un aumento de la globulina gama observada en tales casos. En el síndrome de Banti la prueba es positiva en el 100% de los casos; de acuerdo con las estadísticas de 14 casos estudiados en la Universidad de Bari. Pittera obtiene cifras similares en siete casos. Sellek y Frade reportaron en una de sus comunicaciones generales un caso con aumento de la globulina gama y reacciones positivas de Hanger (+) y Sellek-Frade (++++). La prueba del timol era normal. (3.4 unidades). En las colecistitis agudas y crónicas que se acompañan de daño hepático la prueba es positiva. Ella es negativa en las colecistitis sin hepatitis. En las lesiones hepáticas metabólicas tal como las observadas en la hemocromatosis, la reacción según Nguyen-The-Minh, practicada en 3 casos se reveló positiva en dos; fue así en una cirrosis con perihepatitis y en una cirrosis metatérica.

En los icteros hemolíticos congénitos por conflicto maternofetal, la prueba es negativa en el 100% de los pacientes; por el contrario en los icteros hemolíticos por sepsis, con producción excesiva de gamaglobulina, la reacción es positiva en el 66% de los casos. En los casos de favismo (íctero hemoglobilínúrico) la prueba es negativa en un 100% (Muntoni). En los casos de anemia a células falciformes no ictericas, la prueba es negativa. Ahora bien, cuando existen lesiones hepatocelulares, la reacción se hace positiva y se acompaña de la presencia de hiperbilirrubinemia directa.

En los icteros neoplásicos la prueba es negativa y muy rara vez débilmente positiva. Nguyen-The-Minh encuentra resultados negativos en cinco de seis casos de neoplasias hepáticas. Según Solari y Botaro las neoplasias primarias del hígado dan resultados negativos. Sin embargo, en las metástasis hepáticas se nota una positividad ligera. En general un aumento de retención de la bromosulfaleína, principalmente por trastornos circulatorios, sin correlación de positividad por la prueba del acetato de cobre y con nivel normal de gamaglobulina es sospechosa de metástasis hepática.

En casos de esteatosis hepáticas y necrosis focal, diagnosticadas por biopsia o autopsia, la prueba del acetato de cobre es negativa en el 100% de los casos, al igual que las reacciones de Hanger y timol.

Como es sabido las dietas deficientes y prolongadas, terminan produciendo afecciones hepáticas. En ellas la prueba fue positiva en un 60%. (Confirmada por biopsia).

En niños con diarreas graves y patología hepática, la prueba fue positiva en un 55%.

La prueba fue positiva en un 75% de los casos de agenesia de las vías biliares.

Como quiera que un daño hepático, constituye parte esencial de la patología de otras enfermedades, puede en consecuencia observarse reacciones positivas en ellas (mononucleosis infecciosa, etc.)

En pacientes esquizofrénicos, la reacción es positiva en el 66.6% de los casos; según Cazzato, de la Clínica de Enfermedades Nerviosas y Mentales de la Universidad de Bari.

En los abscesos amebicos del hígado y en las hepatitis amebicas, los resultados de la prueba del acetato de cobre, son en general negativos (Castillo y López Fernández, Fraga, Nguyen-The-Minh). Viranivati de Tailandia en un estudio sobre pruebas de función hepática en amebiasis hepática, encuentra la reacción positiva en el 71.4%. La de Hanger en el 43.2% y la del timol de MagLagan en un 38.8%.

En los casos de nefrosis (aumento de alfa globulinas), diabetes mellitus (aumento de la alfa<sub>2</sub>), enfermedad de Hodgkin, leucemias y hemopatías en general la prueba es negativa.

En un estudio sobre 25 casos de hipotiroidismo con cifras bajas de iodo proteico, se encontró resultados negativos en todos (Sellek, Castro y H. Hernández). En casos de hipertiroidismo como consecuencia de la agresión hepática, se determinan lesiones, encontrándose pruebas de acetato de cobre positivas fuertes (+++ y ++++). En todos los casos las cifras de iodo proteico eran elevadas (8.9 gamas y más).

Según los datos ofrecidos por Nguyen-The-Minh, la reacción en su estadística dió resultados positivos en cuatro de seis casos de tuberculosis pulmonar cavitaria y en dos de abscesos pulmonares. En estos últimos la reacción se hizo nega-

tiva con el tratamiento. También Solari y Botaro, han señalado la existencia de positivos en dicha enfermedad. Como es sabido en un 86% de los casos de tuberculosis pulmonar, existe hipergamaglobulinemia y varios autores han estudiado la influencia de las alteraciones de la función hepática, con el auxilio de las pruebas de labilidad coloidal, en el curso del tratamiento de esta enfermedad.

La reacción es positiva intensa en casos de leishmaniosis visceral.

En casos de mieloma múltiple, la positividad de la prueba depende del tipo de proteína presente. Castillo y López Fernández, la encuentran positiva intensa en el de globulina gama y negativa en el alfa. En los casos positivos no hay retención de bromosulfaleína.

