



302827

UNIVERSIDAD MOTOLINIA A.C.

ESCUELA DE QUIMICA

CCN ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U. N. A. M.

5  
24

ANALISIS DE FACTORES LOCALES EN EL LIQUIDO  
SINOVIAL DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO  
SISTEMICO (LES) QUE FAVORECEN EL DESARROLLO  
DE Salmonella enteritidis B.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A ;  
MA. LEONOR MARTINEZ BAEZ



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 está 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.

## I N D I C E

CAPITULO I	Págs.
INTRODUCCION	
1.1 Planteamiento del Problema	1
1.2 Objetivos	2
1.3 Hipótesis	3
CAPITULO II	
ANTECEDENTES	
2.1 Líquido Sinovial	4
2.2 <u>Salmonella sp.</u>	7
2.2.2 Estructura antigénica	8
2.2.3 Composición química de los medios de cultivo y su influencia en el crecimiento de <u>Salmonella sp.</u>	9
2.3 Artritis Séptica (Artritis por <u>Salmonella sp.</u> )	10
2.4 Lupus Eritematoso Sistémico (LES).	14
2.4.1 Generalidades	14
2.4.2 Diagnóstico	15
2.4.3 Tratamiento	16

<b>CAPITULO III</b>	<b>Págs.</b>
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	
3.1 Diagrama de Flujo	18
3.2 Material, Reactivo y Equipo	19
3.2.1 Material Biológico	19
3.2.2 Material de Laboratorio	19
3.2.3 Reactivos	20
3.2.4 Equipo	24
3.3 Metodología	24
3.3.1 Análisis Citoquímico y Físicoquímico del Líquido Sinovial	24
3.3.2 Análisis Inmunológico del Líquido Sinovial	26
3.3.3 Análisis Químico del Líquido Sinovial	29
3.3.4 Análisis Microbiológico del Líquido Sinovial	30
 <b>CAPITULO IV</b>	
 <b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
4.1 Resultados	37
4.2 Discusión	46
 <b>CAPITULO V</b>	
 <b>CONCLUSIONES</b>	 51
 <b>BIBLIOGRAFIA</b>	 53

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

#### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante los últimos años se ha observado, que en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES), hay una mayor frecuencia de bacteremia por Salmonella sp. (1).

Estudios previos muestran que los factores que predisponen a la bacteremia por patógenos intracelulares, se encuentran en sangre periférica y líquido sinovial. Estos factores son:

- a) Disminución de la respuesta inmune celular (30,41).
- b) Hiperactividad de células B con producción de autoantígenos y disminución en la formación de anticuerpos específicos contra virus y bacterias.
- c) Disminución de la actividad fagocítica, tanto por factores intrínsecos (disminución de la expresión en la superficie de la membrana celular de los receptores  $C_3$ ,  $C_4$  y Fc), como extrínseco (bloqueo de receptores por la presencia de complejos inmunitarios circulantes) (31,43).
- d) Presencia de complejos inmunitarios y disminución de  $C_3$  en líquido sinovial, lo que favorece el proceso inflamatorio, la anaerobiosis y la permeabilidad vascular.
- e) La administración de medicamentos inmunodepresores en forma combinada como son prednisona y ciclofosfamida.
- f) Estado de portador de Salmonella sp. en pacientes

con LES.

En México existe una mayor frecuencia de artritis séptica por Salmonella enteritidis B, en pacientes con LES, que en -- cualquier otra enfermedad de tejido conjuntivo (16,17,48).

Lavalle y col., demostraron que la artritis séptica por Salmonella sp; guarda estrecha relación con la actividad persistente de la enfermedad, persistencia crónica de la bacteria en huésped (portador), glomerulonefritis proliferativa difusa y con la administración de prednisona a dosis elevadas y la administración reciente de ciclofosfamida, que en conjunto parecen ser factores desencadenantes de artritis séptica por Salmonella sp.

El motivo de este trabajo, es investigar, si en los pacientes con LES, existen factores locales en el líquido sinovial que favorecen el desarrollo de Salmonella enteritidis B.

## 1.2 OBJETIVOS

### A.- GENERAL

Investigar si el líquido sinovial de pacientes con LES, reúnen los factores adecuados para ser considerado como un medio de cultivo que favorezca el desarrollo de Salmonella enteritidis B.

### B.- PARTICULARES

a) Evaluar por medio de un método turbidimétrico (McFarland), el crecimiento de Salmonella enteritidis B en el líquido sinovial y compararlo con un medio adecuado para ésta (caldo selen

nito.)

b) Determinar si los factores que favorecen el crecimiento de Salmonella enteritidis B en el liquido sinovial, son quimicos ó immunoquimicos.

c) Investigar si existen diferencias significativas en el crecimiento de Salmonella enteritidis B. de liquido sinovial de pacientes con LES y Artritis Reumatoide (AR), éste último grupo utilizado como control positivo.

### 1.3 HIPOTESIS

Existe en el liquido sinovial algún ( ó algunos), factor ( ó factores ), local ( ó locales ) en los pacientes con LES que favorecen el desarrollo de Salmonella enteritidis B.

## CAPITULO II

### ANTECEDENTES

#### 2.1 LIQUIDO SINOVIAL

El líquido sinovial se encuentra en todas las articulaciones, tiene un efecto lubricante, nutricional y depurador del cartilago articular y de los catabolitos celulares. Se considera como un trasudado o dializado del plasma y su composición esta determinada por un proceso de difusión y secreción activos. Es transparente, incoloro o amarillo pálido, su viscosidad esta relacionada con el hialuronato compuesto por glucosa y ácido glucurónico (7).

Paracelsus (1493-1541) fué el primero en estudiar el líquido sinovial, en particular su viscosidad ( Field and Harrison, 1957); sin embargo Alarcón y Segovia (1980), sugirieron que las primeras descripciones del líquido sinovial y la terapéutica por artrocentésis, fue desarrollada originalmente por los Aztecas. El análisis citoquímico grueso de líquido sinovial, sirven para clasificarlo en 5 grupos: normal, no inflamatorio y purulento (ver cuadro 1). En el líquido sinovial se pueden encontrar diferentes tipos de cristales (cuadro 2).

En base a los padecimientos ocasionalmente se puede encontrar la presencia de factor reumatoide (FR), IgM e IgG, en el líquido sinovial de pacientes con LES, AR y Artritis Reumatoide juvenil (ARJ) (2,24).

**CUADRO 1**  
**VALORES NORMALES Y CLASIFICACION DEL LIQUIDO SINOVIAL**

DETERMINACION	NORMAL	NO INFLAMATORIO (GRUPO I)	NO INFLAMATORIO (GRUPO II)	PURULENTO (GRUPO III)
VOLUMEN	< 4	> 4	> 4	> 4
COLOR	Claro Lige- ramente amarelento	Xantofeico	Xantofeico o blanco	Blanco
ASPECTO	Transparente	Transparente	Transparente u opaco	Opaco
VISCOSIDAD	Muy Alta	Alta	Baja	Muy baja
CONTEO NUCLEA	Grado I	Grado II	Grado II,III	Grado II,III
CONTEO FIBRINA	Negative	Negative	Positive	Positive
LEUCOCITOS mm <sup>3</sup>	13 - 100	3 000	3 000 - 50 000	50 000 - 200 000
PMN %	25	25	70	90
LINFOCITOS	75	75	30	10
GLUCOSA mg %	0 - 150	---	---	---
PROTEINAS TOT. (SP. X)	1.2-3.0	> 3.0	> 3.0	> 3.0
Cl y mg eq/ml	10	---	Incrementado	---
CH <sub>2</sub> BI/ml	25 - 50	N o D	N o D	N o D
C3 mg %	54.7 - 73.7	N o D	N o D	N o D
C4 mg %	16.3 - 30.1	N o D	N o D	N o D
AMN e	Negative	---	---	---
RNA	Negative	---	---	---
BACTERIOLOGICA	Negative	Negative	N o Positive	Positive
PANCIENIENTOS		Osteoartritis G.R. leopran Gonorr G. S Poliartritis nodosa Etiolodermis Gonitoidosis Gota	Ex. Bacter Eritis viral Eritis heretica Fiebre reumatica	Bacteriana Tuberculosis

SE REALIZO EN EL LAB. DE INMUNOLOGIA. HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO LA BASA  
CON LA ASISTORIA DE Q.F.B. MA. LOURDES IRIGOLEN CORIA  
\*AAN-ANTICUERPOS ANTIMUCLEARES \*LUPUS ERYTEMATOSO  
\*AN TENDRANA-ARTRITIS REUMATOIDE TENDRANA \*NOY NO DETECTABLE

CUADRO 2  
 PRESENCIA DE DIFERENTES CRISTALES EN LIQUIDO SINOVIAL.

CRISTALES	TAMANO $\mu$	FORMA	BIREFRINGENCIA
URATO DE SODIO	5 - 20 $\mu$	AGUJA	+ AMARILLO
PIROFOSFATO DE CALCIO	8 - 10 $\mu$	ROMBOIDE	+ AZUL
OXALATO DE CALCIO	2 - 10 $\mu$	CUBOIDE	NEGATIVA
COLESTIENOL	100 $\mu$	ROMBO	POSITIVA

SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA HOSP. DE ESPECIALIDADES C.M. LA RASA CON LA ASESORIA DE Q.T.B. MA. DE LOURDES IRIGOYEN COZIA

Onett y col., han investigado la asociación del factor reumatoide presente en suero y líquido sinovial, encontrándose que en suero los niveles son más elevados (2).

Argil y Credaro, han investigado la asociación de anticuerpos dirigidos contra el núcleo en sus reportes sobre líquido sinovial de pacientes con LES, AR y Colagenopatías, así como también en citoplasma y citoesqueleto celulares. Durante el proceso inflamatorio del líquido sinovial se han reportado crioprecipitados, complejos inmunes disminuidos así como factores del complemento principalmente de la vía alterna (2).

## 2.2 Salmonella sp.

Es una bacteria gram negativa, móvil anaerobia facultativa, fermentadora de glucosa, oxidasa negativa, con antígenos somáticos (O) y flagelares (H) (8).

Representan un grupo de bacterias formado por 3 géneros que han sido ampliamente estudiados por Edwards y Edwin en 1979 y - que son:

Salmonella, Arizona y Citobacter.

