

38  
2-aj.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

KLEBSIELLA PNEUMONIAE EN LA ETIOLOGIA  
DE LA ESPONDILITIS ANQUILOSANTE

FALLA DE ORIGEN

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 :  
VICTOR MANUEL PARRA CAMPOS

Directores de Tesis:  
Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez  
Dra. Ethel García Latorre



CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1989



## **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

PAGINA

R E S U M E N .	1
I N T R O D U C C I O N . . . . .	1
CAPITULO I: ESPONDILITIS ANQUILOSANTE . . . . .	4
CAPITULO II: PREDISPOSICION GENETICA DE ESPONDILITIS ANQUILOSANTE Y SU ASOCIACION CON HLA-B27. .	12
CAPITULO III: <u>Klebsiella</u> Y ESPONDILITIS ANQUILOSANTE . . .	15
O B J E T I V O S . . . . .	22
M A T E R I A L E S     Y     M E T O D O S .	24
R E S U L T A D O S . . . . .	36
D I S C U S I O N . . . . .	53
C O N C L U S I O N E S . . . . .	59
B I B L I O G R A F I A . . . . .	61

## R E S U M E N

La espondilitis anquilosante (EA) es una enfermedad inflamatoria crónica, que afecta fundamentalmente la región sacrolumbar causando desde fibrosis hasta anquilosis de las vértebras. La etiología de la EA es desconocida, pero se ha demostrado muy claramente que existe una fuerte asociación entre la enfermedad y la presencia del marcador genético HLA-B27. Sin embargo, ésta asociación no explica la existencia de pacientes con EA y que no son B27 y que no todos los B27 padecen EA. Debido a ésto se ha sugerido que existen factores ambientales que pudieran, junto con el marcador genético, ser responsables de la etiología de la enfermedad. Entre estos factores se han mencionado a infecciones entéricas por bacterias Gram negativas, principalmente las de los géneros Klebsiella, Yersinia y Shigella. Recientemente se ha mencionado que existe mimetismo molecular entre la nitrogenasa de K.pneumoniae y la molécula B27. Con base en lo anterior se trató de identificar si existen anticuerpos en pacientes con EA y enfermedad espondilítica, dirigidos contra proteínas de la bacteria que no fueran reconocidos por los sujetos testigo. Se trabajó una cepa aislada de un caso de septicemia que mostró actividad de nitrogenasa sólo cuando se cultivó en un medio libre de nitrógeno (ES), también se cultivó en medio con sales de nitrógeno (EI). Se analizaron 10 sueros EA, 9 con enfermedad espondilítica (EE) y 18

sujetos aparentemente sanos (familiares de los pacientes). El análisis se hizo mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia utilizando como antígeno extractos totales de la bacteria crecida en ambos medios, así como sus sobrenadantes. Los sueros se clasificaron de acuerdo a su HLA. B27+: 9 EA, 6 EE y 8 sanos. B27-: 1EA, 3EE y 10 sanos. No existen diferencias en el reconocimiento de alguna proteína para la bacteria crecida en ES ni en los sobrenadantes, pero en la cepa crecida en EN hay una banda de 50-55 kDa que algunos sueros reconocen fuertemente. Tampoco hay diferencia significativa en el reconocimiento de ésta proteína entre enfermos y sanos, sin embargo analizando los grupos como B27+ y B27- sin considerar enfermedad, existe una diferencia estadísticamente significativa. Esto es importante porque las muestras analizadas son de pacientes y sus familiares de los cuales muchos, aparentemente sanos, son B27+. Los resultados muestran que sólo el 14% (2/14) B27- reconocen fuertemente a esa proteína, mientras que los B27+ lo hacen en un 52% (12/23). Lo interesante es que ésta proteína es una de las que elevan su concentración al crecer la bacteria en medio ES, además los monómeros del Componente I de la enzima nitrogenasa pesan entre 50 y 60 kDa. Aunque no se puede concluir que ésta proteína sea de la nitrogenasa, sí podemos afirmar que existe una diferencia en el reconocimiento de la proteína de 50-55 kDa entre individuos HLA-B27+ y HLA-B27-.

## I N T R O D U C C I O N

La espondilitis anquilosante (EA), es una enfermedad inflamatoria crónica, de etiología desconocida, que afecta principalmente articulaciones axiales y periféricas, origina osteítis e invade cartilagos causando metaplasia y osificación. Su presencia se encuentra fuertemente asociada con la molécula HLA-B27 de las membranas celulares (1-4).

Se reconoce que la EA es una identidad que se expresa clínicamente en varias formas dependiendo de ciertos factores entre los que se encuentran el grupo étnico, el sexo, la edad de inicio, la presencia o no del HLA-B27 y su asociación o no con alguna otra identidad, particularmente aquellas que forman el grupo de las espondilartropatías seronegativas (1,4).

La expresión clínica difiere también entre grupos étnicos y razas. Algunas observaciones sugieren que la población mestiza mexicana con EA posee ciertas particularidades entre las que se encuentran un alto porcentaje de enfermos menores de 16 años al inicio de la sintomatología y una frecuencia notable de afectación de articulaciones periféricas que la hacen diferente de la que se observa en otros grupos raciales (5,6).

En los últimos años se ha logrado clasificar a diversas enfermedades consideradas como "variantes de la artritis reumatoide", a las que se les conoce en la actualidad como espondiloartropatías, cuyas características generales incluyen:

- Sacroilíitis con o sin espondilitis
- Inflamación articular periférica
- Sin asociación con la presencia en suero de factor reumatoide o anticuerpos antinucleares
- Tendencia a la agregación familiar
- Ausencia de nódulos reumatóides
- Tendencia a inflamación ocular (iritis aguda o conjuntivitis)
- A veces aortitis y anomalías en la conducción cardíaca

De las características anteriores destaca, por su importancia, la ausencia del factor reumatoide, razón para que a este grupo de enfermedades se les denomine como "espondiloartropatías seronegativas" (1,2,4).

Las espondiloartropatías seronegativas más importantes aparecen en el orden siguiente:

- Espondilitis anquilosante
- Artropatía psoriásica
- Síndrome de Reiter (Artritis reactiva)
- Artropatía juvenil crónica
- Colitis ulcerativa crónica

- Enfermedad de Whipple
- Enfermedad de Crohn
- Uveitis anterior aguda
- Enfermedad de Behcet

De las anteriores destaca, por su importancia clínica, la espondilitis anquilosante.



## C A P I T U L O I

### ESPONDILITIS ANQUILOSANTE

El término espondilitis anquilosante deriva del griego spondylos que significa vértebra y ankylos cuyo significado es soldar o fundir, es decir vértebras soldadas, fundidas o fusionadas. La fibrosis, así como la anquilosis, son el resultado o consecuencia del proceso inflamatorio crónico, aunque la anquilosis de la columna aparece sólo en estadios muy avanzados de la enfermedad.

La enfermedad, desde el origen de su descripción, muestra una serie de sinónimos como los siguientes (2,4):

- Espondilitis deformante
- Espondilitis anquilopoyética
- Espondilitis atrófica ligamentosa
- Espondiloartritis anquilopoyética
- Pelviespondilitis osificante
- Enfermedad de Von Bechterew
- Enfermedad de Marie-Strumpell
- Espondilitis rizomélica
- Espondilitis adolescente
- Espondilitis reumatóide

## BREVE HISTORIA

Existen descripciones de la espondilitis anquilosante (EA) en momias y tumbas egipcias que se remontan hasta 2,900 años antes de nuestra era, las cuales tienen las vértebras fusionadas desde la columna cervical hasta el cóccix.

La comunicación original considerada como el primer reporte, fué hecha en el año de 1695 por Bernard Connor, quien describió parte de un esqueleto con fusión completa de los cuerpos vertebrales, costillas, ilion y sacro formando una sola pieza.

En el siglo XIX, Bechterew hizo una serie de publicaciones con la descripción de la enfermedad a la que determinó "inflamación anquilosante de la columna y las grandes articulaciones de los miembros inferiores". En este siglo en la década de los años 50, se enfatiza acerca de la tendencia a la agregación familiar de la enfermedad y de ahí se empieza a creer en la susceptibilidad heredada. Esta sospecha fué confirmada en 1973 por Schlostein (7), ya con el descubrimiento de la asociación entre EA y el antígeno de histocompatibilidad HLA-B27 (4).