En la insuficiencia cardíaca congestiva la prueba sería positiva en un porcentaje variable de casos. Algunos autores dan cifras de un 50 a un 100%. Junto a la positividad de la prueba se encuentran cifras elevadas de globulina gama. Nguyen-The-Minh de cuatro casos de insuficiencia cardíaca congestiva, observa en uno la reacción débilmente positiva. Se trataba de un hígado cardíaco irreductible, que evolucionaba hacia una cirrosis.

En casos de paludismo se observan reacciones positivas fuertes. Según los autores ello indicaría un trastorno del sistema reticuloendotelial, más que del hígado.

En caso de hígado graso, la reacción es negativa o muy débilmente positiva.

En la fiebre reumática, la prueba da resultados positivos en un limitado número de casos. Ello estaría relacionado a un aumento de la globulina gama y a un descenso de la serina.

La reacción es positiva en el lupus eritematoso disseminado, teniendo sus resultados valor pronóstico, pues su gra-

do de positividad estaría relacionado con el de las mediciones de la globulina gama.

En sujetos normales la reacción es negativa en el 100% de los casos. Ella es una prueba que no da resultados falsamente positivos. Tal es el criterio unánime de todos los investigadores.

El método es universalmente recomendado por exacto y práctico y por ser de técnica rápida y sencilla.

La prueba está fundada en el hecho de que los sueros de pacientes con ciertas enfermedades hepáticas, cuando son adicionados a una solución apropiada de acetato de cobre, producen varios grados de turbidez y floculación, mientras que los de individuos normales, producen poca o ninguna turbidez.

La positividad de la prueba depende de una alteración cualitativa y cuantitativa de la globulina gama. Siendo además este hecho acentuado por modificaciones cuantitativas de otras proteínas del plasma. Cuando los niveles de la serina son bajos y los de la globulina gama altos se produce la precipitación.

Sellek y Frade en sus comunicaciones originales reportaron, que por electroforesis habían encontrado, un decrecimiento de la serina en un 66.6% y un aumento de las globulinas gama en un 100% en los casos de cirrosis hepáticas y hepatitis virales con reacción positiva. La globulina beta fue ligeramente aumentada en un 16%. De los hechos anteriores se deduce que el reactivo de acetato de cobre, reacciona principalmente, sino exclusivamente con la fracción gama de las globulinas del suero.

Aún cuando diversos autores han propuesto modificaciones a la lectura de los resultados, recomendando hacerlo en vez de a los cinco minutos, a los 15 (Galmarini) o a los veinte (Fraga) y

otros como Victorisz, con el propósito de hacer la lectura de la floculación rápida a los 30 minutos, hacen la dilución con solución salina normal de cloruro de sodio. No somos partidarios en ningún sentido de modificaciones a la lectura original, en sus tres modalidades: Standard, cuantitativa y ultramicrométodo.

La prueba del acetato de cobre tiene un mayor valor que la electroforesis en el diagnóstico de las hepatopatías, pues lo esencial puede ser por ella obtenido en forma simple, sin necesidad de recurrir a métodos complicados como la electroforesis.

En un estudio sobre 50 casos aparentemente normales, donde se efectuó simultáneamente por Sellek y Frade la prueba del acetato de cobre y la de la bromosulfaleína, para identificar lesión hepática, se encontró una concordancia absoluta entre ambas pruebas. Sin embargo, la prueba de la bromosulfaleína, como es sabido no tiene valor para el diagnóstico diferencial de los ícteros y dar resultados anormales falsos, si la insuficiencia hepatocelular se acompaña de trastornos circulatorios. En general la prueba de la bromosulfaleína es menos útil que la prueba del acetato de cobre en hepatopatía. Su valor clínico se reduce a aquellos casos, en los cuales no hay íctero, ni trastornos circulatorios hepáticos. Además la prueba de la bromosulfaleína, ofrece inconvenientes y peligros para la vida del paciente.

Comparada con la reacción de Takata-Ara, se encuentra que esta reacción clásica, sólo da resultados positivos en casos avanzados de cirrosis, siendo negativa en los tempranos.

Como prueba general de función hepática, se encuentra que la misma es más sensible en las cirrosis hepáticas,

que las reacciones de Takata-Ara, MacLagan, Weltman y Cadmio.

Realizada simultáneamente la prueba del acetato de cobre y la determinación de la actividad de las transaminasas glutámica oxalacética y glutámica pirúvica, en el suero de niños con hepatopatías, se encuentra concordancia en general en las hepatitis virales, ícteros obstructivos y esteatosis hepáticas, etc. En las cirrosis hepáticas carecen de valor dichas enzimas, así como para seguir el curso de las hepatitis virales.

La transaminasa glutámica oxalacética del suero es afectada por daños celulares en otros órganos y por contener la bilis normal grandes cantidades de la misma según los trabajos de Shinsky, Shamaganoff y Cherry. La gran utilidad de dichas enzimas, especialmente de la pirúvica, reside al comienzo de las hepatitis virales, donde sus resultados pueden coincidir o no con los de la prueba del acetato de cobre. Ellas disminuyen rápidamente sus valores con el progreso de la enfermedad.