Su identificación serológica y su aislamiento, fueron descritos por Gaertner en 1888, postulando que Salmonella enteritidis era Salmonella typhimurium (19).

Estudios relacionados con el DNA de bacterias clasifican a Salmonella sp e indican que las tres unidades taxonómicas --- S. cholerae-suis, S. typhi y S. enteritidis, están relacionadas entre 70 y 100% (14).

Originalmente las diferentes especies de Salmonella sp. se nombraban de acuerdo a la enfermedad que causaban. En 1934 la terminología de White-Kasffmann, tiene un rango específico a cada tipo de Salmonella sp. antigénicamente distinguible, se nombró por el lugar geográfico donde se aisló por primera vez. En 1978 el sistema comprendía cerca de 2000 serotipos. S. enteritidis, contiene más de 1500 serotipos, viven en los tejidos de reptiles, aves, mamíferos y seres humanos. La infección se debe a ingestión de alimentos, agua o leche contaminados por bacterias (19).

Las manifestaciones clínicas de salmonelosis se han dividido en:

- 1.- Gastroenteritis
- 2.- Bacteremia con o sin lesiones focales (extraintestinales).
- 3.- Fiebre entérica (fiebre tifoidea)
- 4.- Estado de portador sano.

#### 2.2.2. Estructura antigénica.

El esquema de White - Kasffmann contiene la clasificación antigénica de Salmonella sp. y la cual se divide en grupos según sus antígenos principales O (somáticos) que son al 1, 4, 5 y 12, los grupos se indican con mayúsculas (A, B, C, y E hasta la Z) y se subdividen (serotipos) por sus diferencias en los antígenos H (flagelares) fase I y fase II (1, 2). Los antígenos O se indican con números arábigos y los antígenos H con minúscula (fase I) y números arábigos (fase II) (19).

2.2.3. Composición química de los medios de cultivo y su influencia en el crecimiento de Salmonella sp.

El crecimiento de Salmonella sp se logra proporcionando las condiciones adecuadas de nutrientes, pH, temperatura y factores de crecimiento (19).

Entre los nutrientes se tienen:

a) Donadores de hidrógeno: se requieren como una fuente de energía (sustratos oxidables) como las sales biliares, cisteína, ácido sulfhídrico, etc. (27).

b) Aceptores de hidrógeno: son proporcionados por compuestos orgánicos ( glucosa ) e inorgánicos (selenito, nitratos, carbonatos).

c) Fuente de carbono: la requieren como todos los microorganismos para la síntesis de compuestos orgánicos que constituyen el protoplasma; emplean como fuente de carbono los compuestos orgánicos energéticos, pero requieren además pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub>.

d) Fuente de nitrógeno: en las bacterias, el nitrógeno - representa aproximadamente el 10% de la célula en peso seco, lo requieren por la capacidad enzimática del organismo, aunque en el protoplasma se encuentra combinado en forma orgánica. La mayoría de las bacterias pueden utilizar el NH<sub>3</sub> ( Salmonella sp. ) como la única fuente de nitrógeno.

Los factores de crecimiento son:

Purinas y Pirimidinas ( componentes de ácidos nucleicos )  
ácidos grasos (componentes de las grasas y los lípidos) (27).

Las bacterias de este grupo tienen necesidades simples, necesitan sal de amonio y glucosa, piruvato y lactato son fuentes adecuadas de nitrógeno y carbono. No requieren vitaminas ni aminoácidos. El pH adecuado para el crecimiento se encuentra entre 6 y 8. Temperatura 37°C. Son anaerobios facultativos desarrollándose igualmente en condiciones aerobias o anaerobias (53).

### 2.3 Artritis Séptica (Artritis por Salmonella sp.)

Las infecciones por Salmonella sp. se relacionan con la virulencia de la bacteria, así como con las condiciones del huésped. Tras la infección, el huésped ocasionalmente es portador crónico; esta complicación se observa frecuentemente en el paciente comprometido (16).

La artritis por Salmonella sp. es una complicación frecuente de la septicemia por Salmonella sp. con una incidencia de 0.2-2.4 %. Generalmente es adquirida hematogénicamente y como en otras artritis gram negativas, hay daño articular previo u otros factores predisponentes, como son: hemoglobinopatías (anemia de células falciformes, talasemia menor), diabetes mellitus, enfermedades de tejido conectivo (ETC), alcoholismo y terapia antibiótica, esteroides o inmunosupresiva.

Las infecciones gastrointestinales por Salmonella sp. pueden producir tres distintas condiciones: a) artritis reactiva, b) artritis séptica y c) osteomielitis.

### Artritis Sèptica

Se observa en pacientes con enfermedades subyacentes. El diagnòstico de la infecciòn con Salmonella sp. en el paciente comprometido no es siempre fàcil, dado que el episodio previo de diarrea con frecuencia no se observa ( estuvo ausente en 7 de 8 pacientes con LES y con artritis sèptica por Salmonella sp. estudiados) (15).

La artritis por Salmonella sp. es mäs frecuente en adultos juvenes ( promedio 27 años ) por su asociaciòn con enfermedad de cèlulas falciformes y enfermedad de tejido conectivo. La artritis sèptica es mäs comùn en hembras (6:1); esta diferencia es - aùn mayor con respecto a infecciòn articular por Salmonella sp. (16).

La prevalencia de Artritis por Salmonella sp. es baja, dado que sòlo 0.27% de los pacientes con septicemia desarrollan èsta complicaciòn. El tiempo transcurrido entre la bacteremia y el diagnòstico de artritis sèptica parece ser mäs largo ( de 4 a 7 semanas) que en artritis reactiva.

Los sntomas de la infecciòn en articulaciòn por Salmonella sp. son agudos pero no especificos e incluyen: inflamaciòn con siderable, debilidad y dolor sobre el movimiento de articulaciòn afectada asi como fiebre progresiva. Las articulaciones principalmente afectadas son: rodillas, cadera, tobillo y codo. En la forma poliarticular, las rodillas siempre estàn involucradas. O tras articulaciones perifèricas pueden ser afectadas. Las sacro

litis séptica es observada raramente (16).

La septicemia por Salmonella sp. en niños con enfermedad de células falciformes, ha sido reconocida entre los principales factores predisponentes al desarrollo de la artritis séptica y osteomielitis (15).

En 1985, Abramson y cols. revisaron todos los casos de infección por Salmonella sp. documentados en adultos en el hospital Bellevue durante un periodo de 8 años, e inesperadamente la enfermedad subyacente más común entre pacientes bacterémicos fue el LES. Los pacientes con LES contaron 6 de 30 bacterémicos por Salmonella sp. comparados con 13 de 2,388 bacterémicos gram negativos no-Salmonella sp. La Salmonella sp. fue el microorganismo gram negativo más frecuente aislado de pacientes con LES. Además en una publicación reciente, se reportó que 5 de 6 pacientes con artritis séptica por Salmonella sp. tenían LES subyacente; similares resultados fueron reportados en un estudio multicéntrico de 18 pacientes con artritis séptica por Salmonella sp., 17 tenían LES (1).

Durante los últimos 7 años, se han observado 28 pacientes con artritis séptica. Salmonella enteritidis fue aislada del líquido sinovial de 9 pacientes (32.1%). 8 de 9 pacientes con artritis séptica por Salmonella sp. tenían LES subyacente y sólo uno tenía otra enfermedad reumática ( escleroderma ) (16).

Las principales manifestaciones clínicas de los 8 pacientes con LES y artritis séptica por Salmonella sp. son: todas fueron mujeres y la edad promedio es de 27.5 años ( 18-44 años ). Todos

los pacientes tienen enfermedad activa de acuerdo a los criterios de Chubick y 7 tienen glomerulonefritis proliferativa difusa; todos tienen esteroides ( 60 mg. diarios -prednisona- ) y 7 ciclofosfanida como tratamiento (75-150 mg diarios). Es notorio que los pacientes bajo tratamiento con ciclofosfanida la habian manifestado en los 30 días anteriores a la aparición de la artritis por Salmonella sp. Las articulaciones más afectadas fueron las rodillas, codos y tobillos. En 2 pacientes habian 2 articulaciones y en un paciente 3 articulaciones involucradas simultáneamente. En 2 pacientes, la artritis por Salmonella sp. reincidió en la misma articulación después de 2 meses hasta 8 años (10).

La asociación de artritis séptica por Salmonella sp. con LES ha sido sugerida antes, éstos hallazgos enfatizan también la asociación de daño renal y tratamiento con prednisona y ciclofosfanida en pacientes con LES que desarrollaron artritis séptica por Salmonella sp.

Con el fin de conocer si un estado portador de Salmonella sp. es necesario para desarrollar artritis séptica por este microorganismo, se obtuvieron cultivos de heces, sangre y bilis de 15 pacientes con LES activo y 15 con LES inactivo sin previa artritis séptica, así como de otros 15 pacientes sin enfermedades reumáticas: en ninguno de estos pacientes se aisló Salmonella sp. de cultivos de heces, sangre ó bilis. Por otro lado, Salmonella enteritidis fue aislada de heces en 2 pacientes y de bilis en 1 de 5 pacientes con LES y previa artritis séptica por Salmonella

sp.. Esto demuestra que la artritis séptica por Salmonella sp. se desarrolla con más frecuencia en pacientes con infección gastrointestinal crónica por dicha bacteria (37).

### Tratamiento

Se utilizan drogas antiinflamatorias no esteroides. La administración de indometacina en dosis altas ( 100-150 mg/24 hrs. ) es terapia efectiva. Antibióticos parenterales, drenaje quirúrgico abierto ó cerrado y reposo articular. Los mejores agentes antimicrobianos son cloranfenicol, oxaciolina y ampicilina. El drenaje de la articulación puede hacerse por aspiración repetida artroscopia, irrigación-succión cerrada ó artrotomía.

Salmonella sp. produce osteomielitis aguda en pacientes con enfermedades subyacentes (anemia de células falciformes, enfermedad de tejido conectivo, etc.). Los pacientes con LES y artritis séptica por Salmonella sp. probablemente deben ser tratados como casos presuntivos de osteomielitis aguda y además deben aplicarse antibióticos adecuados por largos periodos y drenaje quirúrgico también.