## DIAGNOSTICO

Los criterios más importantes para el diagnóstico de la EA son los aprobados en Nueva York en 1966, en los cuales se establece que se puede hacer un diagnóstico definitivo si hay sacroilítis

bilateral acompañada de al menos uno de los 3 criterios, o si la sacroilítis es unilateral con el primer criterio y cualquiera de los otros dos (2-4). Los criterios son:

- 1.- Limitación en la movilidad de la columna lumbar en los 3 planos: flexión anterior, flexión lateral y extensión.
- 2.- Historia o presencia de dolor en la unión dorsolumbar o en la columna lumbar.
- 3.- Limitación en la expansión torácica de 2.5 cm o menos, medida a la altura del cuarto espacio intercostal.

Con el hallazgo de que el HLA-B27 tiene una asociación con la EA de entre 60-80% en población mexicana (5,8), puede considerarse, más que un criterio para el diagnóstico, como una prueba indicativa del grado de susceptibilidad, principalmente en los casos de sacroilítis asintomática.

Sin embargo el método más útil y barato para el diagnóstico sigue siendo la radiografía de la pelvis; ocasionalmente se pueden observar pacientes con sacroilítis en ausencia de dolor, los cuales frente a algún factor precipitante desarrollan la enfermedad.

#### P A T O L O G I A

Las alteraciones patológicas ocurren en las articulaciones diartrodiales con sinovitis crónica. Hay hiperplasia del tejido sinovial

con proliferación de sinoviocitos, infiltración de linfocitos, células plasmáticas e histiocitos. Estas alteraciones son muy características de la artritis reumatoide, por lo que a la EA se le consideró por mucho tiempo una variante de ésta. Sin embargo, la diferencia es que en la EA existe una tendencia a la afectación de articulaciones fibrocartilaginosas como los discos intervertebrales, la articulación del manubrio esternal, la sínfisis del pubis y los ligamentos intervertebrales.

Las articulaciones sacroilíacas están involucradas en el 100% de los pacientes, en donde existe desde destrucción del cartilago, erosión y esclerosis del hueso yuxta-articular hasta fibrosis y finalmente anquilosis ósea (2,4).

Existen también lesiones inflamatorias focales de la cápsula articular y en los sitios de inserción de los ligamentos (entésis). Estas lesiones inicialmente inflamatorias o entesopáticas evolucionan a fibrosis reactiva y posteriormente son reemplazadas por hueso (espolones calcáneos y sindesmoftos).

Además de las lesiones en las articulaciones e inserciones tendinosas, la enfermedad puede afectar el corazón, el tracto uveal (uveítis), el lóbulo superior de los pulmones, la aorta con destrucción de la capa media a nivel del anillo, porción superior y origen de las arterias carótidas. Ocasionalmente la aorta descendente abdominal también está involucrada. La aortitis evoluciona a engrosamiento

de la capa íntima y obliteración de las arterias de mediano calibre debido a un aumento en el músculo liso. La afección de la aorta lleva a la insuficiencia aórtica en las etapas avanzadas y a la calcificación de sus paredes (4).

#### CUADRO CLINICO

La EA en general debe sospecharse en cualquier paciente, principalmente joven, con dolor por debajo de la espalda en quien se ha descartado patología más frecuente o común como la lumbagia de tipo postural o mecánica, hernia de disco intervertebral, la osteoartritis o las malformaciones congénitas (3,4).

Los síntomas con frecuencia se exacerban en la mañana al levantarse o después de periodos prolongados de inactividad y tiende a mejorar al cambiar de posición o con el ejercicio.

El grado de severidad de las manifestaciones iniciales puede variar desde una pequeña molestia de pocos minutos de duración por las mañanas hasta un espasmo muscular lumbar severo con incapacidad para la movilización inmediata al levantarse.

A medida que la enfermedad progresa, ocurre fusión entre los cuerpos vertebrales. El dolor de la región sacroilíaca suele ser insidioso, difícil de localizar pero referido a la zona glútea y a veces en la cresta ilíaca cercana a la región del gran trocánter y al dorso del muslo. El dolor puede exacerbar al toser o estornudar.

La rigidez matinal de la columna o "sensación de cansancio", puede durar hasta dos horas y desaparecer con una ducha de agua caliente, ejercicio o marcha.

Las articulaciones periféricas más afectadas son los hombros y las caderas hasta en un 35% durante el curso de la enfermedad y también puede ser síntoma inicial en algunos pacientes. La afección de las coxofemorales es generalmente bilateral e insidiosa al inicio, pero potencialmente incapacitante más que cualquier otra articulación ya que pueden llegar a la fusión completa originando, en estadios avanzados, la imposibilidad para la flexión de rodillas dando lugar a la marcha característica con la cabeza flexionada hacia adelante en posición rígida.

La participación de articulaciones periféricas sin considerar los hombros ni las caderas es del 15 al 25% y puede también, en forma unilateral, ser la manifestación inicial especialmente la rodilla y el tobillo con formación importante del líquido intrarticular. La articulación temporomaxilar se puede afectar en el 10% de los pacientes con gran dolor al masticar (4).

La afección exoesquelética más común en pacientes con EA es la uveítis llamada también iridociclitis aguda y ocurre en el 25% de los pacientes en algún momento del curso de la enfermedad (3,9). La inflamación es de tipo no granulomatoso, de inicio agudo y generalmente unilateral. Los síntomas incluyen dolor, lagrimeo

y fotofobia. A veces preceden a las manifestaciones esqueléticas.

Las alteraciones en la conducción cardíaca pueden afectar a cerca del 3% de los pacientes con 15 años de evolución de la enfermedad y en el 8.5% después de los 30 años del padecimiento. A veces precoden a las manifestaciones esqueléticas.

La fibrosis pulmonar apical se presenta en pacientes con EA de larga evolución (promedio de 20 años). Generalmente es bilateral y aparece radiológicamente como lesiones lineares o en placas (11).

#### P R E V A L E N C I A

La enfermedad es más frecuente de lo que se piensa y muchos de los pacientes en principio considerados como lumbálgias mecánicas, son posteriormente diagnosticados como espondilíticos. Mientras que la prevalencia de EA en caucásicos se encuentra entre 0.5 y 2.3 por 1,000, en no caucásicos puede ir de 0.7 a 93 por 1,000. Esto va en relación con la frecuencia del antígeno HLA-B27 en las poblaciones. Así, en la población mexicana la frecuencia del antígeno es de 5.5% (muy alta) y el 68.62% de los pacientes son B27 (5,6,8).

La expresión clínica de la enfermedad difiere también entre grupos étnicos, razas y sexo. Por ejemplo algunas observaciones muestran que en la población mestiza mexicana, aproximadamente el 50% muestran la forma juvenil de la enfermedad y además en la gran mayoría de ellos la enfermedad se presenta antes de los 16 años (5,6). Por otro

lado, en algunos estudios se ha mostrado una relación mayor en hombres que en mujeres, de 9:1 aproximadamente (4).

La enfermedad naturalmente se desarrolla alrededor de los 20 años de edad. En algunos individuos, principalmente no B27, aparece EA en décadas tardías, por ejemplo en los casos de artritis psoriásica (12).

#### E T I O L O G I A

La etiología precisa de la enfermedad no se conoce aún, aunque ya está bien establecida la predisposición genética asociada al HLA-B27 (2,7,8). Se dice entonces que el antígeno B27 juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, actuando como receptor para algún microorganismo o por su capacidad antigénica ante algunos factores ambientales que favorecen una respuesta inmunológica anormal que da como resultado la enfermedad. Entre otros factores ambientales, se ha sospechado la infección por enterobacterias Gram-negativas.



## C A P I T U L O    I I

### P R E D I S P O S I C I O N    G E N E T I C A    D E E S P O N D I L I T I S    A N Q U I L O S A N T E    Y S U    A S O C I A C I O N    C O N    H L A - B 2 7

Cuando se descubrió la fuerte asociación entre EA y HLA-B27, se pensó que la etiopatogénesis de la enfermedad ya podía ser entendida. Sin embargo hay algunos aspectos que no pueden ser explicados por ésta simple asociación:

- a) No todos los individuos B27 desarrollan espondilitis
- b) La presencia de B27 en forma homocigota no es suficiente para causar la enfermedad
- c) No todos los enfermos con EA son B27, es decir que puede haber espondilitis sin ser B27

Por lo anterior se han postulado varias teorías para explicar su asociación:

- Teoría de los dos genes
- Teoría de un gen o de reacción cruzada

## TEORIA DE LOS DOS GENES

Esta teoría fué expuesta por Mc. Devitt en el año de 1974 (13), sugiere que hay 2 genes, localizados en el brazo corto del cromosoma 6 humano, el primero codifica para el antígeno HLA-B27 y el otro para la EA (gene AS). Se cree entonces que los individuos con los genes AS y B27 desarrollarán la enfermedad, mientras que los individuos B27 que no llevan el gene AS, no desarrollarán la enfermedad. Indica además que ambos genes se encuentran en desequilibrio de enlace. Una dificultad con ésta teoría es que no explica cómo es que el gene AS es el causante de la enfermedad.