La prueba del acetato de cobre no ofrece inconvenientes, ni para el paciente, así como tampoco para el técnico o médico especialista de laboratorio clínico, pues libera a éstos de la manipulación o inhalación de sustancias tóxicas, usadas en otras pruebas: bicloruro de mercurio, iodo, cadmio, etc. Este último metal y sus compuestos son tóxicos ingeridos o inhalados y cancerígenos para el hombre.

#### SUMARIO

En la V Convención Bional de la Sociedad Cubana de Médicos Laboratoristas Clínicos, celebrada en la Habana en diciembre de 1955, los autores comunicaron los resultados de una nueva reacción de labilidad serocoloidal

para el diagnóstico y pronóstico de ciertas enfermedades hepáticas, usando como reactivo exclusivo una solución apropiada de acetato de cobre. La reacción ha sido extensamente utilizada por investigadores de América, Europa y Asia. La prueba es positiva en las cirrosis hepáticas de un 96.6 a un 100%. Ella es fuertemente positiva y la intensidad de la floculación, corresponde generalmente a la gravedad de la evolución clínica. Las estadísticas mundiales revelan que ella es más sensible en las cirrosis hepáticas que las reacciones de Takata-Ara (clásica y modificada), MacLagan, Weltman, Wunderly, etc. Ella supera notablemente a la del timol de MacLagan en las cirrosis alcohólicas o nutritivas. Una prueba de timol negativa o muy débilmente positiva, mientras que la del acetato de cobre es fuertemente positiva, debe al clínico hacer pensar en cirrosis. La prueba es muy útil en el diagnóstico etiológico de las hemorragias altas del tubo digestivo.

En las hepatitis virales la reacción es positiva en el período de estado en un 100%. El grado de positividad es variable, según el período evolutivo de la enfermedad. Durante el período de estado las cifras son altas (100%), existiendo una correlación directa entre la positividad de la reacción y el grado de intensidad de la hepatitis viral. La persistencia de la positividad en la convalecencia, indica que la restitución del daño hepatocelular no se efectúa satisfactoriamente y que nos encontramos frente a una forma prolongada, crónica o de una hepatitis que evoluciona a la cirrosis (cirrosis posthepatitis). En el período pre o subictérico inicial la reacción puede ofrecer en ocasiones (no siempre), resultados negativos, siendo ello debido al hecho de que la globulina gama, con la cual ella está relacio-

nada, se eleva con la evolución del proceso. En general la práctica señala que la reacción es de gran valor para conocer el curso evolutivo de la enfermedad y como guía del tratamiento. Su negatividad en exámenes repetidos, durante la convalecencia asegura la curación del paciente.

En enfermos con hepatitis virales graves y necrosis hepáticas, con aumento masivo de globulinas gama, ella es fuertemente positiva y sin embargo, la transaminasa glutámica pirúvica ofrece valores normales.

En los casos de ícteros obstructivos puros, la prueba es negativa en el 100% de los casos. En presencia de íctero, una prueba negativa con fosfatasa alcalina elevada, califica el proceso de obstrucción biliar y extrahepática o de colestasis intrahepática. Asociada a la reacción de Jirgl y a la dosificación de la fosfatasa alcalina, es la mejor prueba de labilidad serocoloidal para el diagnóstico diferencial de los ícteros.

En la cirrosis biliar la reacción es negativa al comienzo; pero más tarde se hace positiva.

En las hepatitis crónicas de evolución fibrótica, la reacción es constantemente positiva y muestra una sensibilidad precoz, comparada con las reacciones de Takata-Gros, Kunkel y MacLagan.

En las hepatitis tóxicas (químicas), la prueba es negativa.

En la atrofia amarilla aguda del hígado, por hepatitis infecciosa, es positiva en el 100% de los casos. En las de origen tóxico es negativa.

En el síndrome de Banti la prueba es positiva en un 100%. En las colecistitis agudas y crónicas, que se acompañan de daño hepático, la prueba es positiva. Ella es negativa en las colecistitis sin hepatitis.

En los ícteros neoplásicos, la prueba es negativa y muy rara vez débilmente positiva. Ello se explica por ser normal la cifra de gama globulina en dos tercios de los casos de neoplasias hepáticas. En general un aumento de retención de la bromosulfaleína, sin correlación de positividad por la prueba del acetato de cobre, es sospechosa de metástasis hepáticas.

En las hemocromatosis la prueba es positiva en un 66% de los casos.

En los ícteros hemolíticos por conflicto maternofetal, es negativa en un 100%. También lo es en los ícteros hemoglobilínúricos.

En las anemias a células falciformes no ictericas, la prueba es negativa. Cuando existen lesiones hepatocelulares, se hace positiva y acompaña de hiperbilirrubinemia directa.

