

UNIVERSIDAD IBERO AMERICANA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

**PRUEBA DE LA FIJACION DEL LATEX EN EL
DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA ARTRITIS
REUMATOIDE.**

TESIS PROFESIONAL

MARIA DEL CARMEN BARROSO ANAYA

MEXICO, D. F.

1959



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD IBERO AMERICANA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

**PRUEBA DE LA FIJACION DEL LATEX EN EL
DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA ARTRITIS
REUMATOIDE.**

Director de Tesis: Q. F. B. Aurelia Rivas

T E S I S

que para optar al título de
Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A

MARIA DEL CARMEN BARROSO ANAYA

MEXICO, D. F.

1959

A Norberto.

A mis hermanos.

*A Don Luis M. Verca, Director de la Esc.
de Química Berzelius. A mis maestros. Al
Dr. Mario Brenes por su acertada dirección
en este trabajo. Al Instituto Nacional de
Cardiología.*

CONTENIDO

- I.—INTRODUCCION.
- II.—MATERIAL Y METODO
- III.—RESULTADOS.
- IV.—CONCLUSIONES.
- BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I

INTRODUCCION

La Artritis Reumatoide es ahora considerada como una enfermedad no limitada a las articulaciones y la presencia de globulina anormal ha sido apreciada como un factor significativamente patológico (10). Se ha aplicado, además, el término "factor reumatoide" a una fracción de las proteínas componentes del plasma, el cual es responsable de las reacciones de aglutinación y precipitación, algunas de las cuales tienen empleo en el diagnóstico de la enfermedad. Su naturaleza exacta no es bien conocida, pero se ha comprobado que aparece en los sueros de enfermos reumáticos y muy raramente en los no reumáticos (8).

A pesar de algunas opiniones en contra, el diagnóstico de Artritis Reumatoide es posible desde el punto de vista clí-

nico no obstante los complejos problemas que presenta. El laboratorio clínico contribuye eficazmente a elaborar el diagnóstico mediante algunos procedimientos, y siendo de tal valor, la Asociación Americana de Reumatismo encontró necesario determinar una norma de criterio para el diagnóstico (4), siendo esta la razón se aparecieran varios estudios, de los cuales haremos breve revisión.

Desde las observaciones de Cecil, en 1930, de que el suero de enfermos de Artritis Reumatoide aglutinaba antígenos de estreptococos, no volvió a ensayarse ese procedimiento hasta 1940 en que Waaler siguió el mismo método. Apareció después una prueba de aglutinación de glóbulos rojos de carnero con sueros de pacientes con diagnóstico cierto de A. R.: ésta fué descrita por Meyer y después por Waaler.

En 1948, Rose, Raagan, Pearce y Lipman encontraron una prueba basándose en la reacción anterior. Heller G., Jacobson y Heller G. Kolodny modificaron esta prueba por la introducción del eritrocito tratado con ácido tánico y por el uso, de una mezcla de glóbulos rojos de carnero con fracción II de la gama globulina del plasma humano. Esta prueba presenta algunas dificultades ya que los glóbulos rojos no mantienen el mismo grado de aglutinación después de un almaceñaje prolongado y además cuando son mezclados con gama globulina, se presenta un número de factores desconocidos en

la reacción resultante lo cual la hace muy difícil de interpretar (1).

Heller(1) y sus colaboradores sustituyeron la gama globulina por suero de conejo y células sensibilizadas de carnero. Epstein, Johnson y Raagan(6) han demostrado que el factor de A.R. puede ser precipitado del suero, bajo ciertas condiciones, ligado a la gama globulina.

Ziff(6) supone que existe una sustancia inhibitoria en la gama globulina de las personas normales que es neutralizada por el factor A.R. Cuando la cantidad de dicho factor es insuficiente, no existe aglutinación. Esta prueba se lleva a cabo agregando euglobina de sueros normales para eliminar el factor inhibitor. Como esta prueba dá muchas reacciones positivas falsas, sus resultados se han comparado con la prueba del latex.