## TEORIA DE UN GEN O DE REACCION CRUZADA

Los trabajos que apoyan esta teoría se basan principalmente en la idea de que la EA es producida o desencadenada por microorganismos los cuales semejan o muestran reacción cruzada con el antígeno HLA-B27 (14-16).

Los primeros estudios que apoyan ésta hipótesis fueron realizados con sueros de conejos inmunizados con linfocitos B27, los sueros así obtenidos mostraron la presencia de anticuerpos que reaccionaron, por inmunodifusión, hemaglutinación y radioinmunoanálisis con extractos obtenidos principalmente de bacterias Gram-negativas, entre las que se probaron y que dieron reacción se encuentran las de los géneros Klebsiella, Shigella y Yersinia (14).

El experimento también ha sido realizado a la inversa, inmunizando conejos con Klebsiella y probando la reactividad del antisuero contra linfocitos HLA-B27. Se detectó la presencia de anticuerpos citotóxicos contra éstos linfocitos, principalmente obtenidos de pacientes con EA, si se compara con los linfocitos B27 obtenidos de sujetos sanos (14,17).

## C A P I T U L O    I I I

### Klebsiella Y ESPONDILITIS ANQUILOSANTE

Klebsiella pneumoniae es el patógeno más importante del grupo Klebsiella. Es una bacteria Gram-Negativa, capsulada y por lo tanto produce grandes colonias mucoides. Se han identificado aproximadamente 5 antígenos somáticos (O) y 72 capsulares (K) de naturaleza polisacárida. Las infecciones intrahospitalarias representan uno de las principales afecciones por este microorganismo ya que representan aproximadamente las dos terceras partes de las infecciones. Se encuentra en vías respiratorias entre el 5 y 10% de los sujetos sanos y representa el segundo invasor de los pulmones de los pacientes con enfermedad crónica pulmonar. Causa aproximadamente el 34 de las neumonías bacterianas. Es el segundo patógeno más común en el tracto urinario. En realidad se puede decir que es un microorganismo comensal y sólo es patógeno oportunista en individuos inmunodeprimidos (18,19).

Los estudios que llevan a la relación entre Klebsiella y EA surgen como consecuencia de la relación que existe entre HLA-B27 y la enteritis causada por algunos microorganismos como Yersinia, Shigella y Salmonella para la aparición de artritis reactiva o síndrome de Reiter (20-22). Por otro lado se ha observado que hay un aumento

en la concentración de IgA circulante dirigida contra Klebsiella en los pacientes con EA. De ahí que se considere a la Klebsiella como uno de los factores ambientales que posiblemente estén involucrados en la etiología de la enfermedad (23-27).

En el año de 1976 en el Primer Congreso de HLA y Enfermedad, el grupo de Ebringer fué el primero en proponer una asociación entre Klebsiella y la EA. Posteriormente se identificó, por el mismo grupo, la presencia de Klebsiella en las heces fecales de pacientes con EA. La recuperación del microorganismo pudo hacerse principalmente durante las fases activas de la enfermedad y la aparición ocasional de Klebsiella pudo precedir a una recaída clínica (28). A pesar de estos resultados, otros investigadores no han podido encontrar correlación alguna entre la presencia del microorganismo y la actividad de la espondilitis (29,30).

Recientes estudios, por 2 grupos; un grupo en Inglaterra encabezado por Ebringer y otro en Australia encabezado por Geczy, sugieren un posible papel de Klebsiella en el desencadenamiento de la enfermedad, pero la interpretación del papel que juega el microorganismo en el enfermedad es diferente, de tal manera que surgen por cada grupo de trabajo una hipótesis:

-Hipótesis de tolerancia cruzada

-Hipótesis del receptor

## HIPOTESIS DE TOLERANCIA CRUZADA

Esta hipótesis propone la generación de una respuesta de anticuerpos contra antígenos de Klebsiella, la cual es cualitativa y cuantitativamente inadecuada para la eliminación del microorganismo. La persistencia de Klebsiella o infecciones recurrentes genera la producción continua de anticuerpos, los cuales reconocen por reacción cruzada el tejido del paciente, como consecuencia se dispara la cascada del complemento y por lo tanto existe un daño al tejido que es mediado por el complemento. Esta hipótesis postula que gran cantidad de anticuerpo es generado en el tejido linfoide que drena al intestino grueso, el cual está situado próximo a las articulaciones sacroilíacas y vértebras, las cuales por estar cerca de los ganglios linfoides sufren inflamación (9,14,15).

Por lo anterior se dice que hay reacción cruzada entre el B27 y los antígenos de Klebsiella, por lo tanto se habla de que existe un mimetismo molecular entre el microorganismo y el HLA-B27. Más aún, se ha identificado, por comparación de secuencia de aminoácidos entre la molécula B27 y algunas proteínas conocidas de la bacteria Klebsiella pneumoniae, que existe una similitud entre la cadena proteica del HLA-B27 (residuos de aminoácidos 72-77) y la enzima nitrogenasa (residuos de aminoácidos 188-193). Estas secuencias son hidrofílicas, lo que sugiere una localización de moléculas expuestas sobre la superficie celular (16,31).

## NITROGENASA DE Klebsiella pneumoniae

La reducción biológica del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4^+$ ) es catalizada por la enzima nitrogenasa, la cual está compuesta de un complejo de dos proteínas:

- Componente I (Proteína-MoFe o nitrogenasa)
- Componente II (Proteína-Fe o nitrógeno reductasa)

Componente I: Tiene un peso molecular de 200 a 250 kilodaltones y contiene 2 átomos de molibdeno (Mo), 28-34 átomos de hierro (Fe) y de 26 a 28 sulfuros ácido lábiles. En geles de poliacrilamida en condiciones reductoras se observa que está compuesto de dos subunidades ( $\alpha_2 \beta_2$ ), cada subunidad con un peso aproximado de 60 kilodaltones, el análisis de aminoácidos muestra gran similitud entre ellas. En Klebsiella pneumoniae dos genes codifican la estructura de este componente: Gene nifK y el Gene nifD.

Componente II: Tiene un peso molecular de 55 a 65 kilodaltones, está compuesto de dos copias de esta unidad. Tiene 4 átomos de hierro y 4 sulfuros ácido lábiles. En Klebsiella pneumoniae, el Gene nifH es el responsable de la síntesis de este componente.

La unión del sustrato y su reducción tiene lugar en el Componente I mientras que el Componente II es el responsable de codar los electrones necesarios para la reducción. La fijación de nitrógeno requiere energía en forma de ATP, el cual se une al Componente II

y baja el potencial redox. Se ha calculado que se requieren entre 21 y 25 ATPs por cada nitrógeno fijado.

Ambos componentes de la nitrogenasa son rápida e irreversiblemente inactivados por la exposición al oxígeno, es así que Klebsiella pneumoniae no es capaz de fijar nitrógeno en condiciones aeróbicas (32-34).

#### HIPOTESIS DEL RECEPTOR

Esta hipótesis surge a raíz de la aparente reactividad cruzada entre B27 y Klebsiella pneumoniae. Es en 1979 cuando Szager y cols. (17) reportaron que un antisuero obtenido contra Klebsiella causó lisis de linfocitos de pacientes B27 positivos pero no la hubo en células de pacientes espondilíticos B27 negativos ni en aquellos testigos sanos B27 positivos y negativos. Este grupo propone que hay un marcador de superficie o receptor para la espondilitis, ya sea que se trate del propio B27 o que se encuentra asociado con él. Con ésta base Arnason y Thorsteinsson (35) intrínsecamente postulan que el determinante de reacción cruzada en la célula pudiera ser parte de la molécula B27 modificada por la adición de algún componente bacteriano y que éste pudiera permitir la iniciación de una reacción inmune restringida genéticamente, la cual pudiera dañar el tejido del paciente.

Estas observaciones fueron muy apoyadas por el grupo de



Australia, los cuales pudieron demostrar que fué posible modificar la apariencia genética de células B27 positivas de un individuo no espondilítico por incubación con el sobrenadante del cultivo de Klebsiella. Después de dicha incubación las células tuvieron un comportamiento parecido a la de los espondilíticos B27 positivos y fueron igualmente lisados por el suero antiKlebsiella. Por lo tanto se dice que el medio de cultivo contiene un factor(es) modificante y sólo aquellas células que portan el antígeno B27 pueden ser modificadas por ese factor, sugiriéndose por lo tanto que la molécula B27 por sí misma actúa como receptor de ese factor (36,37).