## 2.4 Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

### 2.4.1. Generalidades

El Lupus Eritematoso Sistémico ( LES ), es un síndrome inflamatorio crónico de etiología desconocida que puede afectar diferentes órganos. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son muy diversas: fiebre, exantema eritematoso, poliartralgias,

artritis, poliserositis (especialmente pleuritis y pericarditis), anemia, trombocitopenia y alteraciones renales, neurológicas y cardiacas. El nombre de la enfermedad se debe en parte al exantema facial que aparece en algunos casos. El término de Lupus se refiere a la naturaleza erosiva de la enfermedad (26,44).

El LES aparece con mayor frecuencia en mujeres, particularmente adolescentes y adultas jóvenes, en quienes la enfermedad aparece 6 veces más que en los varones; la enfermedad se presenta en personas de todas las razas (37).

Puede ser Fulminante y rápidamente mortal, en la actualidad estas formas no son frecuentes y en la mayoría de los casos existe una evaluación crónica irregular en la cual los episodios de actividad alternan con largos periodos de remisión completa o casi completa; aunque hay formas leves de LES, algunos pacientes a la larga fallecen como consecuencia de las lesiones vasculares que afectan los riñones (glomerulonefritis proliferativa difusa), sistema nervioso central y otros órganos vitales, algunos pacientes mueren por infecciones secundarias (22,28,44).

#### 2.4.2. Diagnóstico

Se basa en un conjunto de hallazgos clínicos y se confirma con pruebas serológicas, histopatológicas y otros análisis de laboratorio. Los criterios de la ARA (American Rheum. Assoc.) para LES son:

- a).- Eritema Malar: fijo, liso o rugoso en mejillas y

pliegues naso-labiales.

- b).- Eritema discoide: escamación quieratinosa y obturación folicular.
- c).- Fotosensibilidad: eritema en piel por reacción a la luz solar.
- d).- Ulceras orales: ulceración oral o nasofaríngea poco dolorosa.
- e).- Artritis: de dos o más articulaciones, hipersensibilidad, edema y sinovitis.
- f).- Serositis: pleuritis (dolor y derrame pleural) pericarditis (frote y derrame pericárdico).
- g).- Alteraciones renales: proteinuria y cilindros.
- h).- Alteraciones neurológicas: ataques convulsivos y psicosis.
- i).- Alteraciones Hematológicas: anemias hematológicas.
- j).- Anticuerpos antinucleares con títulos elevados, células LES positivas, anti-DNA elevado y anti-Sm positivo (18).

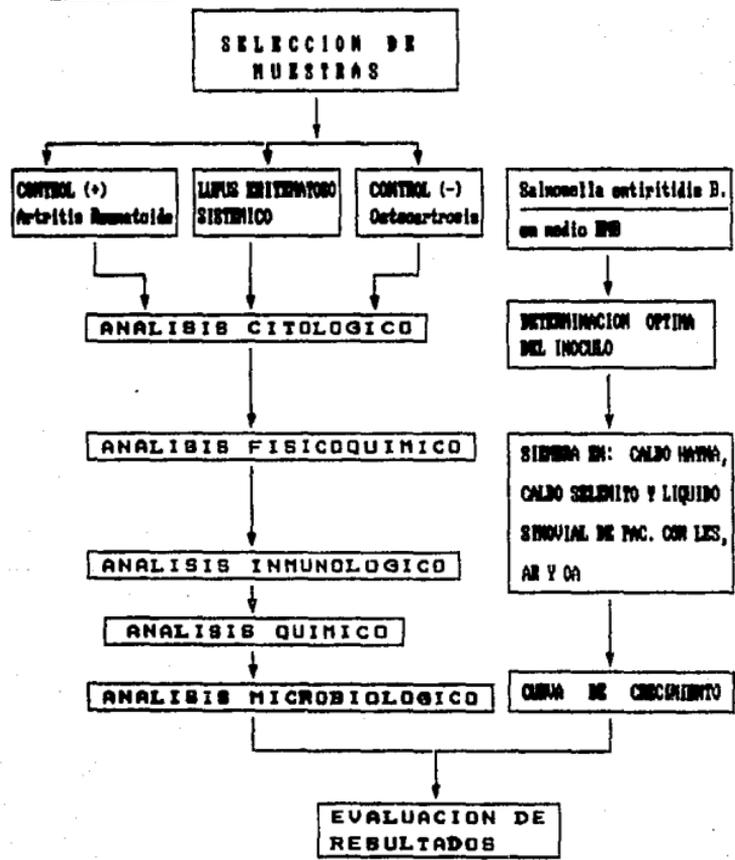
### 2.4.3 Tratamiento

No existe un tratamiento que pueda considerarse absolutamente indicado para el LES. El ácido acetilsalicílico (4 g diarios o más) debe emplearse en dosis antiinflamatorias más altas como el primer fármaco de elección para la fiebre, artralgia o artritis. Los pacientes con LES florido, deben ser internados en un

hospital donde se les someta a la dosificación mayor del ácido - acetilsalicílico durante varios días o una semana. Los antiplaquéticos, cloroquina e hidroxicloroquina puede utilizarse también. Los corticosteroides adrenales cuando se administran por primera vez tienen un efecto dramático sobre los síntomas y signos de la enfermedad, pero con el transcurso del tratamiento estos efectos van desapareciendo. Los fármacos citotóxicos generalmente anqálogos de las purinas, azatioprina, ciclofosfáida por vía bucal y la azatioprina por vía bucal al parecer previenen o retrasan el comienzo del deterioro de la función renal en algunos pacientes (37).

CAPITULO III  
PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA DE FLUJO



### 3.2. Material, Reactivos y Equipo

#### 3.2.1. Material Biológico

##### a). GRUPO CON LES

Líquido sinovial con anticoagulante (heparina) y sin anticoagulante provenientes de 10 pacientes del sexo femenino con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) bajo tratamiento con prednisona 30 mg. al día.

Las edades de los pacientes son desde 18 hasta 67 años.

##### b). GRUPO CON AR (CONTROL POSITIVO)

Líquido sinovial con anticoagulante ( heparina ) y sin anticoagulante provenientes de 13 pacientes con Artritis Reumatoide (AR) cuyas edades van desde los 22 hasta los 69 años.

##### c). GRUPO CON OA (CONTROL NEGATIVO)

Líquido Sinovial con anticoagulante ( heparina ) y sin anticoagulante proveniente de 6 pacientes con Osteoartritis (OA) cuyas edades van desde los 50 hasta los 73 años.

#### 3.2.2. Material de Laboratorio

- 1.- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- 2.- Pipetas Pasteur
- 3.- Pipetas de 1, 5 ml.
- 4.- Pipeta de 20 y 25 ul.
- 5.- Tubos de 12 x 75 mm.

- 6.- Porta objetos con HEP-2.
- 7.- Agitador (vortex).
- 8.- Gradilla.
- 9.- Porta-objetos de 26 x 76 mm.
- 10.- Cubre-objetos de 24 x 50 mm.
- 11.- Cubetas de tención de Coplin
- 12.- Cámara Humeda
- 13.- Cubetas de lectura para Nefelometria
- 14.- Porta-objetos con Crithidia lucilliae
- 15.- Pipeta automática de 50 ul.
- 16.- Cajas de cultivo celular.
- 17.- Puntas amarillas estériles.
- 18.- Isopos estériles
- 19.- Cajas Petri de 19x48 mm.
- 20.- Papel parafilm
- 21.- Vasos de precipitados de 100 ml.
- 22.- Baño maria

### 3.2.3. Reactivos

- 1.- Solución de estándares para C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>, IgG, IgA, IgM.
- 2.- Antiseros Anti C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>, IgG, IgA, IgM.
- 3.- Gamaglobulina antihumana conjugada con fluoresceína (de conejo), comercial Anti-Human-FgG + A + m keff fluorocsein konjugient OTKG 04/05 Behringwerke A.G. Marburg.

Titular antes de usarla, para trabajo, generalmente se usa 1:20 (primero hidratar con 1 ml de agua - destilada y adicionar 1 ml de PBS y alicuotar en tubos de plástico con 0.1 ml (dil 1:2) + 0.9 ml de PBS + 100 ul de azul de Evans de trabajo.

Estable 1 día.

4.- PBS (Buffer fosfato salino)

I.- Solución NaCl 10 X (0.15) M.

NaCl - 87.66 g.

Azida de Sodio - 1 g

H<sub>2</sub>O destilada - c.b.p. 1000 ml

II.- Solución fosfatos 10 x (0.1) M.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 14.1965 g.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 13.6091 g.

Azida de Sodio - 1 g.

H<sub>2</sub>O destilada c.b.p. 1000 ml.

SOLUCION DE TRABAJO

100 ml de la solución I + 100 ml de la solución II.

Aforar a 1 L. con H<sub>2</sub>O destilada y ajustar pH 7.4 con NaOH 2N.

5.- Solución azul Evans (coloración de contraste) comercial de Behringwerke OHHU 14/15 10g/L.

Solución de trabajo: 1 gota de azul de Evans

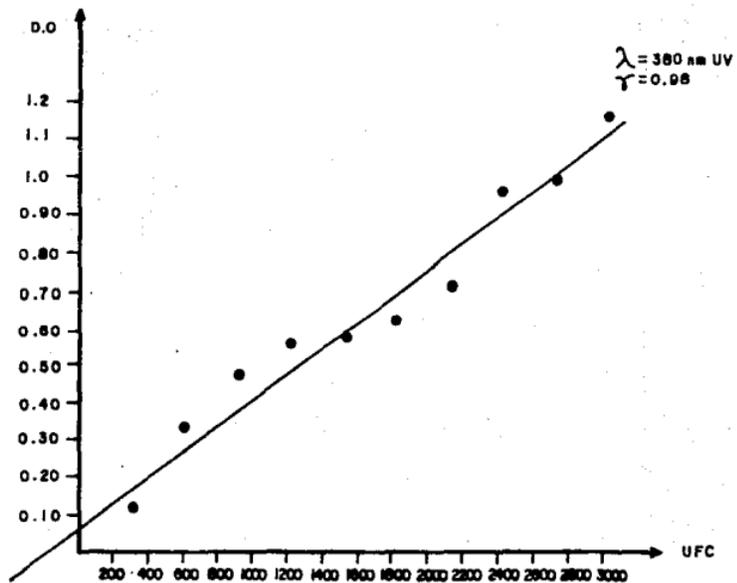
4 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

Guardar a temperatura ambiente y cubierta de la luz visible.