En las afecciones hepáticas en niños por dietas deficientes y prolongadas es positiva en un 66%. La prueba es positiva en el 75% de los casos de agenesia de las vías biliares. En casos de hígado graso es negativa o muy débilmente positiva. En niños con diarreas graves y patología hepática, la prueba es positiva en un 55%. En los ícteros hemolíticos por sepsis, la prueba es positiva en un 55%. Como quiera que un daño hepático, constituye parte esencial de la patología de otras enfermedades, puede en consecuencia observarse reacciones positivas habitualmente débiles, en casos de mononucleosis infecciosa (50%).

En la insuficiencia cardíaca congestiva, la prueba es positiva en un variable, pero elevado porcentaje de casos. La positividad se modifica bajo los efectos de la terapéutica, excepción hecha de los hígados cardíacos irreductibles que evolucionan hacia una cirrosis. En casos de fascioliasis hepática y de paludismo, la prueba del acetato de cobre, al igual que las de Hanger y MacLagan, son fuer-



temente positivas. Como se sabe en las parasitosis señaladas, existen alteraciones histopatológicas con reacción retículoendotelial.

En pacientes esquizofrénicos, la prueba es positiva en el 66.6% de los casos. En casos de hipotiroidismo la prueba es negativa en el 100%. En los que muestran hipertiroidismo la reacción es positiva fuerte cuando existen lesiones hepáticas (necróticas simples hasta una forma crónica de atrofia y cirrosis).

En casos de mieloma múltiple tipo gama, la prueba es positiva fuerte, al igual que en los de lupus eritematoso diseminado.

En la leishmaniosis visceral la prueba es fuertemente positiva. En casos de lesiones hepáticas por alcoholismo, ella muestra una positividad temprana.

En casos de nefrosis, diabetes mellitus no complicadas y hemopatías en general es ella negativa.

La reacción es positiva débil en un limitado número de casos de fiebre reumática, tuberculosis pulmonar y abscesos pulmonares.

La positividad de la prueba depende de una alteración cualitativa y cuantitativa de las globulinas gama (100%), siendo este hecho acentuado por modificaciones cuantitativas de otras proteínas del plasma. Por electroforesis se encuentra en los casos positivos un aumento de la globulina gama en un 100% y un decrecimiento de la serina (66%). La globulina beta estaría aumentada ligeramente en un 15%.

La prueba del acetato de cobre, tiene mayor valor en el diagnóstico de las hepatopatías que la electroforesis, pues lo esencial puede ser por ella obtenido en forma simple sin necesidad de recurrir a métodos complicados.

Practicadas las pruebas del acetato de cobre y la de la bromosulfaleína, en

personas presumiblemente normales, para identificar lesión hepática, se encuentra una concordancia absoluta entre ambas pruebas.

Sin embargo ella supera a la bromosulfaleína por carecer ésta de valor para diferenciar los ícteros, así como por dar resultados positivos falsos, si la insuficiencia hepatocelular se acompaña de trastornos circulatorios. Aparte de ofrecer inconvenientes y peligros para la vida de los pacientes (muerte súbita).

Ella también supera a la dosificación de la transaminasa glutámica pirúvica, en el período de estado de las hepatitis y en la convalecencia, así como en las cirrosis hepáticas en general.

La prueba del acetato de cobre, no ofrece inconvenientes, ni para el paciente así como tampoco para el técnico o médico especialista de laboratorio clínico, pues libera a estos de la manipulación o inhalación de sustancias tóxicas, usadas en otras pruebas: bicloruro de mercurio, iodo, cadmio etc. Este último metal y sus compuestos son tóxicos ingeridos o inhalados y cancerígenos para el hombre.

#### CONCLUSIONES

En la V Convención Bienal de la Sociedad Cubana de Médicos Laboratoristas Clínicos, celebrada en la Habana en diciembre de 1955, y posteriormente los autores comunicaron los resultados de una nueva prueba de labilidad serocolidal, para el diagnóstico y pronóstico de ciertas enfermedades hepáticas, usando como reactivo exclusivo, una solución apropiada de acetato de cobre.

La reacción ha sido extensamente usada, habiendo aparecido trabajos científicos sobre ella en: Albania, Argentina, Brasil, Cuba, Colombia, Chile, Estados Unidos, España, Francia, Honduras,

Hungría, Italia, México, Perú, Rumania y Thailandia.

La prueba aparte de su simplicidad, precisión, economía y rapidez de ejecución, es entre todas las pruebas de labilidad serocoloidal conocidas, una de las más sensibles y específicas.

Extensas estadísticas señalan a esta prueba de labilidad serocoloidal, una gran sensibilidad en las cirrosis hepáticas (96.6 a 100%). En el período de estado de las hepatitis virales un 100% de positividad es observado. En individuos normales su especificidad es de un 100%.

Es ella una prueba más sensible que las reacciones clásicas de Takata-Ara y sus modificaciones, MacLagan, Wunderly-Wchuman y Weltman etc. Sus resultados son muy concordantes con los de la prueba de Hanger.