Posterioros estudios acerca de ese factor modificante producido por Klebsiella indican que se origina de la membrana externa de la bacteria y que tiene un peso molecular entre 26 y 30 Kilodaltones (38). Es termolábil a 56°C por 30 minutos, es sensible al tratamiento con neuraminidasa y es estable con tripsina y quimotripsina. La síntesis y expresión del factor modificante es un evento que ocurre sólo en el 3% de los aislamientos (37).

Las células de sujetos normales B27 positivos que son susceptibles a la lisis por suero anti-Klebsiella después de la exposición al factor modificante, rápidamente pierde su susceptibilidad a la lisis, sugiriendo que los sobrenadantes de cultivo contienen una molécula (o moléculas) la cual temporalmente se adhiere a la superficie, de la cual poco después se desprende. No existe un biotipo

de Klebsiella que produce este factor, aparentemente es un evento al azar (33). Sin embargo, se ha reportado que hay indicios de estar codificado en un plásmido, ya que reaviviendo de la Klebsiella productora del factor, el microorganismo es incapaz de sintetizarlo nuevamente, mientras que si el plásmido es transferido a Escherichia coli, éste elabora el factor modificador (30).

Por lo expuesto anteriormente en el presente trabajo se intentó demostrar ambas hipótesis, determinando el reconocimiento de antígenos de Klebsiella pneumoniae por parte de los pacientes con espondilitis anquilosante, tanto en la bacteria completa como en las proteínas de expresión.

## O B J E T I V O S

1.- Diseñar un medio de cultivo óptimo, libre de proteínas, para el crecimiento de Klebsiella pneumoniae aisladas de infecciones intrahospitalarias.

2.- Mediante la reducción de acetileno, determinar la capacidad de Klebsiella pneumoniae para fijar nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ).

3.- Estandarizar el patrón electroforético del extracto de proteínas totales de Klebsiella pneumoniae crecida en medio con nitrógeno y en medio sin nitrógeno.

4.- Determinar si existen auténticas proteínas de excreción al cultivar al microorganismo en las dos condiciones de cultivo.

5.- Mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia, determinar el reconocimiento de proteínas totales del extracto bacteriano, así como de los sobrenadantes de cultivo, tanto en sujetos testigo como en pacientes con espondilitis anquilosante.

6.- Determinar si existen, entre pacientes y testigos, diferencias en el reconocimiento de Klebsiella pneumoniae que pudieran ser indicativas de que el microorganismo es en realidad uno de los agentes involucrados en el desencadenamiento de la espondilitis anquilosante.

## MATERIALES Y METODOS

### A.- MATERIAL BIOLÓGICO

1.- Sueros humanos; distribuidos como sigue:

a).- 10 muestras de sueros correspondientes a pacientes con diagnóstico de espondilitis anquilosante y 9 sueros de pacientes con enfermedad espondilítica, confirmados por el Servicio de Reumatología del Hospital General de México, S.S.A.

b).- 18 muestras de sueros de sujetos aparentemente sanos, todos familiares de los pacientes.

2.- Se obtuvieron 31 aislamientos de Klebsiella pneumoniae de diversas fuentes infecciosas intrahospitalarias, todas ellas obtenidas del Hospital Infantil de México, S.S.A.

3.- Inmunoglobulina G (IgG) de cabra anti-inmunoglobulinas humanas totales (IgA, IgM e IgG), conjugada a peroxidasa (Cappel Cat. 3201, lote # 28940).

### B.- MATERIAL QUÍMICO Y EQUIPO

1.- Medios de cultivo.

a).- Medio E modificado con iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fuente de nitrógeno (EN):

MgSO <sub>4</sub>	0.2	g
Acido Cítrico	2.0	g
NH <sub>4</sub> NaHPO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3.5	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.0	g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1	g
Glucosa	20.0	g
Agua destilada hasta	1	litro

b).- Medio E modificado, sin fuentes de nitrógeno (ES).

MgSO <sub>4</sub>	0.2	g
Acido Cítrico	2.0	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.0	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2.31	g
NaNO <sub>3</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.02	g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1	g
Glucosa	20	g
Agua destilada hasta	1	litro

Los reactivos para ambos medios de cultivo de March, Naucalpan, Edo. de México.

## 2.- Determinación de nitrogenasa.

- Medio EN y ES, semisólido con agarosa al 0.8%
- Etileno (INPRA, Naucalpan, Edo. de México)
- Acetileno: Obtenido en el laboratorio por reacción entre carburo de calcio y agua.
- Cromatógrafo de gases PYE-UNICAMP, con columna de vidrio, empaque de Poropack 80-100 mesh, detector de hidrógeno-aire, ionización de flama y graficador.

3.- Reactivos y equipo para desarrollar la técnica de electroforesis en geles de poli(acrilamida) (PAGE). Todos los reactivos de Sigma Co. Sn. Louis Mo. USA., los solventes de Baker, S.A. Xalostoc,

Edo. de México. Preparados se filtran en papel Whatman # 1 y se guardan a 4°C.

- a).- Solución de monómeros acrilamida-bisacrilamida (30.8% T).

Acilamida	30.0 g
Bis-acrilamida	0.8 g
Agua bidestilada hasta	100 mL

- b).- Regulador del gel separador (Tris-HCl 1.5M, pH=8.8).

Trizma base	18.15 g
Agua bidestilada	90.0 mL

Se ajusta pH=8.8 con HCl 6N  
Se afora con agua bidestilada a 100 mL

- c).- Regulador del gel concentrador (Tris-HCl 0.5M pH=6.8).

Trizma base	3.0 g
Agua bidestilada	90.0 mL

Se ajusta el pH=6.8 con HCl 6N  
Se afora con agua bidestilada a 100 mL

- d).- Lauril sulfato de sodio (SDS) al 10%.

SDS	10.0 g
Agua bidestilada hasta	100 mL

- e).- Persulfato de amonio al 10%.

Persulfato de Amonio	20 mg
Agua bidestilada	200 $\mu$ L

- f).- TEMED (N',N',N',N'-tetrametiletilendiamina), Sigma,Co.

- g).- Regulador de corrimiento (Tris 0.025M-Glicina 0.192M-SDS al 0.1%, pH=8.3).

Trizma base	3.0 g
Glicina	14.4 g
SDS al 10%	10.0 mL

Agua bidestilada hasta 1 L  
(No se ajusta el pH)

h).- Regulador de muestra 2X

Tris 0.5M, pH=6.8	2.5	mL
SDS al 10%	4.0	mL
Agua bidestilada	0.5	mL
Glicerol	2.0	mL
2-mercaptoetanol	1.0	mL

Se agregan unos cristales de azul de bromofenol

i).- Solución madre azul Coomasie para tinción de geles

Azul Coomasie R250	2.0	g
Agua bidestilada	200.0	mL

j).- Colorante de trabajo para tinción de proteínas.

Sol.madre Azul Coomasie	62.5	mL
Metanol absoluto	250.0	mL
Ac. acético glacial	50.0	mL
Agua bidestilada	137.5	mL

k).- Decolorante para gel I.

Metanol absoluto	500.0	mL
Ac. acético glacial	100.0	mL
Agua bidestilada	400.0	mL

l).- Decolorante para gel II.

Ac. acético glacial	7.0	mL
Agua bidestilada	93.0	mL

m).- Equipo para desarrollar la técnica:

Equipo para electroforesis vertical Hoefer  
Scientific Instruments, Mod. SE 600  
Congelador a -20° C  
Refrigerador a 4° C  
Fuente de poder para electroforesis Hoefer  
Scientific Instruments, 500 v, 250 mA.