- 6.- Solución de montaje (glicerol al 50% con PBS).  
1 vol. PBS: 1 vol. de glicerina.
- 7.- Aceite de Inmersión.
- 8.- Discos acoplados con  $C_{14}$  (cabra) 65 discos. Merck
- 9.- Conjugado anticuerpos IgG ó IgM marcados con fosfatasa alcalina.
- 10.- Control positivo fuerte (lío filizado) conteniendo albúmina sérica bovina 6% liofilizados.
- 11.- Control positivo débil.
- 12.- Control negativo con menos de 10 ul.
- 13.- Diluyente para las muestras (50 ml).
- 14.- P- nitro fenil fosfato ( p- NPP). Viales con 50mg.
- 15.- Buffer de Carbonato de sodio (20 ml de concentración 10 x (diez veces concentrado).
- 16.- Solución de Hidróxido de sodio (NaOH) 3N (15 ml).
- 17.- Solución salina (0.9%).
- 18.- Agar SS.
- 19.- Caldo Selenito.
- 20.- Antisueros poly I y anti VI.
- 21.- Medio de cultivo EMB (eosina azul de metileno).
- 22.- Caldo Hayna.
- 23.- Suspensión del tubo 2 de la curva de Mc-Farland (gráfica 1).

Gráfico 1

CURVA DE MC-FARLAND



### 3.2.4. Equipo

- 1.- Densitómetro.
- 2.- Microscopio compuesto Hewlett Packard.
- 3.- Microscopio de fluorescencia Hewlett Packard.
- 4.- Gasómetro (IL-813).
- 5.- Espectrofotómetro Coleman junior II.
- 6.- Campana de flujo laminar.
- 7.- Mechero de Bunsen.
- 8.- Nefelómetro Behring Lasser tipo Model F-B registro  
L 31032/39428 100 watts.
- 9.- Centrifuga de 8 camisas ( 6500 rpm.)
- 10.- Incubadora 37°C.

### 3.3. Metodología

#### 3.3.1. Análisis Citológico y Físicoquímico del Líquido Sinovial

##### Color

Se busca en la medición visual del líquido sinovial. Pueden existir una variedad de colores, desde blanco, amarillo ( xantocrómico ), amarillo verdoso hasta rojo, dependiendo de la presencia de: leucocitos, bilirrubina eritrocitos y bacterias.

##### Viscosidad

Consiste en la medición cualitativa de la concentra

ción de ácido hialurónico, se reporta: muy alta y alta cuando el líquido sinovial hace hebra; baja y muy baja cuando el líquido sinovial se corta como gota de agua.

#### Coágulo de Mucina

Permite medir el grado de polimerización de hialuro nato (proteína del ácido hialurónico). Agregar al líquido vial ácido acético 7 N y observar la precipitación.

Reportar en 4 grados:

Grado I: Masa compacta y apretada.

Grado II: Masa suelta y blanda.

Grado III: Fragmentos sueltos pero compactos.

Grado IV: Fragmentos pequeños.

#### Densidad (densitometría)

Está dada por la concentración de solutos que se encuentran en el líquido sinovial, determinado por medio de un densitómetro.

#### Aspecto

Es una medida física de la transparencia del líquido sinovial, se encuentra dada por la concentración de solutos y células presentes. Reportar como transparente u opaco.

En base a los valores normales y clasificación del líquido sinovial catalogar en inflamatorio grupo I y II.

Inflamatorio (grupo I): color amarillo (xantocrómico),

transparente, mayor de 4 ml, viscosidad alta, coágulo de mucina grado II, coágulo de fibrina negativo, leucocitos 3000/mm<sup>3</sup> PMN 25% y linfocitos 75%. Inflamatorio (grupo II): color amarillo (xantocrómico) ó blanco, transparente u opaco, viscosidad baja, coágulo de mucina grado II y grado III, coágulo de fibrina positivo, leucocitos de 3000 - 5000/mm<sup>3</sup>, con 70% PMN y 30% de linfocitos.

Gasometria (análisis fisicoquímico).

Determinación de pH, presión parcial de O<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub>), presión parcial de CO<sub>2</sub> (PCO<sub>2</sub>), CO<sub>2</sub> total y exceso de base (BEB).

3.3.2. Análisis Inmunológico del Líquido Sinovial

Inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) complemento (C<sub>1</sub> y C<sub>3</sub>)

Nefelometría

- 1.- En tubos de 12 x 75 mm hacer una dilución 1:101, tomar 10 ul para IgG, para los líquidos sinoviales problemas, control y estandar.
- 2.- Hacer una dilución 1:5 del antisuero para todos los líquidos sinoviales (0.5 ml del antisuero + 2.5 ml de solución salina).
- 3.- Agregar a las cubetas de lectura 200 ul. del antisuero diluido 1:5 y 10 ul de la dilución 1:101 del líquido sinovial problema y estandar para IgG 1 ul del

líquido sinovial y estandar diluido para IgA, IgM y C<sub>3</sub> para C<sub>3</sub> agregar 5 ul del líquido sinovial problema y estandar diluido 1:101.

- 4.- Agitar sin hacer burbujas. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 5.- Leer en el Nefelómetro (agitar poco antes de leer). El intenso enturbiamiento de las muestras, puede alterar los resultados, especialmente en la zona de valores bajos. Las lecturas se hacen en proporción de volts/concentración.

#### Anticuerpos Antinucleares (AAN).

#### Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

- 1.- Meter el líquido sinovial sin diluir.
- 2.- Sacar los portaobjetos con HEP- 2 y dejarlos a temperatura ambiente para evaporar el agua.
- 3.- Nivelar la cámara húmeda con esponjas humedecidas con agua.
- 4.- Marcar los pocillos del portaobjetos con el número correspondiente de muestras de líquido sinovial.
- 5.- Cubrir con una gota de cada líquido sinovial. (con pipeta de 20 ul) la cual está en cámara húmeda y dejar incubar 30 min. a temperatura ambiente.
- 6.- Lavar los portaobjetos con PBS a chorro y dejar sumergidos en cubetas de Coplin con PBS durante 10 min. (hacer 3 lavados).
- 7.- Secar brevemente y cubrir los portaobjetos con antigammaglo

- bulina humana conjugada con fluoresceína ( cada pozo con 25 ul. para una preparación se usan 200 ul.) e incubar en cámara húmeda durante 30 min. a temperatura ambiente.
- 8.- Lavar los portaobjetos con PBS a chorro y dejar sumergidos en cubetas de Coplin con PBS durante 10 min. ( 2 lavados ) y el tercer lavado 15 min.
  - 9.- Secar las orillas de la preparación y adicionar 3 gotas de la solución de montaje y cubrir con un cubreobjetos.
  - 10.- Colocar los portaobjetos sobre una base negra y cubrirlos de la luz.
  - 11.- Leer la inmunofluorescencia con objetivo de inmersión en un microscopio de fluorescencia y detectar patrones.

Patrón Homogéneo.- Presenta el núcleo totalmente teñido y con la misma intensidad, debido a que reconoce DNA e histonas. Característico de LES activo, LES subclínico, LES por drogas enfermedad de la colágena, hepatitis crónica activa lupoides.

Patrón Periférico.- Presenta fluorescencia brillante en el contorno del núcleo, debido a que reconoce DNA de doble -- cadena, característico de LES activo, y otras enfermedades de la colágena.

Patrón Moteado.- Presenta fluorescencia en manchas que van desde puntitos brillantes hasta grumos por lo que se clasifican en: moteado fino, moteado grueso, moteado dig

creto y moteado citoplásmico, ya que puede presentarse tanto en núcleo como en citoplasma. El patrón moteado fino es característico de LES, Sx. de Sjörgren, el moteado grueso es característico de la Enfermedad Mixta de Tejido Conyuntivo (ETMC). El moteado discreto es característico de Sx. Raynaud, Sx. Crest y Escleroderma. El moteado citoplásmico es característico de Cirrosis Biliar Primaria, Hepatitis Crónica Activa, Sx. Sjörgren, Lupus Neonatal, Lupus cutáneo.

Patrón Nuclear.- Presenta fluorescencia en los nucleolos como su nombre lo indica, reconoce RNA. característico de: Esclerosis Sistémica Progresiva y Esclerodemia.

Patrón Fibrilar.- Presenta fluorescencia en fibras que pueden atravesar tanto citoplasma como núcleo, reconoce microtúbulos (tubulina) filamentos intermedios (citoqueratina neurofilamentos, filamentos de desmina, gliales y de vimentina), microfilamentos (actina). Característico de LES, Artritis, Cirrosis Biliar, Primaria, Hepatitis Crónica Activa, Sx. Creutzfeldt Jakob, infecciones de Epstein-Barr y micoplasma, polimiositis, Anemia Hemolítico Autoinmune, Púrpura Trombocitopénica Idiopática.

### 3.3.3. Análisis Químico del Líquido Sinovial

Proteínas totales.- Se basa en la reacción de dos o más enlaces peptídicos (proteína) con un reactivo cúbrico alcalino, formando

se un complejo colorido azul ( ión cúprico y dos enlaces peptídicos), la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de proteína. Leer a 545 nm en un espectrofotómetro.

Glucosa.- La glucosa - oxidasa actúa sobre la glucosa para formar gluconolactosa, que en presencia de O<sub>2</sub>, da ácido glucónico más peróxido de hidrógeno y al adicionar ORTO díanicidina ( reactivos cromogénicos de O<sub>2</sub> ) se obtiene una solución coloidal es directamente proporcional a la concentración de glucosa.

#### 3.3.4. Análisis Microbiológico del Líquido Sinovial Tipificación de Salmonella enteritidis B

En un portaobjetos colocar 3 gotas, una de las cuales es solución salina con cepa problema (testigo autoaglutinación) la siguiente es poly I y la última es anti VI, mezclar cada gota problema con su antígeno y observar aglutinación ( aglutinación rápida 30 seg).

Si aglutina con anti VI, calentar 60 min. en baño maría a 56°C. y probar con poly I. Si aglutina con poly I, probar con el grupo D y con C<sub>1</sub>.

En el laboratorio se trabajó con una cepa de Salmonella enteritidis B aislada de líquido cefalorraquídeo.

#### Análisis Microbiológico Especial

Una vez obtenidas las muestras de líquido sinovial, se les realiza un Análisis Microbiológico General sembrando en dife

rentes medios de cultivos existentes, con el fin de comprobar -  
que en ellas no existe ningún tipo de desarrollo bacteriano --  
(figura 1).