Recientemente Plotz y Singer(3) describieron una prueba que llamaron "fijación del latex" encontrándose una correlación existente entre esta prueba y la observada con globulos rojos sensibilizados. Los resultados encontrados, junto con la utilidad de preparar fácilmente los reactivos (partículas de poliestireno, buffer de borato y gama globulina), la hacen una técnica de elección(3). La gama globulina utilizada puede ser humana y estudios posteriores demostraron que puede ser de otras especies de animales como la bovina empleada en la prue-

ba Waaler-Rose(1). Estos investigadores encontraron que en 7 sueros provenientes de especies animales existía globulina, las cuales podrían funcionar como antígeno en la prueba de fijación del látex; 9 de 10 sueros humanos observaron un comportamiento semejante. Por lo tanto puede usarse indistintamente globulina humana ó de otros animales previamente ensayados(5).

Se han realizado una serie de experimentos para determinar bajo que condiciones ocurre la reacción entre látex, gama globulina y suero A.R. Estos experimentos incluyen:

- a) Varios métodos de preparación de látex.
- b) Efecto de la adición de una suspensión de la mezcla látex-gama globulina al suero reumatoide.
- c) Efecto del pH.
- d) Efecto de la adición de electrolitos al sistema.
- e) Efecto de la temperatura.
- f) Efecto de la centrifugación en la prueba para la lectura de los resultados.

a) *Varios métodos de preparación de partículas de látex.*—Se ensayaron partículas latex polivinil tolueno de diverso diámetro. La medida más satisfactoria que se encontró fué de 0.77 micrones, partículas de 0.81 a 0.98 micrones también son

satisfactorias. Partículas más pequeñas, como de 0.59 micrones, retardan la reacción.

b) *Efecto de la adición de una suspensión de látex-gama globulina al suero reumatoide.* — Se ensayaron sueros usando látex con y sin gama globulina y se vió que la aglutinación ocurría con más facilidad en el primer caso(9).

c) *Efecto del pH.*—Debe tenerse mucho cuidado de que el pH de la mezcla látex-gama globulina esté alrededor de 8.2 ya que a un pH inferior entre 5.5 y 8, la mezcla precipita espontáneamente sin adición de suero.

d) *Efecto de la adición de electrolitos al sistema.*—No se observó aglutinación cuando se usó agua destilada para diluir la mezcla látex-gama globulina. La adición de cloruro de sodio al sistema aumenta marcadamente la aglutinación. La solución salina al 0.85% fué escojida como la más apropiada para añadir al buffer de borato.

c) *Efecto de la temperatura.*—Fueron ensayados sueros positivos y negativos antes y después de inactivarlos a 56°C por 20 minutos dando los mismos resultados, por lo cual se ha concluido que la inactivación previa de los sueros es innecesaria y que los resultados óptimos se obtuvieron efectuando la prueba a 56°C durante 2 horas.

f) *Efecto de la centrifugación en la prueba para la lectura de los resultados.*—Después de la incubación a 56°C por dos horas, fué difícil hacer la lectura a simple vista. Centrifugando por 3 minutos a 2 300 rpm, se facilita la lectura(1).

Los resultados obtenidos por este método, comparados con los obtenidos usando el método de Rose Raagan y con la técnica de Heller, fué muy favorable(2).

A partir del método de Plotz y Singer han aparecido numerosas modificaciones simplificando, únicamente, la técnica.

Como una simplificación posterior está la de Bozeceovich (9) y sus colaboradores que descubrieron un método de porta-objetos usando una gota de sangre de la yema del dedo, partículas de látex y eosina. La aglutinación presente se lee fácilmente a simple vista.

Estudios más recientes aún, confirmaron la eficacia del método de Singer y Plotz sugiriendo una modificación de la "fijación del látex" en prueba de "gota" reduciendo al mínimo el tiempo empleado y simplificando la cantidad reactivos requeridos. La técnica es semejante, la diferencia reside únicamente en el uso de partículas de latex de otro diámetro. Los resultados obtenidos por esta técnica modificada, aparentemente están de acuerdo con los reportes hechos por otros investigadores que emplearon un macrométodo (3).