4.- Reactivos y equipo para desarrollar la técnica de transferencia. Todos los reactivos de Sigma, Co. y solventes de Baker, S.A.

a).- Regulador de transferencia

Trizma base	9.07 mL
Glicina	43.2 mL
Metanol absoluto	600.0 mL
Agua bidestilada	2,400.0 mL

b).- Tinción de proteínas transferidas

Tinta china (Pelikan)	20.0 $\mu$ L
PBS 0.1M, Tween 20 al 0.3%, pH=7.2	10.0 mL

c).- Equipo para desarrollar la técnica

Cámara de electrotransferencia, Hoefer, Sci. Inst., Mod. TE 42  
Fuente de poder, Hoefer Sci. Inst. Mod. TE51  
0-100 VDC, 0-2 A.  
Papel de nitrocelulosa de 0.45 micras de poro, marca Sartorius (Cat. 9-64-955, Lot.2211360740-1)

5.- Reactivos y equipo para desarrollar la técnica de inmunodetección. Todos los reactivos de Sigma, Co. y solventes de Baker, S.A.

a).- Regulador salina-fosfatos (PBS) 10X, 0.1M, pH=7.2

NaCl	30.0 g
$KH_2PO_4$	2.0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	29.0 g
KCl	2.0 g
Agua bidestilada	900.0 mL
ajustar a pH=7.4	
aforar con agua a	1,000.0 mL

b).- Regulador de bloqueo

Gelatina	6.25	g
Disolver en 200 mL de agua bidestilada caliente		
EDTA disódico	4.54	g
PBS 10X	250.0	mL
Tween 20	2.5	mL
Agua bidestilada	1.5	L
Ajustar el pH=7.3		
Aforar con agua a	2.5	L

c).- Los sueros por analizar, así como el conjugado anti-inmunoglobulinas humanas, diluidos en regulador de bloqueo

d).- Regulador de lavado PBS-Tween 20 al 0.1%

PBS 10X	100.0	mL
Tween 20	1.0	mL
Agua bidestilada	900.0	mL

e).- Sustrato para la peroxidasa

4-cloro-1-naftol	30.0	mg
Metanol absoluto	10.0	mL
PBS 1X	50.0	mL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50.0	mL

### C.- METODOS

1.- Los sueros fueron obtenidos de sangre venosa y se guardaron en alícuotas de 200 microlitros a -20°C.

2.- Se analizaron 31 aislamientos de Klebsiella pneumoniae (ver tabla II).

3.- Se preparó medio semisólido FN y ES en viales de 5 mL. Cada cepa se sembró por punción en cada vial, se incubó el medio FN por 12 horas a 37°C y el medio ES por 5 días a 20°C.

4.- Se determinó la presencia de la enzima nitrogenasa mediante la reducción de acetileno (41) como sigue:

a).- Las bacterias crecidas en frascos con medio semisólido fueron cerradas con tapón de caucho.

b).- Se inyectó 1 mL de acetileno y se incubó 1 hora a 37°C y 20°C para los medios FN y ES respectivamente.

c).- Transcurrido el tiempo, se tomó 1 mL de la atmósfera de cada vial y se inyectó en el cromatógrafo de gases previamente calibrado para el tiempo de retención del acetileno y del etileno.

d).- Se determinó cualitativamente la presencia de la enzima para cada una de las condiciones de cultivo.

e).- Se seleccionó la cepa de mayor actividad enzimática (cepa 22, según la clave del laboratorio).

5.- Se determinó la curva de crecimiento de la cepa 22 para las dos condiciones de cultivo, por el método nefelométrico a 540 nm de longitud de onda.

6.- Se creció Klebsiella pneumoniae cepa 22 en medio líquido FN por 5 horas a 37°C y en medio ES por 5 días a 20°C.

7.- Transcurrido el tiempo se cosechó la bacteria por centrifugación a 7,000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se concentró 200 veces para EN y 1,000 veces para ES. El paquete bacteriano se lavó 5 veces con solución salina estéril y se congeló el paquete hasta su uso.

8.- Preparación de la muestra para su análisis electroforético (para ambas condiciones de cultivo).

a).- Se ajustó el paquete bacteriano con solución salina a las siguientes densidades ópticas: 0.4, 0.6 y 0.8 a 540 nm de longitud de onda.

b).- De la suspensión ajustada se tomaron 10 mL y se centrifugaron a 7,000 rpm por espacio de 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionaron al paquete 500 microlitros del del regulador de muestra 2X, se colocaron en baño de agua hirviendo por espacio de 10 minutos.

c).- Los sobrenadantes del cultivo, ya concentrados, se mezclaron volumen a volumen con regulador de muestra y también se colocaron en agua hirviendo por 10 minutos.

9.- Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS): Se utilizó el sistema de reguladores discontinuos de Laemmli (42) como sigue:

a) Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con 1.5 mm de grosor.

Gel separador:

Se montó el aparato perfectamente limpio y desengrasado, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En un matraz kitasato se colocaron en orden los siguientes reactivos:

Sol. de monómeros	12.0	mL
Tris 1.5M, pH=8.8	7.5	mL
SDS al 10%	0.6	mL
Agua bidestilada	10.05	mL
Persulfato de $\text{NH}_4^+$	0.15	mL
TEMED	0.01	mL

Se agitó la mezcla y se adicionó entre las 2 placas de vidrio, hasta aproximadamente 4.5 cm del borde superior e inmediatamente se adicionó sobre la superficie 5 mL de agua bidestilada.

Se dejó gelificar por 15 minutos aproximadamente, en seguida se lavó 5 veces con agua destilada. Se escurrió perfectamente la superficie del gel y se colocó el peine apropiado para el gel concentrador (de 10 carriles para el análisis electroforético y peine ciego para inmunoelectrotransferencia).

#### Gel concentrador:

En un matríz kitasato se preparó el gel concentrador con la mezcla siguiente:

Sol. de monómeros	1.33	mL
Tris 0.5M, pH=6.8	2.50	mL
SDS al 10%	0.20	mL
Agua bidestilada	6.10	mL
Persulfato de $\text{NH}_4^+$	0.05	mL
TEMED	0.005	mL

Se agregó ésta mezcla sobre el gel separador, teniendo cuidado de no dejar burbújas en el peine, una vez que gelificó se lavó con agua destilada.

En seguida se montaron las placas en el aparato y se llenaron los tanques con regulador de corriente.

Se colocaron en cada pozo 60 microlitros de cada muestra por analizar y en al menos un pozo con 10 microlitros de los siguientes marcadores de peso molecular:

Albumina bovina	66	Kilodaltones
Albumina de huevo	45	"
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	36	"
Anhidrasa carbónica	29	"
Tripsinógeno	24	"
Inhibidor de tripsina	20.1	"
Alfa-lactalbumina	14.2	"

Se conectó la fuente de poder y se aplicó una corriente constante de 15 mA (voltaje inicial de 60 volts), cuando la marca de azul de bromofenol penetró al gel separador, se aumentó la corriente a 30 mA y se dejó correr hasta que la marca de azul de bromofenol llegó a 0.5 cm del borde del gel (voltaje final de 260 volts).

Se desmontó el aparato y el gel se sumergió por 12 horas en solución colorante de Coomassie al 0.125% metanol-ácido acético.

Se removió el colorante y en seguida se sumergió en solución decolorante I haciendo tantos cambios como fué necesario hasta lograr nitidez adecuada de las bandas. Se agregó decolorante II para preservar el gel para su posterior análisis.

#### 10.- Electrotransferencia según la técnica de Towbin (43).

Se trabajó la muestra a una  $A_{540} = 0.6$  por mostrar una buena resolución. Se realizó SDS-PAGE al 12% y se colocaron 900 microlitros de la muestra en un peine ciego con un diente para marcadores de

peso molecular. Terminado el corrimiento se cortó el extremo del peine ciego, para su tinción con azul Coomassie, el resto se procedió a transferir a papel de nitrocelulosa como sigue:

a).- Se remojaron en regulador de transferencia 3 hojas de papel filtro del # 40, una hoja de papel Whatman # 1 y una hoja de papel de nitrocelulosa, todos de 13 x 15 cm. También se remojó una hoja de fibra Scotch de 16 x 16 x 0.5 cm.

b).- Se abrió el "cassete" del aparato de transferencia como sigue:

Rejilla de plástico  
Papel filtro # 40  
Papel de nitrocelulosa  
Gel ya corrido electroforéticamente

En seguida se marcaron el frente electroforético, inicio del gel separador, los extremos y el sitio en donde se encontraban los marcadores de peso molecular, se colocaron en seguida:

2 hojas de papel filtro # 40  
Fibra Scotch  
Rejilla de plástico

c).- Se cerró y se colocó en la cámara de transferencia quedando el gel en el polo negativo y el papel en el positivo.

d).- Se sometió a una corriente de 1 Ampere por 3 horas.

e).- Al término de la transferencia se desarmó el "cassete" y se cortó una tira del papel de nitrocelulosa del lado en que se encontraban los marcadores de peso molecular y éste se procedió a sumergirlo en solución de tinta china-HBS-Tween 20 al 0.3% y así observar el patrón de proteínas totales transferidas (44).

#### 11.- Inmunodetección:

a).- El papel de nitrocelulosa, con las proteínas transferidas se sumergió en regulador de bloqueo por 2 horas a 37°C y se cortaron tiras de 0.5 cm y se guardaron en el regulador a 4°C hasta su uso.

b).- Cada tira se incubó con 2 mL de cada uno de los sueros por analizar diluidos en regulador de bloqueo 1:50, por 2 horas a 37°C y después toda la noche a 4°C.

c).- Se lavó 5 veces con PBS-Tween 20 al 0.1%, 1 minuto cada vez y se incubó con 2 mL de IgG de cabra conjugada a peroxidasa-anti-inmunoglobulinas totales, diluidas 1:1000 en regulador de bloqueo, por espacio de 2 horas a 37°C.

d).- Se lavó 7 veces con PBS-Tween 20 al 0.1% y 5 veces con PBS 1X, un minuto cada vez. Se agregó entonces 2 mL del sustrato de peroxidasa hasta la aparición de las bandas. Finalmente se detuvo la reacción enjuagando las tiras con agua destilada y se dejó secar para su análisis.