Después de haber obtenido el reporte del exámen Micro  
biológico General de los líquidos sinoviales en estudio (LES, AR  
Y OA ) sin desarrollo bacteriano, se procede a inocular la cepa  
de Salmonella enteritidis B en el líquido sinovial, el cual es  
previamente centrifugado con el fin de eliminar partículas ( leu  
cocitos y PMN ) que pueden interferir en el crecimiento de dicha  
bacteria.

Incubar a 37°C. y cosechar a las 2, 24, 48 y 72 hrs. in  
terpolando la densidad óptica (D.O.) en la curva de Mc-Farland y  
reporta concentración de Unidad Formadoras de colonias (UFC)

1.- Hacer una suspensión con 2 ml de solución salina estéril  
con una cepa de Salmonella enteritidis B (comparar con el tubo  
No. 2 de la curva de Mc-Farland que es la concentración óptima -  
de inóculo  $30 \times 10^8$  UFC. Todo se debe trabajar en la campana de  
flujo laminar, para evitar contaminación (cuadro 3, gráfica 2).

2.- Colocar 0.15 ml de líquido sinovial en estudio, como se  
indica en el cuadro 4.

3.- En una microplaca para cultivo de células, colocar el  
líquido sinovial en estudio según la letra que corresponda, es  
decir de la A a la G muestra de líquido sinovial y en la última  
letra(H) el control que es caldo selenito. Los números que se en  
cuentran en la parte inferior de la placa, corresponde a las hrs.

Figura 1

ANALISIS MICROBIOLÓGICO GENERAL DEL LIQUIDO SINOVIAL

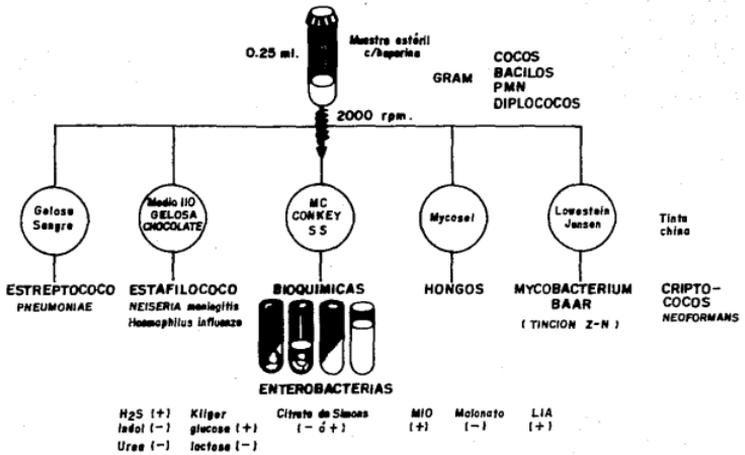
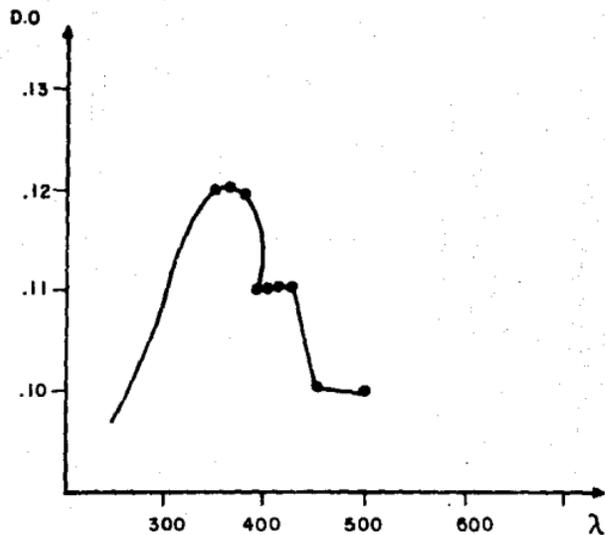


Gráfico 2

ESPECTRO DE ABSORCION  $B_2SO_4$



que se van a incubar cada liquido sinovial y al control de estérilidad ó blanco (sólo liquido sinovial ).

4.- Sobre cada pozo con 0.15 ml. de liquido sinovial, pipetear 50 ul de la suspensión de Salmonella enteritidis B previamente preparada y estandarizada.

5.- Cerrar la placa teniendo la precaución de especificar cada hilera vertical ( letras ) con el número del paciente a que corresponde.

6.- La caja de microcultivo se introduce en la incubadora a 37°C. durante 2,24,48 y 72 hrs. Esto es con la finalidad de realizar las curvas de crecimiento correspondientes a cada paciente.

7.- Al llegar las 2 hrs. de incubación sacar la placa de la incubadora y cosechar sólo la 1a. hilera ( No. 1 ) con pipeta pasteur en un tubo de 13 x 100 en campana de flujo laminar.

8.- Interpolar las lecturas de D.O. en la curva de Mc-Farland para obtener UFC X  $10^6$ /ml.

9.- Trazar la curva de crecimiento UFC X  $10^6$ /ml vs. tiempo

10.- Calcular el coeficiente de crecimiento de la siguiente manera:

C.C. = UFC obtenidas a las 48 hrs. de incubación  
Concentración de bacterias inoculadas

El análisis estadístico que se aplicó fué la T de Student, para evaluar la significancia de las diferencias de los resultados obtenidos, con una probabilidad del 95%.

CUADRO 3  
ESTANDARIZACION DE LA SUSPENSION BACTERIANA EN LA CURVA DE MC-FARLAND

TUBO	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1x (ml)	NaCl <sub>2</sub> 1x (ml)	Correspondiente de bacterias (aprox. millones x ml) IPC	UI de opacidad
1	9.9	0.9	300	3
2	9.8	0.8	600	7
3	9.7	0.7	900	10
4	9.6	0.6	1200	12
5	9.5	0.5	1500	14
6	9.4	0.4	1800	--
7	9.3	0.3	2100	20
8	9.2	0.2	2400	--
9	9.1	0.1	2700	--
10	9.0	1.0	3000	30

CLASO 4  
ANALISIS MICROBIOLOGICO ESPECIAL DEL LIQUIDO SINOVIAL

	2 hrs.	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	Blanco
A	L. SIN. + S. ent.B	L. SIN. + S. ent. B.	L. SIN. + S. ent. B.	L. SIN. + S. ent.B.	L. SIN.
B	"	"	"	"	"
C	"	"	"	"	"
D	"	"	"	"	"
E	"	"	"	"	"
F	"	"	"	"	"
G	"	"	"	"	"
H	cal. sel. + S. ent.B	cal. sel. + S. ent.B.	cal. sel. + S. ent.B.	cal. sel. + S. ent.B.	cal. sel. +
Mo. de Paso	1	2	3	4	5

L. SIN= liquido sinovial  
S. ent. B.= Salmonella enteritidis B

Cal. Sel= Caldo Selenito.  
+ = Liguídos sinovial problema  
H= Caldo Selenito

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. RESULTADOS

Se seleccionaron 10 muestras obtenidas a partir de pacientes que presentaban Lupus Eritematoso Sistémico (LES); 13 muestras de personas con Artritis Reumatoide (AR) y 6 pacientes con Osteortrosis (OA). En todos los líquidos sinoviales se comprobó su esterilidad, siguiendo el protocolo representado en la figura 1.

Los resultados de los análisis: citológico (cuadro I, II, y III); físicoquímicos (cuadros IV,V,VI); Inmunológicos (cuadros VII,VIII Y IX); Químico (cuadros X,XI,XII) y Microbiológicos Especial se representan en los respectivos cuadros.

Los líquidos sinoviales en estudio fueron inoculados con la concentración óptima de inóculo de Salmonella enteritidis B. la cual se obtuvo sembrando diferentes concentraciones de la cepa en medio EMB (Eosina azul de metileno) y siguiendo el crecimiento por 48 hrs., el cual resultó ser de  $30 \times 10^8$  UFC (cuadro XIII gráf. I).

En la gráfica II se observan las diferencias en las curvas de crecimiento de la cepa en los líquidos sinoviales en estudio. No existió crecimiento cuando se inoculó líquido sinovial en personas con OA. El mayor crecimiento se presenta en los controles positivos (Medio Hayna y Caldo Selenito), mientras que las mue

tras provenientes de pacientes con LES crecen con mayor concentración que en los líquidos sinoviales de pacientes con AR, a excepción del líquido sinovial de pacientes con AR de tipo inflamatorio, en el cual el crecimiento fué semejante al de Lupus - Eritematoso Sistémico (LES).

## CUADRO I

## ESTUDIO CITOLÓGICO DEL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

No. L.S.	DIAGNÓSTICO	LEUCOCITOS/mm <sup>3</sup>	LINPOCITOS %	PMN %	CRISTALES	UFC
1	LES No Inflam	2 300	76	24	NEG	3.6
2	LES Inflam	900	50	50	NEG	1.0
3	LES No Inflam	100	-	-	++ES-OX	1.3
4	LES No Inflam	100	-	-	+++AB-PI	1.5
5	LES No Inflam	0	-	-	++ES-OX	1.3
6	LES No Inflam	0	-	-	NEG	-2.2
7	LES Inflam	1 200	-	-	NEG	0.94
8	LES Inflam	1 000	75	25	NEG	0.73
9	LES Inflam	2 200	75	25	NEG	0.92
10	LES Inflam	900	75	25	NEG	0.75

ES ESCASOS OXALATO DE CALCIO  
 AB ABUNDANTES PIROFOSFATO  
 PI PIROFOSFATO

L.S. LIQUIDO SINOVIAL

ES ESCASOS  
 OX OXALATOS

## CUADRO II

## ESTUDIO CITOLÓGICO DE LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES DE ARTRITIS REUMATOIDE

No. L.S.	LEUCOCITOS/mm <sup>3</sup>	LINPOCITOS %	PMN %	CRISTALES	C.C.
1	62 000	35	65	NEG	3.6
2	18 000	40	60	NEG	1.2
3	10 500	75	25	NEG	0.6
4	10 000	30	70	NEG	1.3
5	10 000	35	65	NEG	1.4
6	100	-	-	NEG	1.0
7	4 100	75	25	NEG	1.3
8	900	50	50	NEG	1.2
9	44 200	70	30	NEG	0.9
10	64 200	36	66	NEG	1.2
11	2 400	75	25	NEG	0
12	1 900	75	25	NEG	0
13	47 500	71	29	NEG	0

