

El laboratorio en la evolución y diagnóstico de los procesos reumáticos ⁽¹⁾

Dr. Abelardo Moreno Quesada

Jefe del laboratorio del Hospital Provincial

Jaén

INTRODUCCION. — Aunque la palabra reuma y el concepto de enfermedad reumática son de los más antiguos en Medicina, la especialidad y estudios reumatológicos son disciplinas bastante jóvenes; ello se debe a que la reumatología es un sector poco propicio a la delimitación, ya que tiene que utilizar técnicas y conocimientos de otras especialidades (ortopedia, traumatología, nutrición, cardiología, neurología), que son de por sí muy extensas y de procedimientos dispares.

Un paciente reumático puede no necesitar un electrocardiograma o una radiografía o un metabolismo, pero es rarísimo que no necesite una reacción técnica diagnóstica analítica.

¿Cuáles son las técnicas de laboratorio que se emplean en el reumatismo?

¿Qué es lo que el clínico debe esperar del laboratorio?

Para contestar a estas preguntas necesitamos tener una visión panorámica del estado actual de nuestros conocimientos acerca del reumatismo.

La lesión fundamental del reumatismo reside en el tejido conectivo y esto hay un acuerdo absoluto; en los fué descrita por KLINGE con el nombre de "degeneración fibrinoide"; en que no existe unanimidad es en el cómo y el por qué se produce esta lesión.

El tejido conectivo normal, en esquema, tiene la siguiente composición:

Tejido conectivo
Parte celular
Parte extracelular
Fibras colágenas
Sustancia fundamental
Proteínas
Mucopolisacáridos

(1) Conferencia pronunciada en las Sesiones Clínicas del Hospital Provincial de Jaén.

Se sabe actualmente que la mitad proteica de la sustancia fundamental tiene una composición de aminoácidos similar a los que componen la albúmina y gamma globulina del suero en condiciones normales.

Los mucopolisacáridos conocidos hasta este momento son tres:

Acido hialurónico.
Acetilglucosamina.
Acido glucorónico.

Acido condroitin sulfúrico.
Acetilgalactosamida.
Acido glucorónico.
Acido sulfúrico.

Acido Keratosulfúrico.
Acetilglucosamida.
Galactosa.
Acido sulfúrico.

Hasta hace poco se aceptaba la opinión de NEUMAN de que los agentes patógenos, bien directamente unos, bien a través del sistema hormonal otros, actuaban sobre la sustancia fundamental, produciendo la depolimerización de la misma, y esto sería lo que se manifestaría en forma de fibrinoide, hialina o amiloide. Esta es la que pudiéramos llamar teoría de la degeneración.

KLEMPERER sostiene, en cambio, que la presencia de estas sustancias patológicas en los tejidos se debe a la deposición en las mismas de proteínas anómalas que circulan por la sangre, y, por lo tanto, la mitad pro-

teica de la colágena, que, como hemos dicho antes, se forma a partir de las proteínas séricas; en estos casos sería también anormal. Esta es en síntesis la teoría de la infiltración.

Pero, ¿cuáles son los mecanismos que producen la infiltración o la depolimerización?

Como patólogos clínicos que somos hemos de recurrir a la Patología general para entrar de lleno en nuestro objetivo y enunciado de esta exposición.

En todo proceso patológico hay que distinguir los siguientes elementos: agente causal, acción patógena, reacción orgánica, lesión y trastorno funcional.

Agente causal.—El papel del Laboratorio sería decisivo en el diagnóstico de los reumatismos, si se hubiese encontrado el agente específico; pero no es así.

Solamente parece segura la participación del estreptococo hemolítico en la producción de la fiebre reumática (demostrado hasta la saciedad por técnicas inmunológicas y estudios epidemiológicos). Pero tenemos que puntualizar: desde el punto de vista diagnóstico, el hallazgo de este germen en la faringe de un enfermo ¿sirve para hacer el diagnóstico de fiebre reumática? No. Analicemos ahora la proposición contraria: ¿La ausencia de estreptococo hemolítico anula el diagnóstico de fiebre reumática en un caso clínico? Tampoco.