Después de la aparición de la modificación anterior, se ha publicado una nueva modificación. Es un perfeccionamiento que consiste en reemplazar el buffer de borato por buffer de glicina preparado por la adición de solución 0.1 M. de glicina mezclada con una solución N de NaOH en cantidad suficiente para obtener un pH de 8.2; a cada litro de buffer se le añaden 10 g. de cloruro de sodio. Otro de los reactivos se prepara añadiendo 0.2 cc. de una suspensión de latex (esta suspensión se obtiene agregando 2 cc. de la solución Sotck de poliestireno a 20 cc. de agua bidestilada. La suspensión diluida se filtra por papel Whatman No. 40. El filtrado debe tener una densidad óptica equivalente a una transmisión de luz del 6% en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 mm, cuando 0.1 cc de la suspensión diluida se agrega a 10 cc de buffer de glicina) a 1 cc al 1% de gama globulina bovina. El suero ensayado se diluye 1:20 con buffer de glicina y una gota de esta dilución se mezcla con una gota de reactivo en el porta-objetos. Si la prueba es positiva, la agrutinación es visible en pocos minutos (10).

Describo este método que fué comparado en más de 100 casos con el de Singer y Plotz, empleado en este trabajo de tesis, habiendo obtenido resultados satisfactorios, con lo cual comprobé la eficacia del método escogido.

7

100

CAPITULO II

MATERIAL Y METODO

MATERIAL:

Tubos de 12 x 100

Pipetas de 1 cc

Pipetas de 10 cc

Papel filtro Whatman No. 40

Baño de agua a 56°C

REACTIVOS:

Suspensión Stock de partículas de poliestireno de 0.61 micrones
conteniendo 11% de material sólido. Esta suspensión

nos fué suministrada por la Dow Chemical Co., a quien expresamos nuestro agradecimiento.

Solución de trabajo. Se agregan 2 cc de la solución Stock a 20 cc de agua bidestilada. La suspensión diluida se filtra por papel de filtro Whatman No. 40. El filtrado debe tener una densidad óptica equivalente a una transmisión de luz del 6% en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 mm. cuando 0.1 cc de la suspensión diluida se agrega a 10 cc de buffer de borato.

Buffer de borato más solución salina a pH 8.2: 50 cc de ácido bórico 0.1 M (6.18 g. de ácido bórico en 1000 cc de agua) y 5.9 cc de NaOH N (4.001 g. de NaOH en 1000 cc de agua) se llevan a 100 cc con agua bidestilada y se ajusta el pH exactamente a 8.2. A cada 100 cc de buffer, se agregan 0.85 g. de cloruro de sodio Q.P.

Solución Stock de goma globulina al 0.5% en buffer de borato: a 0.5 g. de la fracción II de gama globulina humana liofilizada, se agregan porciones de 5 y 10 cc progresivas del buffer de borato agitando cada vez hasta completar a 100 cc y el polvo esté completamente disuelto. Esta solución se conserva varias semanas en el refrigerador.

METODO:

- 1.—En el primer tubo de una serie de 10, se pone 0.1 cc de suero del paciente y 1.9 cc de buffer. Los demás tubos contienen 1 cc de buffer. Se mezcla el primero y se pasa 1 cc al segundo y así sucesivamente hasta llegar al tubo No. 9 del cual se descarta 1 cc después de mezclar. El tubo 10 sirve de control y no lleva suero. Las diluciones resultantes serán de 1:20 a 1:5120.
- 2.—A cada tubo de la serie (incluyendo el tubo control) se agrega 1 cc de una mezcla que contiene 1% de Stock de latex diluido y 0.5% de gama globulina Stock. La mezcla latex-gama globulina se prepara agregando 0.1cc. de suspensión de latex diluido y 0.5 cc de gama globulina Stock al 0.5% a 9.4 cc de buffer de borato. Se requiere 10 cc de mezcla para cada serie de tubos.
- 3.—Se agitan bien los tubos y se incuban a 56°C durante 2 horas.
- 4.—Luego se centrifugan todos los tubos a 2 300 rpm durante 3 minutos y se lee la aglutinación resultante y visible a simple vista agitando suavemente los tubos para resuspender las partículas sedimentadas. Las lecturas se estiman

por la aglutinación presente en la más alta dilución del suero problema de 0 a 4 cruces.

Es conveniente incluir un suero positivo conocido en cada serie de pruebas.