C.C. COEFICIENTE DE CRECIMIENTO  
 L.S. LIQUIDO SINOVIAL

**CLASO III**  
**ESTUDIO CITOLOGICO DE LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON OSTEOARTROSIS**

No. L.S.	LEUCOCITOS mm <sup>3</sup>	LEUCOCITOS %	PMN%	CRISTALES	C.C.
1	100	-	-	NEG	0.0
2	-	-	-	NEG	0.07
3	100	-	35	NEG	0.00
4	300	10	35	NEG	0.0
5	-	-	-	NEG	0.07
6	-	-	-	NEG	0.00

C.C. COEFICIENTE DE CRECIMIENTO  
 L.S. LIQUIDO SINOVIAL

**CLASO IV**  
**ESTUDIO FISICOQUIMICO EN EL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES  
 CON LAMPE ENTENDADOS SISTEMICO**

No. L.S.	pH	pCO <sub>2</sub>	pO <sub>2</sub>	BE <sub>E</sub>	HC0 <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub> T
1	8.0	6.0	160.3	+ 3.9	13.3	13.5
2	7.6	15.1	104.9	- 2.0	14.3	14.7
3	7.3	40.2	54.6	- 3.7	21.3	22.5
4	7.4	20.0	84.	- 4.9	15.3	16.0
5	7.2	57.0	40	+ 0.3	27.6	29.0
6	7.5	17.0	123	- 3.6	15.0	15.5
7	7.1	47.0	88.9	- 11.9	16.5	17.9
8	7.5	12.7	86.6	- 5.5	12.0	12.3
9	7.2	30.7	35.6	- 9.4	15.1	16.0
10	7.3	28.4	79.8	- 0.1	15.4	16.2

BE<sub>E</sub> EXCESO DE BASE  
 L.S. LIQUIDO SINOVIAL  
 CO<sub>2</sub>T DIOXIDO DE CARBONO TOTAL

CUADRO V  
ESTUDIO FISICOQUIMICO EN EL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTE CON  
ARTRITIS REUMATOIDE

No.	L.S.I	pH	pCO <sub>2</sub> , mmHg	pO <sub>2</sub> , mmHg	BEB	HCO <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub> T
1		8.0	2.0	11.0	- 40.6	33.9	34.6
2		7.8	9.4	123.6	+ 5.8	18.8	17.7
3		7.5	14.3	148.3	- 7.2	11.6	12.1
4		7.6	16.7	183.5	- 8.8	16.2	16.7
5		7.9	6.7	93.3	+ 3.2	12.9	13.8
6		7.1	47.2	71.7	- 9.2	18.2	19.7
7		7.2	46.2	44.9	- 8.2	18.8	20.2
8		7.0	49.3	8.8	- 14.8	14.6	16.1
9		7.4	23.2	119.	- 8.8	13.9	14.6
10		7.2	39.3	74.9	- 8.3	17.7	18.9
11		7.2	32.7	120.8	- 12.6	13.3	14.3
12		7.3	36.7	33.1	- 3.6	20.6	21.8
13		6.9	63.2	64.8	- 18.9	13.5	15.4

BEB EXCESO DE BASE  
CO<sub>2</sub>T BIXIDO DE CARBONO TOTAL  
L.S. LIQUIDO SINOVIAL

CUADRO VI  
ESTUDIO FISICOQUIMICO EN EL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON  
OSTEOARTROSIS

No.	L.S.I	pH	pCO <sub>2</sub> , mmHg	pO <sub>2</sub> , mmHg	BEB	HCO <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub> T
1		---	---	---	---	---	---
2		7.3	15.8	189.1	- 12.7	9.8	9.5
3		7.0	35.8	53.8	- 13.8	16.8	17.7
4		7.3	31.1	61.2	- 5.8	18.3	19.3
5		7.4	38.7	68.9	- 0.2	23.6	24.8
6		7.3	45.9	42.8	+ 8.6	25.1	26.3

BEB EXCESO DE BASE  
CO<sub>2</sub>T BIXIDO DE CARBONO TOTAL  
L.S. LIQUIDO SINOVIAL

## CAMBIO VII

## ESTUDIO INMUNOLOGICO DEL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

No. I.S.	IgG mg/dl	IgM mg/dl	IgA mg/dl	AAH	ANA	C <sub>3</sub> mg/dl	C <sub>4</sub> mg/dl	C <sub>1q</sub> mg/ml	
1	1500	500	210	H 1:64	NEGATIVO	16	20	1.3	
2	682	70	71	H 1:128	POSITIVO	24	6	1.3	
3	102	42	32	NO	1:64	NEGATIVO	49	16	1.3
4	684	105	40	H 1:128	POSITIVO	10	6	0.0	
5	111	60	30	WF 1:160	NEGATIVO	11	6	9.0	
6	522	45	39	WF 1:164	NEGATIVO	10	6	1.0	
7	250	42	32	NEG	---	NEGATIVO	16	6	15.3
8	682	101	09	NEG	---	NEGATIVO	11	44	1.3
9	250	42	32	NEG	---	NEGATIVO	11	2.7	41.3
10	375	56	32	NUCL 1:32	NEGATIVO	46	2.5	14.5	

AAH ANTICUERPOS ANTINUCLEARES  
NUCL NUCLEOLAR

H HOMOGENE  
NO NOTADO GRUPO

WF NOTADO FINO  
LF LIQUIDO SINOVIAL

## CAMBIO VIII

## ESTUDIO INMUNOLOGICO DEL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

No. I.S.	IgG mg/dl	IgM mg/dl	IgA mg/dl	AAH	ANA	C <sub>3</sub> mg/dl	C <sub>4</sub> mg/dl	C <sub>1q</sub> mg/ml	
1	1512	374	401	WF 1:64	NEGATIVO	23	11.4	40	
2	700	355	309	WF 1:64	NEGATIVO	6	6	1.3	
3	3590	263	286	WF 1:32	NEGATIVO	16	32	0.0	
4	855	109	130	WF 1:64	NEGATIVO	16	10	1.0	
5	2650	42	301	WF 1:120	POSITIVO	45	30	15	
6	700	93	65	NEG	---	NEGATIVO	24	6	0.5
7	1430	263	226	NEG	---	NEGATIVO	16	6	12
8	950	177	135	WF 1:64	NEGATIVO	41	0	10	
9	1250	309	160	NEG	---	NEGATIVO	26	0	0.0
10	2410	500	200	WF 1:32	NEGATIVO	26	9	9	
11	002	300	200	NEG	---	NEGATIVO	40	0.5	140.5
12	903	231	109	NUCL 1:32	NEGATIVO	63	9.9	27.5	
13	---	---	---	NEG	---	---	---	39	

AAH ANTICUERPOS ANTINUCLEARES  
NUCL NUCLEOLAR

WF NOTADO FINO  
LF LIQUIDO SINOVIAL

CUADRO IX  
ESTUDIO INMUNOLOGICO DEL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON OSTEOARTRITIS

No. L. S.	IgG mg/dl	IgM mg/dl	IgA mg/dl	ANM	DNA	C <sub>3</sub> /dl mg	C <sub>4</sub> /dl mg	C <sub>3</sub> mg/ml %
1	260	85	77	NEGATIVO	NEG	10	8.6	8.3
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	250	42	32	NEGATIVO	NEG	16	6	0.4
4	375	40	32	NEGATIVO	---	16	6	---
5	602	55	42	NEGATIVO	---	25	10	---
6	602	171	59	NEGATIVO	---	27	8	---

ANM ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

ND NO DETECTABLE

CUADRO X  
ESTUDIO QUIMICO DEL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

No. L. S.	TIPO INFLAM.	NICHO. CDM.	HEMADIN	PROT. TOTAL g/dl	GLUCOSA mg/%
1	NO INFLAM	S/DB	1.027	3.5	191
2	INFLAM I	" "	1.020	4.0	37.6
3	NO INFLAM	" "	1.023	3.0	69.0
4	NO INFLAM	" "	1.016	1.5	40.0
5	NO INFLAM	" "	1.000	1.0	126.
6	NO INFLAM	" "	1.016	1.5	106.
7	INFLAM I	" "	1.010	1.5	70.0
8	INFLAM I	" "	1.019	2.3	74.0
9	INFLAM I	" "	1.012	1.0	86.0
10	INFLAM I	" "	1.016	2.0	139

S/DB SIN DESARROLLO BACTERIANO

LE LIQUIDO SINOVIAL

**CASO XI**  
**ESTUDIO QUIMICO DEL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

No. L.S.	TIPO INFLAM.	NIQDO. CML.	HEMOCITO	PROT. TOTAL g/dl	GLUCOSA mg/%
1	INFLAM II	S/D	1.035	5.4	13.0
2	INFLAM II	" "	1.027	4.1	8.0
3	INFLAM I	" "	1.048	6.7	8.0
4	INFLAM II	" "	1.027	4.1	38.0
5	INFLAM II	" "	1.033	5.2	40.0
6	NO INFLAM	" "	1.021	2.5	56.0
7	INFLAM I	" "	1.027	4.4	52.0
8	INFLAM I	" "	1.027	4.1	28.0
9	INFLAM II	" "	1.021	2.6	47.0
10	INFLAM II	" "	1.032	5.8	31.0
11	INFLAM I	" "	1.031	4.9	36.0
12	INFLAM I	" "	1.032	5.0	61.0
13	INFLAM II	" "	1.027	4.1	31.0

S/D SIN DESARROLLO BACTERIANO

**CASO XII**  
**ESTUDIO QUIMICO DEL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON OSTEOARTRITIS**

No. L.S.	TIPO INFLAM.	NIQDO. CML.	HEMOCITO	PROT. TOTAL g/dl	GLUCOSA mg/%
1	NO INFLAM	S/D	1.011	1.5	48.0
2	NO INFLAM	" "	1.017	2.0	44.0
3	NO INFLAM	" "	1.020	2.4	---
4	INFLAM I	" "	1.018	1.6	---
5	NO INFLAM	" "	1.021	2.5	---
6	NO INFLAM	" "	1.020	2.4	---