La prueba del acetato de cobre no ofrece inconvenientes, ni para el paciente, así como tampoco para el técnico o médico especialista de laboratorio clínico, pues libera a éstos de la manipulación o inhalación de sustancias tóxicas, usadas en otras pruebas: bicloruro de mercurio, iodo, cadmio etc. Este último metal y sus compuestos son tóxicos ingeridos o inhalados y cancerígenos para el hombre.

La prueba del acetato de cobre tiene un enorme valor en el diagnóstico y pronóstico de las hepatopatías: cirrosis de todo tipo, hepatitis aguda vírica, ícteros obstructivos puros, lesiones biliares por obstrucción biliar extrahepática, lesiones hepáticas causadas por dietas, hepatitis crónicas de evolución fibrótica, lesiones hepáticas por agentes infecciosos (no víricos), lesiones hepáticas metabólicas (hemocromatosis), lesiones hepáticas en casos de hipertiroidismo, lesiones hepáticas en esquizofrénicos,

lesiones hepatocelulares por hemólisis (anemias a células falciformes acompañadas de la presencia de hiperbilirrubinemia directa), hígado de estasis, síndrome de Banti, agenesia de las vías biliares, hepatitis lúpica, etc.

En individuos normales y en aquellos con lesión hepatocelular sin íctero, la prueba del acetato de cobre y la de la retención de la bromosulfaleína, son concordantes en un 100%; sin ofrecer los inconvenientes de ésta: falsos positivos por trastornos circulatorios, acción perturbadora de la bilirrubina y la posibilidad de reacciones anafilactoides graves o fatales.

Dada la utilidad de esta prueba en patología hepática, todo clínico, cirujano o especialista, debe identificarse con sus múltiples aplicaciones en el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades hepáticas, obteniendo óptimos resultados de inmediata aplicación práctica en clínica.

Los autores en la presente comunicación reúnen la bibliografía internacional en relación a la prueba Sellek-Frade del acetato de cobre, en la que investigadores de 16 países y 20 universidades de América, Europa y Asia, destacan en líneas casi generales los hechos anteriores.

#### CONCLUSIONS

The results of this new serocolloidal lability test to be used in the diagnosis and prognosis of some hepatic diseases, were first reported by its authors to the V Bianual Convention of the Cuban Society of Clinical Pathologists (Sociedad Cubana de Médicos Laboratoristas Clínicos) held in Havana in 1955.

The reaction has been extensively used and reports on it have been published in Albany, Argentine, Brazil, Cuba, Colombia, Chile, U.S.A., Spain, France,

Honduras, Hungary, Italy, México, Perú, Rumania and Thailand.

Besides its simplicity and accuracy and not being time consuming, this test is one of the most sensitive and specific serocolloidal lability reactions.

There is no limitation as to small amount of sera that could be needed since the reaction could be made with such amounts as 0.1, 0.05 and 0.01 ml. of serum. Bidistilled water should always be used in this test.

Many statistics have shown its high sensitivity in states such as hepatic cirrhosis (96%-100%). The test is invariably positive in the course of viral hepatitis (100%). It helps to distinguish between recovery and progression of the disease to a chronic phase.

The degree of the reaction is directly related to the liver cell damage being modified with the evolution of the case, tending to become negative in those that react well.

The test is negative in patients with biliary obstruction of short duration.

In healthy people the reaction is negative (100%).

This test is more sensitive than the classical Takata-Ara reaction and the MacLagan, Wunderly-Wchuman, Weltman and others. Its results keep a close agreement with those of the Hanger test.

The copper acetate test offers no objection to its use by the patient nor by the technician or the physician working on a laboratory, since exempt them to handle or inhale toxic substances used in other tests, such as mercury dichloride, iodine, cadmium, etc. The toxicity of cadmium and its compounds when inhaled or ingested is well known, as well as their carcinogenic effects on man.

The copper acetate test is a very valuable in the diagnosis and prognosis of hepatic diseases, including all types of cirrhosis, viral acute hepatitis, infectious hepatitis, hepatitis in infectious mononucleosis, lupic hepatitis, chronic hepatitis, pure obstructive icterus, biliary damage secondary to extrahepatic biliary obstruction, hepatic damage secondary to diet or hepatitis, hepatocellular damage secondary to hemolysis, hepatic stasis, Banti syndrome, biliary tract agenesis, hyperthyroidism etc. In the prompt differential diagnosis of high hemorrhagic syndrome gastrointestinal upper tract the copper acetate test is very valuable.

While the results of the copper acetate show a 100 per cent agreement with those of the bromosulphalein retention test in supposedly normal persons and in individuals with hepatocellular damage with no jaundice, it has not the disadvantages of the second test, that is, false positive results arising from circulatory disorders and the disturbing action of bilirubin, as well as the possibility of serious or fatal anaphylactoid reactions.