Acción patógena.—Se puede determinar las sustancias elaboradas por el germen: hialuronidasa, estreptoquinasa, estreptodornasa.

Hasta ahora no se ha demostrado la utilidad de estas técnicas.

Reacción orgánica.—Está representada por la producción de anticuerpos que se pueden poner de manifiesto por procedimientos diversos, unos específicos (antiestreptolisinas, aglutininas L y O, antiestreptoquinasa, etc.), y otros inespecíficos (V. de sedimentación, determinación de gamma globulina y alfa globulina, fibrinógeno, P. C. reactiva, mucoproteínas, reacción de Weltmann, etc.).

Empezaremos nuestra descripción por el aislamiento y la identificación del estreptococo hemolítico (grupo A de la clasificación de LANCEFIELD).

Este germen se encuentra en las secreciones faríngeas durante las fases agudas de la fiebre reumática. Las tomas del material de cultivo deben hacerse en las amígdalas o en la rino-faringe, siendo más óptimos los resultados cuando la toma se hace en la amígdala.

La siembra se efectuará en los medios adecuados (agar-sangre y caldo glucosado) y la identificación del mismo por la producción de hemolisis y aglutinación con los sueros específicos para delimitar el grupo.

Siguiendo esta pauta, los diferentes autores están de acuerdo en que sólo

lograremos el aislamiento en un 50 por 100 de los casos. Si en vez de este método empleamos medios selectivos, el porcentaje de aislamiento puede ser mejorado. Entre los más difundidos está el de PIKE, que está basado en la acción inhibitoria del cristal violeta y la azida sódica sobre la restante flora faríngea. También exponemos como de gran utilidad la pauta recomendada por KAPLAN de adicción de penicilina al medio de cultivo e inactivar la acción de la penicilina que pudiera haber recibido el sujeto.

Hoy disponemos en el laboratorio de un medio muy asequible para la identificación de los estreptococos del grupo A, y es el hallazgo de *Marted*, de que los estreptococos del grupo A son sensibles a concentraciones de bacitracina incapaces de inhibir el crecimiento de estreptococos hemolíticos de cualquier otro grupo.

No queremos pasar adelante sin exponer, aunque sea someramente, las pruebas directas para el diagnóstico de la inflamación articular.

Estas pruebas pueden efectuarse sobre el líquido sinovial o por biopsia de la sinovial de las articulaciones enfermas.

En el líquido sinovial existe *disminución de la viscosidad* por el rápido aumento de la exudación plasmática por dilatación capilar. *Aumento de la concentración de proteínas totales*, que de la concentración nor-

mal de un 2 por 100 puede llegar a valores semejantes a los del plasma.

Citológicamente hay una intensa diapedesis leucocitaria que da lugar a un líquido turbio u opalino, invirtiéndose la fórmula citológica normal (20 por 100 de linfocitos y 50 por 100 de monocitos).

Anatomopatológicamente, por la biopsia de la sinovial se puede demostrar reacciones inflamatorias en general inespecíficas, o en otros casos, específicas de gran valor diagnóstico (folículos tuberculosos, depósitos de sustancia fibrinoide en la colagenosis o bien nódulos de ASCHOFF en la enfermedad de BOUILLAND).

En los reumatismos de carácter metabólico, como la gota, el aumento de ácido úrico en el suero sanguíneo sería un fenómeno constante en cifras de más de 6 miligramos por cien.

Nuestra experiencia personal nos demuestra que las determinaciones fotocolorimétricas son más exactas que las volumétricas.

Y pasamos a las pruebas de laboratorio, que representan la reacción orgánica evidenciable por la producción de anticuerpos, puestas de manifiesto por procedimientos específicos o inespecíficos.

Entre las pruebas específicas voy a referirme a la determinación del título de antiestrepptolisina y a las aglutininas L y O.

ANTIESTREPTOLISINA

Los estreptococos producen toxinas de varias clases; aquí nos interesa solamente la producción de hemolisina. Existen dos tipos de hemolisinas estreptocócicas. La estreptolisina O, que se destruye en presencia de oxígeno, y la estreptolisina S, estable en presencia de oxígeno.