S/D SIN DESARROLLO BACTERIANO

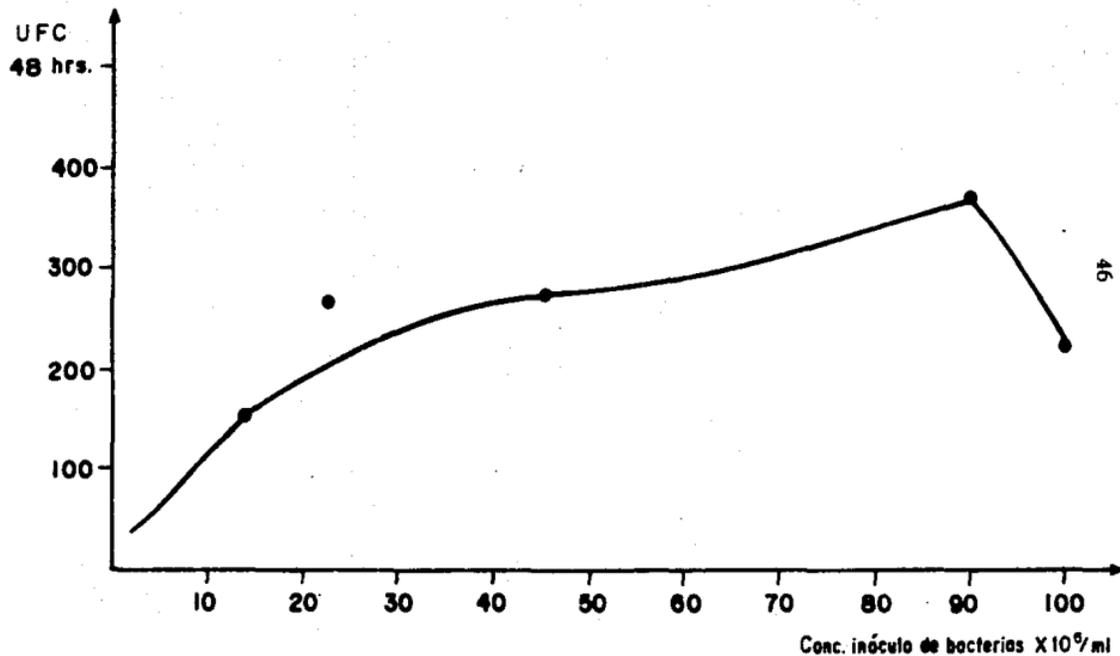
LS LIQUIDO SINOVIAL

**CUADRO XIII**  
**CONCENTRACION OPTIMA DE INOCULO DE *Salmonella enteritidis* B**  
**EN LIQUIDO SEMIVAL.**

CNC. INOCULO BACT. X 10 <sup>8</sup> /ml.	GR. RES. CROCINIBRO e UFC
0.25	38
0.5	38
1.0	38
2.0	38
14.	150
22.5	262
45	275
90	375
104	225

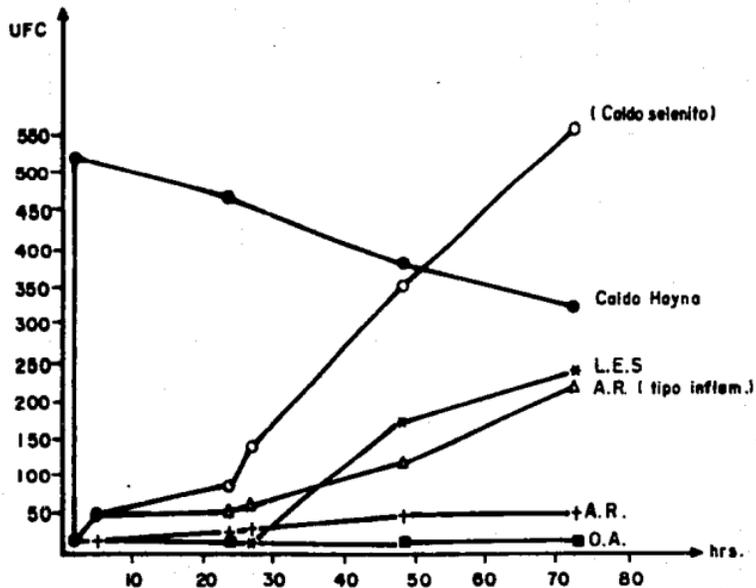
Gráfico No. I

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE INOCULO DE Salmonella enteritidis B EN LIQUIDO SINOVIAL**



Gráfica II

**CURVA DE CRECIMIENTO DE *Salmonella enteritidis* B EN  
LIQUIDO SINOVIAL, CALDO SELENITO Y CALDO  
HAYNA DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO**



#### 4.2. DISCUSION

Es claro que el liquido sinovial de pacientes con LES favorece en mayor proporción que los controles utilizados, el crecimiento de Salmonella enteritidis B.

Los resultados de éste trabajo enfocados al análisis del liquido sinovial como medio de cultivo, demostraron que los factores químicos, si favorecen el crecimiento de la bacteria. Los cuales pueden ser demostrados al encontrar diferencias significativas entre el control negativo y los otros líquidos sinoviales (cuadros XIV Y XV).

De estas observaciones, se puede concluir que los líquidos sinoviales estudiados de tipo inflamatorio y no inflamatorio, favorecieron el crecimiento, dentro de los factores locales químicos e inmunológicos, los que probablemente favorecen el desarrollo de la bacteria son: pH, HCO<sub>3</sub>, proteínas totales, glucosa e inmunoglobulinas.

El pH alcalino y el exceso de base (BEB) detectados en los líquidos sinoviales de pacientes con AR y LES, favorecen la anagrobiosis. El soporte nutritivo como la fuente de carbono y derivados nitrogenados se aporta por las proteínas totales y las inmunoglobulinas.

De acuerdo a los resultados, los factores locales que más influyen en el crecimiento de Salmonella enteritidis B son: pH alcalino y el incremento de CO<sub>2</sub> total, ya que es una bacteria -

CUADRO XIV  
ANÁLISIS DE FACTORES LOCALES EN EL LIQUIDO SINOVIAL EN PACIENTES CON L E S

GRUPO	UNIDAD DE C.C.	PROT. TOT.	COLEST.	PH	PCO <sub>2</sub>	PO <sub>2</sub> VS <sup>2</sup> CC	HEM	HCO <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub> T	GLUCOSA
$\bar{X}$	1.018	2.13	55.5	7.4	27.4	85.7	5.4	16.5	17.3	46.6
+ LES	+ 0.0062	+ 18.4	+ 77.8	+ 0.26	+ 16.6	+ 37.9	+ 4.5	+ 4.5	+ 4.9	+ 44.2
- LES	- P.N.S.	- P.N.S.	- P.N.S.	- P.C.01	- P.C.02	- P.C.01	- P.C.02	- P.C.01	- P.C.01	- P.C.02
$\bar{X}$	1.029	445	73.7	7.4	26.05	91.2	18.4	18.4	17.3	37.9
+ AR	+ 0.0051	+ 1.06	+ 35.1	+ 35.1	+ 19.4	+ 43.9	+ 9.6	+ 10.5	+ 4.9	+ 19.04
- AR	- P.N.S.	- P.C.001	- P.C.01	- P.C.01	- P.C.01	- P.C.01	- P.C.05	- P.C.01	- P.C.01	- P.C.01
$\bar{X}$	1.0175	211	24	7.2	31.9	69.6	4.9	18.5	19.5	49
+ OA	+ 0.0036	+ 0.44	+ 21.1	+ 0.15	+ 11.4	+ 24.4	+ 5.6	+ 6.3	+ 6.7	+ 6.6
- OA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

P.N.S. NO SIGNIFICATIVO

LES VS OA

AR VS OA

CUADRO XV  
ANÁLISIS DE FACTORES LOCALES EN EL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON  
LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

	IgG	IgA	IgM	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>1q</sub>	C.C.
$\bar{X}$	561.8	186.3	61.6	16.3	11.4	104	1.6
+ LES	+ 369.1	+ 140.3	+ 55.6	+ 12.5	+ 12.0	+ 12.8	+ 1.46
- LES	- P.C.05	- P.N.S.	- P.C.001	- P.C.05	- P.N.S.	- P.N.S.	- P.C.01
$\bar{X}$	1486	274.1	217.7	34.5	13.7	22.4	1.3
+ AR	+ 885	+ 149.3	+ 100.9	+ 21.6	+ 10.5	+ 39.3	+ 0.8
- AR	- P.C.01	- P.C.01	- P.C.01	- P.C.01	- P.C.02	- P.N.S.	- P.C.05
$\bar{X}$	417.8	80.2	40.4	18.8	7.7	0.40	0.02
+ OA	+ 175.1	+ 53.3	+ 19.4	+ 7.04	+ 1.7	+ 0.27	+ 0.036
- OA	-	-	-	-	-	-	-

LES VS OA

AR VS OA

anaerobia facultativa. La anaerobiosis en el líquido sinovial es tá favorecida por la actividad fagocítica aumentada y presencia de complejos insunes circulantes que la estimulan estas observaciones se ven reforzadas por estudios experimentales que se ligvaron a cabo y que muestran que al aumentar la concentración de CO<sub>2</sub> en las estufas de cultivo, aumentaba tanto la velocidad de crecimiento (k), como la tasa de crecimiento de la bacteria en el líquido sinovial.

El hecho de que aún existiendo un proceso inflamatorio en los pacientes con LES Y AR que se utilizaron en el presente estudio y que no habían desarrollado artritis séptica por Salmonella enteritidis B, nos permite proponer que no sólo las alteraciones metabólicas por sí mismas favorecen el desarrollo de la bacteria, sino que además se requieren de otras alteraciones sistémicas y terapéuticas para ésta complicación se observe.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- 1.- El liquido sinovial de pacientes con LES y AR, tienen factores locales que favorecen el desarrollo de Salmonella enteritidis B.
- 2.- En el liquido sinovial de pacientes con LES inoculados se encontró un incremento en el desarrollo de Salmonella enteritidis B. y comparado con el grupo control negativo (OA), fue significativo ( $p > 0.001$ ).
- 3.- Los factores locales que favorecen el desarrollo de Salmonella enteritidis B. en pacientes con LES y AR son: pH alcalino, proteínas totales, inmunoglobulinas, glucosa, HCO<sub>3</sub> y CO<sub>2</sub> total.
- 4.- Debido a la especificidad de los nutrientes del caldo selenito comparado con el liquido sinovial, muestra un mayor crecimiento de la bacteria en el primero.
- 5.- Los factores locales químicos e inmunológicos que favorecen el crecimiento de la bacteria antes mencionados, se incrementan por el proceso inflamatorio.
- 6.- No existen diferencias en el crecimiento de Salmonella enteritidis B. en el liquido sinovial de pacientes con LES y AR, cuando estos líquidos son de tipo inflamatorio I Y II.