In view of the value of the copper acetate test, it is suggested to all clinicians, surgeons or specialists to become acquainted with its many uses in the diagnosis and prognosis of hepatic diseases. Best results will enable them to find immediate applications for this test in their clinical practice.

The authors of this communication keep a record of the reports on the Sellek-Frade copper acetate test which have been published by investigators of 16 countries and 20 American, European and Asian universities, emphasizing in general terms what has been said in this report.

## THE COPPER ACETATE TEST

**Reagents.** 1. Copper Acetate stock solution is prepared dissolving 200 miligramos (0.2 gm.) of copper acetate, c.p. (Merk) in 500 mls. of bidistilled water. This solution must be kept in the refrigerator. She preserve indefinitely and maintain sensitivity uniformly, offering accurate results.

2. The working reagent is prepared by diluting 2.5 of the stock solution in 97.5 mls. of bidistilled water. This reagent should always be used just at the moment it is to be used.

### PROCEDURE

The test is very simple and is made delivering into test tube, 6 cc. of the reactive solution to which 0.1 ml. of fresh serum from the patient is added. The mixture is gently rotated and the results observed after five minutes. If the reaction is negative, the mixture remains transparent or a opalescence may appear (free from flocules) that will not be over 4 units as compared with Kinsburg standards used in the thymol test of MacLagan. In the quantitative determinations, barium chloride turbid solutions could be employed in the appre-

ciation of results using a photocolormeter or spectrophotometer in accordance with the recommendations of Shark and Hoagland in the MacLagan test. With normal sera there is not precipitation, Generally the results are somewhat lower in children than in adults.

The degree of positivity of the reaction are expressed in crosses as follows:

Crosses	+	++	+++	++++
Units of turbidity	4	5-7	8-10	12 or more

When the mixture is left overnight (18 hours) at room temperature and the reaction is strong positive there will be a complete precipitation in the bottom and the rest of the fluid will be clear. Intermediate degrees of flocculation will be reported as ++ and +++.

In children or other patients in which it becomes difficult to obtain sufficient amount of blood or the tests, has to be frequently repeated this test can be used as an ultramicromethod.

Deliver 0.6 ml. of the copper acetate reactive solution in a 3 x 100 mm. test tube. Add 0.01 ml. of fresh serum from the patient and see the results similarly as in the standard reaction.

### BIBLIOGRAFIA

- 1.—Sellek, A. y del Frade, A.: La nueva prueba turbidométrica del acetato de cobre como índice de disfunción hepática. *Revista Cubana de Laboratorio Clínico* 10: 26, 1956.
- 2.—Sellek, A. y del Frade, A.: Serorreacción de turbidez y floculación del acetato de cobre para el diagnóstico de las hepatopatías. Prueba standard, cuantitativa y ultramicrométodo. Significación clínica. *Revista Cubana de Laboratorio Clínico* 11: 58, 1957.
- 3.—Sellek, A. y del Frade, A.: Prueba Sellek-Frade para el diagnóstico de las hepatopatías. Electroforesis. Biopsia. Significación clínica. *Revista Cubana de Laboratorio Clínico* 11: 102, 1957.
- 4.—Sellek, A. y del Frade, A.: Copper acetate turbidity and flocculation test for the diagnosis of diseases of the liver. *Gradwohl Laboratory Digest*, 21: 8, 1957.
- 5.—Sanford, A. H.: Liver function test. *Postgraduate Medicine* 22: A 68, 1957.
- 6.—Wollenweber, H. L.: New liver function test: copper acetate turbidity. *Current Medical Digest* 24: 64, 1957.
- 7.—Castillo, P. A. y López Fernández, F.: Nuestra experiencia con la prueba de Sellek-Frade en el diagnóstico de las hepatopatías. *Revista Cubana de Laboratorio Clínico* 11: 100, 1957 y *Rev. de la Confederación Médica Panamericana* 5: 279, 1958.