#### 12.- Análisis de resultados

a).- Se determinaron los pesos moleculares de las distintas proteínas de Klebsiella pneumoniae, calculando el Rf, tomando para esto la referencia de los marcadores de peso molecular:

$$Rf = \frac{\text{Distancia de la parte superior del gel a la banda proteica}}{\text{Distancia de la parte superior del gel al frente del azul de bromofenol}}$$

b).- El Rf se graficó contra el log del peso molecular de cada proteína y se determinaron, interpolando en la curva, los pesos moleculares de las proteínas reconocidas como antígenos por los sueros analizados.



## R E S U L T A D O S

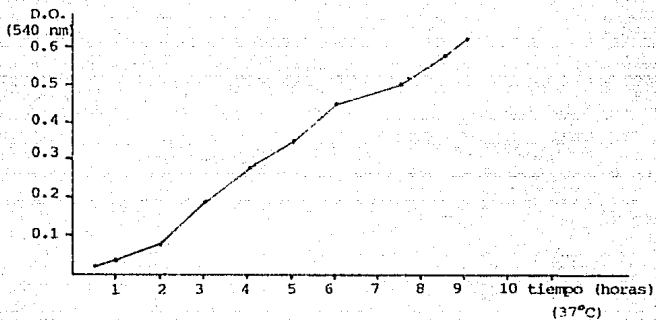
### 1.- BUSQUEDA DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE CRECIMIENTO.

Debido a que se requería un medio de cultivo simple y a que se pretendió analizar proteínas de expresión, se intentó en un inicio hacerlas crecer en medio E diseñado originalmente por Vogel-Bonner (45). No hubo ninguna dificultad para el crecimiento de la bacteria, por lo que se procedió a eliminar la sal de amonio sustituyéndola estequiométricamente por sales de sodio y potasio con objeto de activar a la nitrogenasa. Para éste propósito y tomando en cuenta los requerimientos de hierro y molibdeno para activar a la enzima (36), se procedió a suplementarlos quedando finalmente con  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 0.01% y  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 0.002%.

Por otro lado, ya que se obtuvieron balanceados los medios (EN con amonio como fuente de nitrógeno y ES sin sales de nitrógeno), se probaron las condiciones óptimas de crecimiento, para el caso del medio EN no hubo ninguna dificultad porque se desarrolló bien a 37°C. (Fig. 1), mientras que el medio ES hubo que probarlo a 37°C con atmósfera de  $\text{CO}_2$  y  $\text{N}_2$  con resultados negativos, la mejor forma en la que se activó a la enzima y por consecuencia el crecimiento bacteriano fué a 20°C, aunque el crecimiento fué lento, de 5 a 6 días (Fig. 2), además en condiciones de microaerofilia, ya que se debe recordar que la nitrogenasa es muy sensible al oxígeno (33-34).

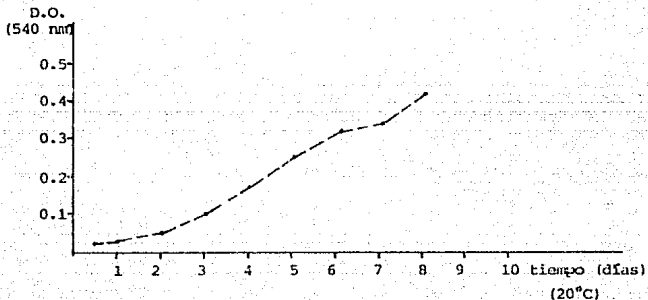
F I G U R A 1

Curva de crecimiento de la cepa 22 en medio EW



F I G U R A 2

Curva de crecimiento de la cepa 22 en medio ES



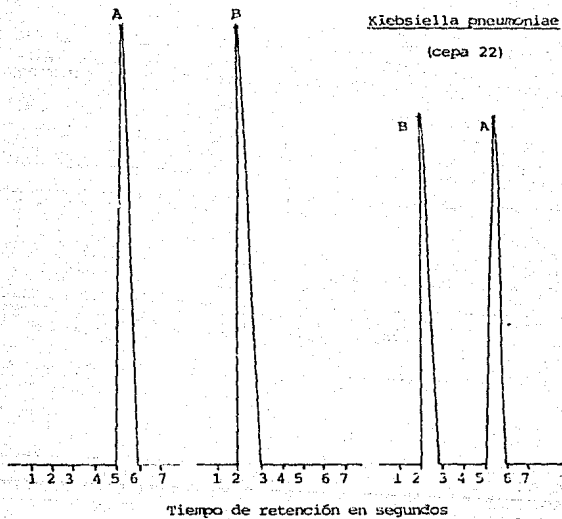
## 2.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE NITROGENASA.

Por la sensibilidad requerida, se prefirió utilizar el sistema de detección de la actividad de nitrogenasa reportado por Schöllhorn (41) ya que el acetileno por mostrar el mismo tipo de enlace que el  $N_2$  atmosférico, nos permite "engañar" a la enzima, la cual lo reduce primero a etileno, etano y finalmente a metano.

La determinación del etileno producido es fácilmente detectable por cromatografía de gases, esto es debido a que sus tiempos de retención en la columna son diferentes (Fig. 3).

F I G U R A 3

Cromatograma (esquema) para la determinación de acetileno  
y etileno como producto de la enzima nitrogenasa



A = Acetileno

B = Etileno

### 3.- ESTANDARIZACION DE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).

Se estandarizó la técnica con base en el método reportado por Towbin (43), sin embargo se modificó la preparación del antígeno, ya que la manera tradicional de prepararlo es utilizando un extracto de proteínas obtenido por rompimiento de la bacteria por ultrasonido, seguido de diálisis y ajustando a una concentración específica de proteínas. Debido a que se requería un extracto proteínico lo más completo posible, se procedió a diseñar la manera de obtenerla, ésta forma consistió en ajustar la suspensión bacteriana a una densidad óptica y el paquete se trató con regulador de muestra 2X el cual contiene SDS que es un detergente y 2-mercaptoetanol que nos permite romper puentes disulfuro de las proteínas bacterianas al sumergirlas en agua hirviendo, además así se les da una carga negativa y de ésta manera se puede pensar que la pérdida de componentes proteínicos de la bacteria es menor.

### 4.- SDS-PAGE DE Klebsiella pneumoniae CEPA 22.

Se decidió utilizar a ésta cepa ya que mostró una buena actividad de la enzima nitrogenasa. Esta cepa fué aislada de un caso de septicemia, por ello el interés de su análisis (Tablas I y II).

Como se observa en la figura 4, hay una mejor resolución ajustando la suspensión bacteriana a una D.O. de 0.6. Se observan, además, diferencias bastante claras en los patrones electroforéticos para la misma cepa crecida bajo las dos condiciones de cultivo, existe similitud en aproximadamente un 50% en cuanto al número de proteínas, sin embargo aparecen otras diferentes e incluso, algunas proteínas muestran una mayor proporción.

Por otro lado, es sorprendente que en el sobrenadante del medio ES, concentrado 1,000 veces, no se observa ninguna proteína de expresión (dato no mostrado). Por el contrario, en el sobrenadante del medio EN, concentrado 200 veces, aparecen fundamentalmente dos proteínas, una de 46 kDa y otra de 17 kDa, estos pesos moleculares fueron obtenidos tomando como base a los marcadores de peso molecular (Tabla III y Fig. 5).