7.- La anaerobiosis se favorece por el proceso autoinmune y la cavidad sinovial adquiere un pH alcalino.

63

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abramson Steven, Sara B. Kramer, Allen Radin and Robert Holzman. Salmonella Bacteremia in Systemic Lupus Erythematosus. Arthrit and Rheumatism vol.28, No. 1:30-34 January, 1985.
- 2.- Argil N.J., C.N. Creado y E.E. Maristany. Importancia del liquido Sinovial en el estudio de las Artropatías. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. vol. XI No. 2, 151-172.1977
- 3.- Balcells Gorina A. La Clínica y el Laboratorio. 2a.Ed. Marin, S.A. México, 1978.
- 4.- Barnett V. Eugene, M.D., John Bienestock M.D., and Kurt J. Bloch. Antinuclear Factors in Synovia JAMA Vol. 198. No. 2 15-19. octubre, 1966.
- 5.- Bellanti J.A. Inmunología Ed. Interamericana, S.A. 3a. - Edición. México, D.F. 1986.
- 6.- Bjelle Anders, Toruld Anderson and Kristi Granath. Molecular Weight distribution of hyaluronic acid of human synovial fluid in Rheumatoid diseases. Scand J. Rheumatology. 12.:133-138 1982.
- 7.- Breedveld C. Ferdinand, Geertruida J.M. Laveber Maria T., Van Den Barselaar, Jaap T., Van Dissel And eter C.J. Leijh. Phagocytosis intracellular killing of Staphylococcus aureus by PMN cell from synovial fluid of patients with Rheumatoid Arthritis Arthritis and Rheumatism Vol. 29.No. 2. :55-61. February, 1986.
- 8.- Calero J. del Rey. Microbiología e Inmunología de las Enfermedades infecciosas Ed. Harban, S.A. 1a. edición Madrid, 1976.
- 9.- Candlish J.K., Koy E.S.C. Pick and Mix. Discretionary testing into the 80's Ed. National University Hospital 2a. Edición Singapore. 0511. 1987.
- 10.- Chubick A. Sontheimer R.D., Gillan J.N., Ziff M. An appraisal test for native DNA antibodies in connective tissue diseases. Ann Intern Med 89:186-192. 1987.
- 11.- Cohen J.L., Bartlett J.A., Corey G.R. Extra intestinal manifestations of Salmonella infections Medicine. 66:348-88. 1987.
- 12.- Conn y Stumpf. Bioquímica Fundamental Ed. LIMUSA 3a. Edic. México, 1976.

- 13.- Davis B.D., Dulbecca R., H.N. Ginsberg, W.B. Wood. Tratado de Microbiología. Ed. Salvat, S.A 1a. edición España, 1972.
- 14.- Edwards J. Ewing. Identification of Enterobacteriaceae Ed. Elsevier. New York 2a. edición 1988.
- 15.- Eisenberg A. Robert M.D., Philip L. Cohe M.D.. The role of immunologic mechanisms in the pathogenesis of Rheumatic Diseases. Primer of Rheumatic Diseases 36-45. vol. 2 1988.
- 16.- Fraga Antonio, Lavalle M. Carlos. Salmonella Arthritis Infections in the Rheumatic diseases Grune and Stratton 27-30 vol. 2 1988.
- 17.- Fraga A., Loyo E., Sada E., Mintz G.. Artritis séptica aguda Cirugía y Cirujanos 52:(5);313-314 1984.
- 18.- Frank C., Arnett, E. Daniel A. Bloch D. The American Rheumatism Association. 198.7 classification revise criteria for of -- Rheumatoid Arthritis. Arthritis and Rheum 313; 515-524. 1988.
- 19.- Gradwohl. Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico Ed. Panamericana, S.A. 8a. edición México, D.F. 1983.
- 20.- Hardin John A. The Lupus Autoantigens and the pathogenesis of Sistemic Lupus Eritematous Arthritis and Rheumatism vol 29 No. 4:200-215. April, 1986.
- 21.- Henry J.R., D.C. Cannon. Química Clínica Ed. JIMS 2a. edición España 1980.
- 22.- Héctor Preciado M. y Col. Hospital Infantil de México Enfermedades dearréicas en el niño 4a. edición México, 1977
- 23.- Hugh H. Fudenberg. Inmunología Básica y Clínica. Ed. El Manual Moderno, S.A. 5a. edición. México, 1985.
- 24.- Huldah Bancroft. Introducción a la Bioestadística ed. Universitaria de Buenos Aires 9a. edición Buenos Aires, 1976.
- 25.- Instituto Mexicano del Seguro Social. Manual de Procedimientos del Laboratorio Clínico México, 1978.
- 26.- Jasin E. Hugo, J. Humberto Orozco and Morris Ziff. Serum Heat - Labile opzonis The Journal of Clínica Investigation vol. 53:120-124. February, 1974.
- 27.- Jawetz Ernest. Manual de Microbiología Médica Ed. El Manual Moderno, S.A. 4a. edición México, 1970.

- 28.- Jeffery B.M.X. Sc. PHD;W. Carson Dick, M.D., FRCP. The role of the laboratory in Rheumatology. Vol. 9 No.1 15-18. april. 1983.
- 29.- Krieg R. Noel, Holt G. John. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology vol. 1 78-92 ed. William and Wilkins Baltimore/Londo 1984.
- 30.- Lavalle C., Alcocer J., Garduño J., Fraga A. Factores séricos inhibidores de la inmunidad celular en Lupus Eritematoso Sistémico Arch. Invest. Med. XLIII (1-2): 16-20 1978.
- 31.- Lavalle C., Oscar Rojas E., Leticia Nava Ch., Rosalba Mendoza G. Función endocítica intrínseca de los leucocitos PMN en el Lupus Eritematoso Sistémico. Arch. Invest. Med. México. 15:35 april, 1984.
- 32.- Lin T.M. Lialbert S.P. Cort.R. Blaschke M.J. An enzyme-linked immunoassay for circulating immune complexes using solid phased goat Cl. J. Immunol. Methods. 63:187-205. 1983.
- 33.- Manicourt H. Daniel and Serge Orloff. Immune complexes in polyarthritis after Salmonella Gastroenteritis. The Journal of Rheumatology 8:4-7 1981.
- 34.- Manual de Procedimiento para Antinucleares por HE,-2 Immunomex. S.A de C.V. abril, 1984.
- 35.- Manual de Procedimiento para reactivo-latex-factor Reumatoide. Determinación de Factores Rumatoides Química Hoechst de México, S.A. de C.V. México, D.F. 1986.
- 36.- Mc Carty Daniel J. Arthritis and Rheumatism Vol. 288 9a. edición 1979.
- 37.- Medina F., Fraga A., Lavalle C. Septic Arthritis in Systemic Lupus Erytematosus, the importance on chronic carrier State Arthritis and Rheumatism. (in press). México, D.F. 1989.
- 38.- Moellering C. Roberto Jr. M.D. Infectious Disease Clinics of North América ed. W.B. Saunders Company vol. 2 125-230. septiembre 1988.
- 39.- Norville M. Dowinie. Métodos Estadísticos Aplicados ed. Haria S.A. 5a. edición México, 1986.
- 40.- Palmer Donald. Septic Arthritis in sickle cell thalasemia Journal of medicine (Vol 3) 220-224 1987.
- 41.- Philips R. Lomnitzar, R. Wade A., Rabson A. Defective monocyte funtion in patients with Systemic Lupus Erythematosus Clin. Immun. Immunopathol 34:69-76.1985.

- 42.- Platt N. Philip. Examination of synovial fluid Clinics in Rheumatic Diseases. Vol. 9 No. 1 78-82. April 1983.
- 43.- Ritzmann E. Stephan, Jerry C. Daniels. Immune complexes: characteristics, clinical correlations and interpretive. Approach in the clinical laboratory. Clinical chemistry vol. 28, No., 6 66-70.
- 44.- Rodnan P. Gerarid, M.D. y H. Ralph Schumacher. Compendio de Enfermedades Reumáticas 8a. edición ed. Limusa México, D.F., 1985.
- 45.- Rojas M. William. Inmunología ed. Fondo Educativo Interamericano. 6a. edición México, D.F. 1985.
- 46.- Rose-Friedman. El Laboratorio en Inmunología Clínica ed. Médica Panamericana, S.A. 2a. edición Buenos Aires Argentina, 1984.
- 47.- Rudd y Shaun, Daouglas T. Fearunandk, Frank Austen. Depressed synovial fluid levels of properdin and properdin factor B in patients with Rheumatoid Arthritis Arthritis and Rheumatism vol. 18, No. 4 80-83 july-august, 1975.
- 48.- Sada E. Sánchez, G. Ruiz G. Arthritis séptica por Salmonella como causa frecuente en enfermos inmunocomprometidos en zonas endémicas Rev. Invest. Clin. 35(15):105-110. 1983.
- 49.- Southorn A. Peter M.B.B.S., Gath Powis. Free Radicals in Medicine II Involvement in human disease Mayo Clin Proc. vol. 63. 57 April, 1988.
- 50.- Trinder P. Ann Clin. Biochem 6:24-28 1969. jun.
- 51.- Tood-Sanford. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio 6a. Edición ed. Salvat, S.A. España 1983.
- 52.- Wallace J. Daniel. Seminars in Arthritis and Rheumatism the role of stress and trauma in Rheumatoid Arthritis and Systemic Erythematosis. vol. 16 No. 3 153-157 april 1988.
- 53.- Warren C.P.W. Arthritis associated with Salmonella infections Annals of the Rheumatic Diseases. vol. 4 No.2 120-124 march, 1988.
- 54.- Wayne W. Daniel. Biostatística ed. Limusa 4a. edición México, 1983.
- 55.- Winchester J. Robert M.D. The role of immunologic mechanisms in the pathogenesis of Rheumatic diseases. Journal of Rheumatology vol. 2 No. 3 50-55 February, 1988.