CAPITULO III

RESULTADOS

La prueba de "fijación del látex" se practicó en una serie de 270 sueros tomados al azar de las sangres de enfermos de la consulta del Departamento de Reumatología del Instituto Nacional de Cardiología. 155 sueros correspondieron a personas adultas, cuyas edades fluctuaron entre 14 y 64 años, 66 masculinos y 89 femeninos. De estos sueros, 27 fueron positivos y el resto negativos.

La positividad se efectuó a diferentes diluciones según lo siguiente:

SUEROS

AGLUTINACION

	1:20
2	1:40
3	1:80
2	1:160
6	1:320
4	1:640
3	1:1280
3	1:5120
4	

Se estudiaron las historias clínicas de los enfermos cuyo suero dió positiva la prueba de la fijación del latex encontrándose que 20 sueros tenían diagnóstico cierto de Artritis Reumatoide; 4 con Fiebre Reumática activa y 3 con Endomiocarditis Reumática.

Desde luego los sueros que aglutinaron a diluciones más altas pertenecían a enfermos con Artritis Reumatoide:

115 muestras correspondieron a niños pertenecientes a la Campaña de Fiebre Reumática que empezó a hacerse en abril de este año y cuyas edades fluctuaron entre 5 y 15 años, 40 masculinos y 75 femeninos. Los resultados en todos los casos fueron negativos.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

- 1.—Se ensayaron 270 sueros por el procedimiento de la fijación del latex descrito, y en 130 sueros la prueba se comparó con la de la técnica en laminilla.
- 2.—Los resultados obtenidos con ambas pruebas concuerdan, lo cual nos dá la medida de la sensibilidad de las pruebas.
- 3.—Comparando los datos positivos obtenidos con el diagnóstico clínico cierto de la Fiebre Reumática, encontramos que la especificidad de la prueba es bastante alta.
- 4.—Creemos importantes recomendar una mayor difusión de esta prueba, por sus características, para el diagnóstico de la Fiebre Reumática.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Jacques M. Singer, M.D. and Charles M. Plotz, M.D.
The Latex Fixation Test. Application to the Serologic
Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *AM. J. of Med. (N.
Y.)* 21(6): 882-92, 1956.
- 2.—Charles M. Plotz, M.D. and Jacques M. Singer, M.D.
The Latex Fixation Test. Results in Rheumatoid Arthri-
tis. *AM. J. of Med. (N. Y.)*, 21(6): 893-6, 1956.
- 3.—M. S. Rheins, PH. D., F.W. McCoy, M.D.R.G. Burrel,
M. Sc., and E.V. Buchler M. Sc. A Modification of The
Latex Fixation Test for The Study of Rheumatoid Arthri-
tis. *J. Lab. Clin. Med. (Columbus, Ohio)*, 50: 113-8, 1957.

- 4.—Norman O. Rithermic, M.D. and Vol K. Philips, M.D.
The Serologic Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. J. AM.
Med. Assoc. (Columbus, Ohio). 164(18): 1999-2004.
1957.
- 5.—M.S. Rheins, F.W. McCoy, E.V. Buehler and R.G. Burrel. Effects of Animal Sera and Serum Albumin on Latex Fixation Test for Rheumatoid Arthritis. Proc. Soc. Ex. Biol. Med. 96: 67-71. 1957.
- 6.—Arthur P. Hall, M.D., Almad. Mednis and Theodore B. Bayles, M.D. The Latex Agglutination and Inhibition Reactions Clinical Experience in The Rheumatoid Arthritis. N. Eng. J. Med. (Boston). 258(15): 731-5, 1958.
- 7.—Melvin Rheins, Francis W. McCoy, and Robert L. Wall (Int. by Matt C. Dadd). Reactivity of Globulins from Rheumatoid Sera in The Latex Fixation Test. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 97: 632-5, 1958.
- 8.—B. y G. M. Edelman, M.D., H.G. Kunkel, M.D. and E.C. Franklin, M.D. Interaction of the Rheumatoid Factory with Antigen Antibody Complexes and Aggregated Gamma Globulin. J. Exp. Med. 108(1): 105-20, 1958.
- 9.—Jacques M. Singer, M.D. and Charles M. Plotz, M.D.