T A B L A I

PRESENCIA DE LA ENZIMA NITROGENASA

<u>ACTIVIDAD</u>	<u>NUMERO DE APLICACIONES</u>
SIN ACTIVIDAD	12
ACTIVIDAD EN AMBOS MEDIOS	4
ACTIVIDAD SOLO EN MEDIO (ES)	15

T A B L A I I

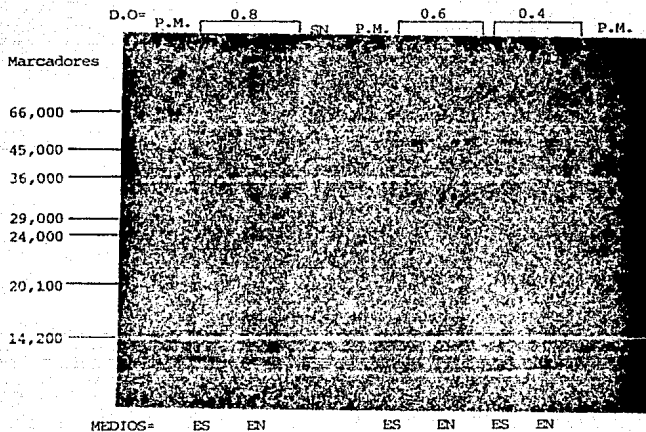
AISLAMIENTO Y DETERMINACION DE NITROGENASA DE LAS CEPAS  
AISLADAS DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS

CLAVE DEL LABORATORIO	FUENTE DE AISLAMIENTO	ACTIVIDAD DE NITROGENASA	
		MEDIO (EN)	MEDIO (ES)
2	COPROCULTIVO	-	-
11	PUS DE VESICULA	-	-
12	DESCONOCIDA	-	-
13	"	-	-
15	HEMOCULTIVO	-	-
20	"	-	-
21	"	-	-
26	"	-	-
29	"	-	-
33	PUNTA DE CATETER	-	-
34	"	-	-
37	"	-	-
3	COPROCULTIVO	+	+
8	DESCONOCIDA	+	+
25	HEMOCULTIVO	+	+
36	PUNTA DE CATETER	+	+
4	UROCULTIVO	-	+
7	PERITONEO	-	+
K8	HEMOCULTIVO	-	+
K8r	DESCONOCIDA	-	+
16	HEMOCULTIVO	-	+
17	"	-	+
18	"	-	+
19	"	-	+
22	"	-	+
23	"	-	+
24	"	-	+
27	"	-	+
28	"	-	+
32	"	-	+
35	PUNTA DE CATETER	-	+



F I G U R A 4

SDS-PAGE de Klebsiella pneumoniae cepa 22

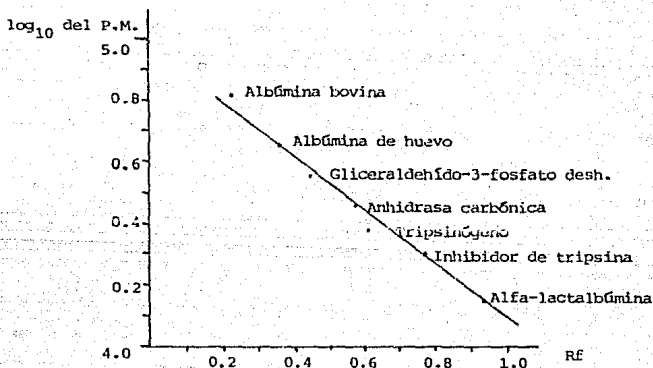


P.M. = Marcadores de peso molecular

SN = Sobrenadante de crecimiento en medio EN

T A B L A I I I

Marcadores de peso molecular	peso molecular (en daltones)	$\log_{10}$ del P.M.	Rf
Albúmina bovina	66,000	4.8195	0.2301
Albúmina de huevo	45,000	4.6532	0.3590
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	36,000	4.5563	0.4407
Anhidrasa carbónica	29,000	4.4623	0.5707
Tripsinógeno	24,000	4.3803	0.6133
Inhibidor de tripsina	20,100	4.3031	0.7756
Alfa-lactalbúmina	14,200	4.1522	0.9470



F I G U R A 5

Recta de marcadores de peso molecular en SDS-PAGE al 12%

## 5.- ANALISIS DE LOS SUEROS POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA,

Se analizaron 37 sueros distribuidos como se muestra en la tabla IV, considerando la presencia del marcador genético HLA-B27. Se tomaron también en cuenta a pacientes con enfermedad espondilítica (no están aún clasificados con espondilitis anquilosante) con objeto de observar si existía un comportamiento similar al de los pacientes con EA.

Como se observa en la figura 6, no hubo ninguna diferencia en el reconocimiento de Klebsiella pneumoniae cepa 22 crecida en medio sin nitrógeno (ES) en los 37 sueros analizados. Lo mismo se observa en el análisis del sobrenadante del cultivo EN (Fig. 7). Sin embargo, como se muestra muy claramente en la figura 8, algunos sueros tanto de sujetos sanos como de pacientes, reconocen fuertemente una proteína de 50-55 kDa en el extracto de la bacteria crecida en medio con fuente de nitrógeno (EN). Este reconocimiento lo realizan los 37 sueros analizados, pero en 14 de ellos (38%) lo hacen fuertemente (expresado como ++). De estos 14 sueros, 12 de ellos corresponden a sujetos B27+ (5 EA, 3 EE y 4 aparentemente sanos) y tan solo 2 (ambos sanos) son B27-.

La tabla V muestra el reconocimiento de la proteína 50-55 kDa entre sanos, EE y EA clasificados de acuerdo a su HLA. el análisis estadístico no muestra diferencia significativa al hacer

la comparación, en otras palabras, analizando cada población de acuerdo a su HLA y comparando EA-EE, EA-sanos y EE-sanos no ha diferencia estadísticamente significativa en el reconocimiento (++) de la proteína. Sin embargo como se muestra en la tabla VI, al comparar el reconocimiento (fuertemente) de dicha proteína entre individuos HLA-B27+ y HLA-B27-, sin considerar que sean sanos o enfermos, se observa que en este caso si existe diferencia estadísticamente significativa por el análisis de  $\chi^2$ .

T A B L A I V

SUEROS ANALIZADOS

	HLA-B27+	HLA-B27-	Total
Espondilitis Anquilosante	9	1	10
Enfermedad Espondilítica	6	3	9
Aparentemente sanos	8	10	18

T A B L A V

RECONOCIMIENTO DE LA PROTEINA 50-55 kDa

HLA-B27+	+	++	p <sup>a</sup>
Espondilitis anquilosante	4	5	
Enfermedad espondilítica	3	3	>0.05
Aparentemente sanos	4	4	>0.05
HLA-B27-			
Espondilitis anquilosante	1	0	
Enfermedad espondilítica	3	0	>0.05
Aparentemente sanos	8	2	>0.05

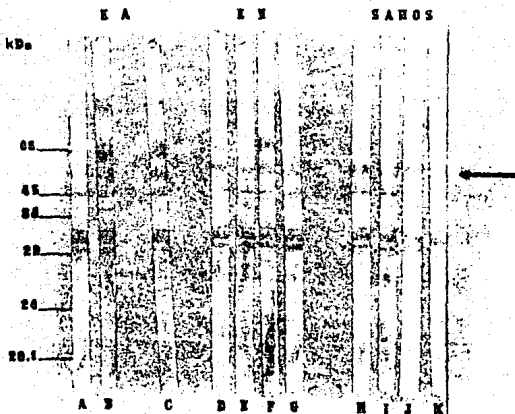
a = Análisis estadístico por  $\chi^2$  (46)

+ = Reconocimiento débil

++ = Reconocimiento fuerte

F I G U R A 6

Reconocimiento de protefnas bacterianas crecidas  
en medio ES (IEF).



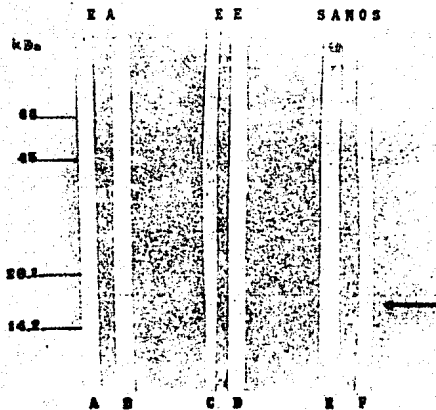
A y B = B27+  
C = B27-  
D y E = B27+  
F y G = B27-  
H e I = B27+  
J y K = B27-

EA = Espondilitis Anquilosante

EE = Enfermedad Espondilítica

F I G U R A 7

Reconocimiento de proteínas excretadas por la bacteria  
crecida en medio EN (IET).



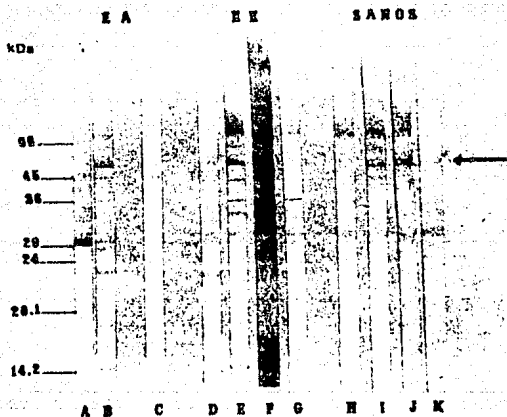
- A = B27+
- B = B27-
- C = B27+
- D = B27-
- E = B27+
- F = B27-

EA = Espondilitis Anquilosante

EE = Enfermedad Espondilítica

F I G U R A 8

Reconocimiento de proteínas bacterianas crecidas  
en medio EH (IPT).