Aquí sólo nos interesa la estreptolisina O, que es la más importante y más estudiada. Se trata de una sustancia con buena capacidad antigénica, que induce la aparición de un anticuerpo, la ANTIESTREPTOLISINA, de la cual vamos a ocuparnos.

La valoración de la antiestrepptolisina, es decir, del anticuerpo que inhibe la acción hemolítica de la estreptolisina O, es sin duda la más valiosa de las investigaciones de laboratorio para llegar al diagnóstico de fiebre reumática (reumatismo poliarticular agudo).

La presencia de antiestrepptolisina en el suero humano es constante, oscilando normalmente entre límites bastante amplios, aumentando su título en el suero en caso de infección por un estreptococo hemolítico. Este aumento es especialmente elevado y constante en el caso del R. P. A., la glomerulonefritis difusa aguda y también, aunque en proporción menor, en la escarlatina.

Técnica de la reacción

No vamos a indicar aquí la elección de la cepa del estreptococo que, normalmente, se hace con el grupo A, tipo 3, ni la preparación del medio de cultivo y las diferentes manipulaciones necesarias para la obtención de la estreptolisina y su conservación a 36° bajo cero, pues ello sería hacer interminable esta charla.

Nosotros utilizamos la que nos proporciona la casa Difco, en forma liofilizada, y que se conserva indefinidamente a la temperatura de 1-4° en la nevera.

El vidrio debe ser neutro y perfectamente limpio. La solución Buffer debe ajustarse a un pH de 6,5-6,6 y para su preparación empleamos productos de máxima pureza (Merk).

La suspensión de hematíes pueden ser de conejo y de sangre humana (nosotros utilizamos sangre del grupo 0, del banco de sangre de este hospital), las cuales se lavan con S. F. y la dilución final al 5 por 100 se efectúa con solución Buffer.

El suero problema se obtiene por punción venosa, y para su uso debe inactivarse a 56° durante treinta minutos.

La pauta de reacción consiste en añadir a diluciones progresivas de suero la estreptolisina reactivo, incubarla a 37° y luego añadir suspensión de hematíes al 5 por 100 y mantener

otro determinado tiempo en incubación antes de la lectura final.

En esencia es una reacción idéntica a la clásica de Wasserman, que en vez de valorar la fijación del complemento lo hace sobre el poder hemolítico.

La lectura debe hacerse por centrifugación de los tubos, a fin de apreciar con exactitud el tubo donde empieza la hemólisis.

Se emplea un control de hematíes, otro de antiestreptolisina y otro con un suero standard de título conocido.

El resultado se expresa en unidades Todd, y las cifras normales se consideran comprendidas entre 200 y 250 unidades, y toda cifra superior a éstas nos indicará una infección por el estreptococo hemolítico.

SEROAGLUTINACION DE LOS ESCREPTOCOCOS HEMOLITICOS

En la actualidad, ya hemos indicado se acepta de manera casi unánime el papel preponderante del estreptococo hemolítico en la etiología del reumatismo poliarticular agudo.

Menos aparente es el papel del estreptococo hemolítico en la etiología de la poliartritis crónica progresiva (artritis reumatoidea); sin embargo, la aglutinación de los estreptococos hemolíticos del grupo A por el suero de enfermos afectados de dicho proceso

es un fenómeno bastante constante a títulos elevados.

Por utilizarse el germen vivo, se ha designado esta reacción "Aglutinación L" (L, inicial de las palabras inglesa *living* y alemana *lebende*).

Se ha interpretado esta reacción como una reacción antígeno-anticuerpo, entre un antígeno de la superficie de los estreptococos y el correspondiente anticuerpo que aparece en el suero del enfermo de poliartritis crónica progresiva.

La aglutinación O ha sido introducida por THULIN por analogía a lo que sucede en las enterobacterias, y se habla de un antígeno O de los estreptococos hemolíticos situado profundamente en el soma bacteriano y resistente al calentamiento. Se trata, pues, de una seroaglutinación en la que se emplea como antígeno aglutinante una suspensión de estreptococos hemolíticos sometidos al calentamiento en el autoclave para destruir los antígenos superficiales termolábiles.