- 8.—*Ramírez, A.*: Estudio comparativo entre la reacción del acetato de cobre y los tests de cefalina-colesterol, oro coloidal, timol y sulfato de zinc. Tesis profesional. Universidad de San Marcos, Lima, Perú, 1957.
- 9.—*Salgado, S.*: Reacción de Sellek-Frade y su comparación cualitativa con otras pruebas. Tesis profesional. Universidad de San Marcos. Lima, Perú, 1957.
- 10.—*Fraga, S.*: La reacción de Sellek-Frade en la investigación del funcionamiento hepático. *El médico* 8: 82, 1958 y *Noticias Clínicas* 16: 33, 1958. México, D. F.
- 11.—*Silva, H.*: La reacción de Sellek-Frade en el estudio de la insuficiencia hepática. Tesis profesional. Universidad Nacional Autónoma de México, 1958.
- 12.—*Bolio, A.*: Turbidez y floculación del acetato de cobre como prueba funcional hepática. Tesis profesional. Universidad Nacional Autónoma de México, 1958.
- 13.—*MacLagan, N. F.*: Los tests de floculación en la función hepática. *El Día Médico* (Buenos Aires), Noviembre de 1958, página 31.
- 14.—*Faberi, M. y Polini, L.*: La reazione all'acetate di rame di Sellek-Frade confrontata con altre prove di siero-labilita negli epatopazienti. *Il Lab. en la Diag. Med.* 3: 136, 1958.
- 15.—*Delgado, C. S.*: Estudio paralelo entre las serorreacciones de turbidez y floculación del acetato de cobre de Sellek-Frade, Hanger y timol en las hepatopatías. *Revista del Colegio Q-F de Chile*, Junio de 1958.
- 16.—Liber function. Leading articles. *The Lancet*. Londres. Pág. 403, 1958.
- 17.—*Nodarse, O.*: Interpretación clínica de los análisis clínicos. Obra de texto de la cátedra de Microscopía y Química Clínicas de la Escuela de Medicina de la Universidad de la Habana, pág. 430.
- 18.—*Sellek, A. y del Frade, A.*: Prueba Sellek-Frade del acetato de cobre y actividad de las transaminasas glutámica oxalacética y pirúvica en sueros de niños con hepatopatías. *Revista Cubana de Laboratorio Clínico* 13: 30, 1959.
- 19.—*Fraga, S.*: Modificación a la lectura de la reacción de Sellek-Frade del acetato de cobre. *Revista Mexicana de Laboratorio Clínico* 11: 11, 1959.
- 20.—*Iovine, E., Gaya, C. E. y Villa, J. C.*: Fotorimetría Clínica. Editorial Universitaria, Buenos Aires, 1959.
- 21.—*Nguyen-The-Minh.*: La reaction au acetate de cuivre de Sellek-Frade. Son utile dan les affections hepatiques. *La Presse Medicale*, núm. 32, 1958, Jun. 25 de 1960.
- 22.—*Cazzato, G.*: La reazione all'acetato de rame di Sellek-Frade negli schizofrenici. *Giornale di Psiquiatria e di Neuropatologia* 88: 849, 1960 (Fas. 4).
- 23.—*Granato, P. O. y Bonbista, A. L.*: Estudio comparativo da prova de Sellek-Frade. *Rev. Brasileira de Medicina* 15: 410, 1960 (Maio).
- 24.—*Reinhold, J. G.*: Flocculation tests and their application on the study of liver disease. *Advances in Clinical Chemistry* 5: 126, 1960.
- 25.—*Lemaire, A. et Nguyen-The-Minh.*: Les tests de flocculation dan les maladies du foie. *Rev. de Patología Generale et de Physiologie* 69: 1229, 1960 Oct. Núm. 721.
- 26.—*Basnuevo, J. G.*: Bibliografía internacional sobre la prueba Sellek-Frade del acetato de cobre para el diagnóstico de las hepatopatías. *Rev. Cuba* 16: 63, 1960.
- 27.—*Martcorena, A.*: Reacciones de Salazar Mallen y Sellek y Frade en Hepatopatías. *Rev. Laboratorio Granada, España*, 39: 407, 1960.
- 28.—*Castillo, F. G.*: Evaluación de las pruebas de laboratorio en las enfermedades del hígado. *Rev. Cub. de Laboratorio Clínico* 14: 99, 1960.
- 29.—*Celsi, H. T. y Trevisan, A. B.*: Valor diagnóstico de la reacción de Sellek-Frade en las afecciones hepatobiliares. *La Prensa Médica Argentina* 48: 19, 1961 Enero 6.
- 30.—*Celsi, H. T.*: Hepatograma. Su interpretación actual. *La Prensa Médica Argentina* 48: 2627, 1961.
- 31.—*Sellek, A. y del Frade, A.*: Prueba Sellek-Frade del acetato de cobre y actividad de las transaminasas glutámica oxalacética y glutámica pirúvica en sueros de niños con hepatopatías. *Il Fegato*, 7: Núm. 1. 1961 Roma.
- 32.—*Solari, E. y Botaro, F.*: Ricerche su du una nuova reazione di labilita colloidale. *Il Laboratorio Nella Diagnosis Medica*, 6: 58, 1961.
- 33.—*Nguyen-The-Minh.*: La reaction al'acetate de cuivre de Sellek-Frade. Son utile dan les affections hepatiques. *Il Fegato*, 7: 149, 1961.
- 34.—*Permanyer, J. J.*: Capitulo de Laboratorio Clínico en *Síntesis Médica*. Años 1957, 1961 y 1963.
- 35.—*Viranuvati, V. y otros.*: Further study on iodine of liver function test. Relations in between iodine test and other liver function test. *A. J. Gastroenterology* 36: 468, 1961.
- 36.—*Viranuvati y otros.*: Copper acetate (Sellek-Frade) test of liver reaction. To be published.
- 37.—*Anales de la Cátedra de Clínica Médica del profesor E. S. Mazzei*. Año 1961-62.
- 38.—*Rouques, L.*: La reaction de Sellek-Frade dan les affections hepatiques. *Presse Medicale* 70: 770, 1962, Marzo 31.
- 39.—*Fraga, S.*: Semiología de las pruebas hepáticas. *Revista Mexicana de Laboratorio Clínico*, 14: 77, 1962.

- 40.—*Galmarini, O. V.*: Evaluación de la reacción turbidométrica del acetato de cobre. *La Prensa Médica Argentina*, 49: 739, 1962, Marzo 31.
- 41.—*Padolechia, N. Panaro, A. I. Maiorano, C.*: Experimentaciones clinice e indagini fisiopatologiche sul nuovo test di labilità colloidale di Sellek e Frade. *Minerva Médica* 53: 2855, 1962, Sep. 29.
- 42.—*Ionescu y otros*: Consideratti critiche asupra testelor de disproteinemia cu referire apreciata la reaction Sellek-Frade. *Med. Int.* 14: 359, 1962 Martie, Bucarest.
- 43.—*Vietorisz, K.*: Modified Sellek del Frade liver function test. *Orvosi Hetilap*, 103: 1904-5, 1962. 7 Oct., Budapest.
- 44.—*Baldi, A. y Ferrara, E.*: Test all'acetato di rame nella diagnostica della epatopatie. *Igiene e San. Public.* 18: 146-153, 1962.
- 45.—*Muntoni, S.*: La reazione di Sellek-Frade nella diagnostica della affezione epatiche. *Minerva Gastroenterologica*, 8: 148, 1962, Oct-Dic.
- 46.—*Vio, A.*: Diagnosi differenziale degli itteri: la prova all'acetato di rame di Sellek-Frade comparata al test di Jirgl. *Rivista di Gastroenterologia (Parma)*, 14: 59-66, 1962, Marzo-Abril.
- 47.—*Minarelli, A.*: Reazione dell'acetato di rame di Sellek-Frade. *Romagna Médica*, 14: 621-624, 1962 Dic.
- 48.—*Watanabe, R.*: Transaminasas Séricas, reacción con acetato de cobre y bilirrubinemia en hepatitis. Tesis de grado. *Medicina México*, 47: 426, 1962.
- 49.—*Popper, H. y Schaffner, F.*: El hígado. Su estructura y función. Editorial Noguer. Barcelona, 1962.
- 50.—*Demeulenaere, L.*: Savoir interpreter l'examen fonctionnel hepato-biliaire. Editeur Albert de Vissecher, Bruselas 1962.
- 51.—La prueba de labilidad coloidal de Sellek y Frade. *La Semana Médica*, Buenos Aires, 122: 151, 1963, Enero, 31.
- 52.—*Trevisán, A. P.*: Ictericias posthepáticas. Estudio clínico y humoral. *La Prensa Médica Argentina*, 50: 70, 1963, Enero 4.
- 53.—*Papadimitri, O.*: The Sellek-Frade (Copper Acetate) test in viral hepatitis. *Bull. Univ. Shtet Tirane (Miek)*, 3: 66-71, 1963.
- 54.—*Gómez, J. A.*: Pruebas funcionales hepáticas en el diagnóstico de las enfermedades del hígado. Monografía 1963, Tegucigalpa, Honduras.
- 55.—*Schaposnik, F., Milman, F. y Cacciatore, J.*: La prueba del acetato de cobre en la exploración funcional del hígado. *Orientación Médica (Buenos Aires)*. 12: 437, 1963, Agosto 23.
- 56.—*Más Martín, J. y Corral, J. F. y otros*: Lecciones de Laboratorio Clínico. La Habana.
- 57.—*Peg, J. y Puyol, J.*: Estudio químico clínico de la reacción de Sellek-Frade. *Rev. Clínica y Laboratorio* 49: 285, 1964, Zaragoza, España.
- 58.—*Sellek, A., Frade, A., Perelló, J. M.*: Valor de la reacción de Jirgl en el diagnóstico de los icteros obstructivos. *Revista Cubana de Pediatría* 36: 515, 1963.
- 59.—*Pittera, A. y otros*: Contributo casistico al valore clinico di una nuova prova di sieroflocculazione la prove all'acetato di rame. *Medicina Clinica e Sperimentale* 14: 71, 1964, Roma.
- 60.—*Mikol, E.*: La reaction de Sellek-Frade al'acetate de cuivre en hepatologie. *La Presse Medicale*, 72: 2930, 1964 No. 49, Nov., 21.
- 61.—*Toxicity of Cadmium*. Leading Articles. *Lancet*. Agosto 15 de 1964.
- 62.—*Peg, V. y Puyol, J.*: Estudio químico clínico de la reacción de Sellek-Frade. *Revista Mexicana de Laboratorio Clínico*, 17: 99, 1965.
- 63.—*Sellek, A. y del Frade, A.*: Prueba Sellek-Frade del acetato de cobre para el diagnóstico de las hepatopatías ocho años después. *Revista Mexicana de Laboratorio Clínico* 17: 17, 1965.