La técnica de la aglutinación L sigue la norma general de poner en contacto diluciones progresivas del suero problema con cantidades constantes de la suspensión bacteriana.

De una ampolla de cultivo liofilizado de estreptococo hemolítico A se efectúan siembras en medio de Kalbak (medio líquido), y este medio líquido mantenido en cultivo durante ocho-diez horas, sin ninguna otra ma-

nipulación, es el antígeno utilizable para la aglutinación.

La lectura se hace a las veinticuatro horas y la interpretación de los resultados es la siguiente:

Títulos de aglutinación del 1/20 y del 1/40, no tiene valor. Aglutinaciones positivas al 1/80, se consideran, desde el punto de vista clínico, como dudosas, y a títulos de 1/160 y superiores se aceptan como positivos.

La aglutinación O tiene idéntico fundamento a la L, pero se utiliza una suspensión de estreptococos hemolíticos del grupo A sometidos a un calentamiento en el autoclave, a 120° durante hora y media aproximadamente.

La lectura de la aglutinación y título de la misma es de idéntica apreciación e interpretación a la aglutinación L.

REACCION DE WAALER-ROSE

El fundamento de esta reacción está basado en la propiedad que tiene el suero de la mayoría de los enfermos de poliartritis crónica progresiva (artritis reumatoide), de provocar la aglutinación de los hematíes de diversas especies animales, sensibilizados previamente por una dosis subaglutinante de su correspondiente antisuero obtenido en el conejo.

Este hecho, descubierto por WAALER (1940) y aplicado por ROSE al

diagnóstico de la artritis reumatoide, depende de la presencia en el suero de un factor activante, o "R. A. S. factor" (Rheumatoid Arthritis Serum Factor).

A pesar de que hay numerosos aspectos poco conocidos en el mecanismo íntimo de esta reacción, existen bastantes puntos de apoyo para poder interpretarla como una reacción (seguramente antígeno-anticuerpo) entre la globulina utilizada para sensibilizar los glóbulos y el R. A. S. factor, presente en el suero del enfermo.

Técnica de la reacción

Se disponen los siguientes elementos:

1.º Suero problema inactivado a 56º durante media hora.

2.º Hematíes de carnero lavados y suspendidos en suero fisiológico al 5 por 100.

3.º Amboceptor hemolítico (hemolisina) disuelto a los mismos títulos que para la reacción de Wassermann.

Diluciones de suero problema al 1/200, 1/500, 1/1.000 y 1/2.000 en solución salina.

Se mezcla a partes iguales el amboceptor hemolítico con los hematíes de cordero al 5 por 100 y de esta mezcla se ponen 0,5 c. c. en cada tubo con el suero.

Se mantienen los tubos en baño María a 37º durante media hora, al

cabo de la cual se retiran y dejan a temperatura ambiente. Pasadas algunas horas se hace la lectura. Esta se hace por dos procedimientos; observación del casquete del depósito, que en caso de aglutinación aparecerá rodeado de pequeños floclitos rojos adheridos a la pared, o bien por examen al aglutinoscopio.

Como algunas sangres normales producen eritroaglutinación a bajos títulos, convendrá hacer simultáneamente otra prueba testigo, pero prescindiendo de la hemolisina.

Títulos de aglutinación a mayor dilución de 1/500 se consideran como positivos.

REACCION DE LA AGLUTINACION DEL LATEX

Es una modificación de la prueba antes descrita, efectuada por SINGER y PLOTZ, en la cual el sistema aglutinante está constituido por partículas de latex de poliestireno, de muy pequeño tamaño (una micra de diámetro), sensibilizadas con globulina gamma.

Técnica

Se mezcla una gota de reactivo de latex (después de ser agitado energicamente para su homogeneización) con otra gota de suero diluido al 1/20. Esta mezcla se efectuará en una placa de cristal con pocillos.

Se imprime a la placa un movimiento de rotación lento por espacio de un minuto y se efectúa la lectura directamente, con una lupa o por examen microscópico.

Los resultados se expresan como reacción negativa, si no se produce aglutinación del latex, y positiva, más o menos fuerte, según el grado de aglutinación observable.

Se puede también expresar cualitativamente haciendo diluciones del suero en solución tamponada a títulos de 1/20 al 1/2.000.

(Esta técnica está recientemente incorporada a nuestro servicio y, por tanto, no disponemos de casuística experimental.)

PRUEBAS INESPECIFICAS

Tienen su importancia como pruebas auxiliares, pues careciendo de especificidad son casi siempre comunes a un proceso inflamatorio, sin precisión etiológica. Indicaré las más frecuentemente utilizadas.

Fórmula leucocitaria.—En los reumatismos inflamatorios está generalmente aumentada la cifra de leucocitosis con cifras que oscilan de 10.000 a 30.000. Generalmente se acompaña de neutrofilia (80 por 100). Hemos de hacer constar la excepción que representa el Lupus Eritematoso, que cursa con leucopenia en los brotes de la enfermedad.

Velocidad de sedimentación.—Es la prueba de laboratorio más solicitada y la más importante de las pruebas inespecíficas, permitiendo clasificar los reumatismos en inflamatorios y no inflamatorios, según esté acelerada o normal.

En los reumáticos se dan condiciones plasmáticas óptimas para determinar la aceleración de la velocidad de sedimentación (aumento del fibrinógeno y de las globulinas alfa y gamma del suero).

Las variaciones de la misma tienen gran interés en todos los estadios de la enfermedad, así como en el curso del tratamiento como índice de la persistencia o no de un foco fluxionario.

Proteínas plasmáticas.—Tienen gran importancia en el diagnóstico y evolución del proceso reumático.

El fibrinógeno de cifras elevadas y en el aspecto proteico se demuestra un aumento de las globulinas alfa 1 y 2 y a veces de la gamma globulina con discreta disminución de la albúmina.

El aumento de la gamma globulina podemos estimarlo por métodos de floculación con sales metálicas en medios tamponados, como son las reacciones de KUNKEL y POOPER.

No podemos pasar adelante sin intercalar aquí y decir, aunque sólo sea de pasada, el interés de otra fracción proteica presente en el suero y denominada mucoproteínas. Son sustan-

cias caracterizadas por su gran contenido en azúcar, cuya movilidad electroforética corresponde a la globulina alfa 1.

Su identificación se hace en virtud de la propiedad que poseen estas sustancias de no precipitar por los reactivos usuales, donde precipitan el resto de las proteínas, quedando en el líquido para ser posteriormente aisladas por la acción del ácido fosfotúngstico y dosificadas por diferentes procedimientos. Nosotros tenemos montada la técnica de *dosificación de tirosina*, que es la prueba más sensible y cuyos resultados van más expresados en los tratados de Medicina.

Los polisacáridos del plasma son azúcares ligados a las proteínas, especialmente a las fracciones globulínicas que en los procesos reumáticos inflamatorios aparecen muy aumentados. De estas glucoproteínas, las hexosaminas son investigadas por nosotros según la técnica de ELSON y MORGAN.

Valores normales: Mucoproteínas, expresado en tirosina, es de 3,2-3,7 miligramos por 100 c. c. de plasma.

Polisacáridos, expresados en hexosamina, 80-90 miligramos por cien.

Para finalizar, unas palabras sobre la PROTEINA C-REACTIVA. El fundamento inmunológico de esta reacción de precipitación tiene su origen en la observación de TILLER y FRANCIS, de que, poniendo en contacto suero de convalecientes de neumonía con un polisacárido aislado del cuerpo del neumococo (Polisacárido C), se formaba un precipitado.

Al principio se creyó que se trataba de una reacción específica antígeno-anticuerpo, pero más tarde se demostró que este polisacárido puede encontrarse en otros gérmenes, y además que sueros de enfermos de otras afecciones en su fase aguda, sin relación etiológica con el neumococo, precipitan también al ponerse en contacto con el polisacárido C. Por no ser esta sustancia específica en sentido inmunológico, y ser de naturaleza proteica, se la denomina Proteína C-reactiva.

Existe, pues, en muchos sueros de enfermedades infecciosas y en otros procesos donde existe destrucción de tejidos, aparece muy precozmente y desaparece al curar la infección.

Su técnica es sencillísima y su mayor inconveniente es su inespecificidad y su coste elevado.