A y B = B27+  
C = B27-  
E y D = B27+  
F y G = B27-  
H e I = B27+  
J y K = B27-

EA = Espondilitis Anquilosante

EE = Enfermedad Espondilítica



T A B L A V I

RECONOCIMIENTO DE PROTEINA 50-55 kDa ENTRE HLA-B27+

Y HLA-B27- SIN CONSIDERAR ENFERMEDAD

	+	++
HLA-B27+	11	12
HLA-B27-	12	2

significancia  $\chi^2$  = 0.025 > p > 0.01

+ = Reconocimiento débil  
 ++ = Reconocimiento fuerte

## D I S C U S I O N

En el presente trabajo se demostró que la presencia de la enzima nitrogenasa no es un evento extraño, además se debe recordar que todos los aislamientos son de origen intrahospitalario. El método para la determinación de la actividad de nitrogenasa es muy sensible, se pudo haber utilizado otro tipo de sustrato como en  $CN^-$ , pero el acetileno presenta menos riesgo.

En cuanto a la forma de preparar el antígeno, presenta una serie de ventajas con respecto al método tradicional, ya que el método implementado en este trabajo presenta la ventaja de utilizar a la bacteria intacta, por lo que se evita la sonicación y el dializado que pudieran, de alguna manera, alterar o perder alguna proteína que fuera de interés en el análisis electroforético o en el reconocimiento de los sueros estudiados.

En cuanto a las diferencias electroforéticas para la misma cepa crecida en los dos medios, no es de extrañarse, puesto que si se considera que al no existir nitrógeno en el medio y activarse por esto la enzima nitrogenasa, se están activando vías metabólicas alternas, pero a pesar de esto las diferencias electroforéticas son extraordinarias.

En los sobrenadantes, la proteína de 45 kDa parece correlacionar con una proteína constitutiva de igual peso molecular, mientras que la de 17 kDa es aparentemente un verdadero producto de excreción, por lo que se consideró para su análisis por inmunoelectrotransferencia.

Se intentó demostrar que los pacientes con EA y EE tienen anticuerpos anti-K. pneumoniae que los diferencian de los individuos sanos. Esto es debido a la especificidad que tuvieron contra componentes de la bacteria como lo ha sido propuesto por el grupo de Ebringer (9,14-16). Sin embargo, el análisis de los sueros mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia (IEF) muestra, en apariencia, que todos los sujetos estudiados reconocen por igual a los componentes bacterianos de la cepa utilizada de K. pneumoniae, la cual, por ser de origen septicémico, se esperaba que mostrara alguna característica antigénica particular que permitiera observar diferencias. A pesar de no encontrar proteínas que fueran reconocidas sólo por los enfermos, se pudo identificar una proteína de peso molecular de 50-55 kDa en la bacteria crecida en medio EN, la cual, fué reconocida fuertemente por el 38% de los sueros. Es interesante, que este reconocimiento sólo fué observado para el extracto de la bacteria crecida en el medio EN y no así en medio ES.

Aparentemente el fuerte reconocimiento de la proteína de 50-55 kDa no tendría ningún valor, ya que es reconocida igual por algunos sueros de pacientes y de sujetos sanos (testigos). Sin embargo

se debe considerar que el estudio se hizo en pacientes HLA-B27+ y HLA-B27- (9 y 1 respectivamente) y sus familiares, muchos de los cuales también son B27+ y aunque aparentemente son sanos no se descarta la posibilidad de que muchos de ellos en un futuro pudieran presentar alguna espondiloartropatía (3-8). Debido a esta observación, se prefirió analizar a los sujetos de acuerdo a su HLA como B27+ y B27- sin considerar la presencia o ausencia de enfermedad y es sorprendente que tan sólo el 14% (2/14) sujetos B27- pudieran reconocer a la proteína 50-55 kDa fuertemente, mientras que el 52% (12/23) sujetos B27+ lo hacen igualmente (tabla VI).

Ahora bien, la importancia de esa proteína 50-55 kDa radica en que es precisamente una de las proteínas que incrementan su concentración al hacer crecer a K. pneumoniae en medio sin fuente de nitrógeno (Figura 4) y si se toma en cuenta que cada monómero del Componente I de la nitrogenasa pesa entre 50 y 60 kDa, se puede entonces suponer que tan y como lo propone Schwimmbeck, Oldstone, Yu y Ogazawara (16, 31), existe un elevado título de anticuerpos dirigidos contra la enzima nitrogenasa de Klebsiella pneumoniae en pacientes EA-B27+. Hasta el momento no se ha aclarado a cuál de los componentes de la enzima es que están dirigidos estos anticuerpos, podemos pensar entonces, con el presente estudio, que sí existen tales anticuerpos es por el mimetismo molecular existente entre la enzima nitrogenasa (probablemente el Componente I) y la molécula HLA-B27 como lo propone Ogazawara (31).

La espondilitis anquilosante no es la única enfermedad que se ha tratado de explicar mediante un fenómeno de mimetismo molecular, entre otras se mencionan a la proteína capsídica VP<sub>2</sub> del virus de la polio y el receptor de acetil-colina, la proteína 24 (p24) del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y una secuencia de la región constante de la IgG, el virus del sarampión P3 y la corticotropina, en las cuales se asemejan secuencias hasta de 6 a 8 aminoácidos (47). Para el caso de K. pneumoniae y espondilitis anquilosante, los aminoácidos se encuentran bien identificados y ésto se logró mediante el análisis de secuencias por computadora, por lo tanto los trabajos enfocados al estudio de la respuesta inmune humoral y celular en los pacientes han sido utilizando péptidos sintéticos, sin encontrar hasta el momento ningún reporte en el cual se utilice a la enzima en su forma natural (48).

A pesar de estas observaciones, el análisis de la bacteria crecida en medio ES, no muestra ninguna diferencia en el reconocimiento por parte de todos los sueros estudiados, lo que nos hace suponer dos cosas: Primero; que quizá la enzima activada sufre una modificación de tal forma que no existen diferencia en el reconocimiento de ella tanto por los sujetos B27+ y B27- y por el contrario en su forma no activa sólo los individuos B27+ la reconocen cuantitativamente diferente, esto no sería extraño si consideramos que en el tracto digestivo la enzima se encontraría en su forma no activa. Segundo; que ésta diferencia en el reconocimiento probablemente sea en el

isotipo con el que los individuos B27+ reconocen a la proteína. Quizá pudiera ser un fenómeno que involucre a la enzima no activa y el isotipo con el que responden dichos individuos. Estas observaciones se basan también en el hecho de que los pacientes con EA muestran un elevado título de anticuerpos de clase IgA (23-27). Por lo tanto se propone un futuro estudio que analice el isotipo de anticuerpos que están reconociendo a la proteína 50-55 kDa de Klebsiella pneumoniae ya que el antisuero utilizado en éste trabajo, reconoce a los tres isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA).

El estudio del sobrenadante de cultivo se realizó con el objeto de demostrar si existen, en los pacientes, anticuerpos contra el "factor modificante" liberado en el medio que ha sido reportado por el grupo de Geczy (36-40). Con la metodología utilizada en éste trabajo no se logró encontrar ésta diferencia, probablemente también sean diferencias en el isotipo de inmunoglobulina, pero aún con los resultados obtenidos no se puede descartar la posibilidad de que ésta proteína (17 kDa) pudiera modificar a la molécula B27, para esto se requieren hacer estudios de búsqueda de anticuerpos fijadores del complemento para las células, modificadas por el sobrenadante, de pacientes EA y testigos tanto B27+ como B27-.

Aunque no se puede concluir si la diferencia en el reconocimiento es contra la nitrogenasa, menos aún si es contra el monómero del Componente I de la enzima no activa, se propone, por

lo tanto, aislar a la enzima en sus formas activa y no activa y con éstas proteínas purificadas, determinar si existen diferencias no solo en el reconocimiento cualitativo sino cuantitativo. Finalmente, cabe mencionar que se deben realizar estudios para determinar si éstos anticuerpos son fijadores del complemento y determinar, de esta manera, la presencia de éstos que reconocen, por mimetismo molecular entre nitrogenasa y HLA-B27, a la molécula en la superficie celular y si la presencia de éstos anticuerpos se deben a la diferente presentación antigénica de la nitrogenasa (probablemente no activa) por parte de los sujetos con el marcador genético HLA-B27.

## CONCLUSIONES

1.- Se lograron diseñar medios de cultivo, libres de proteínas para el estudio de los productos de expresión de Klebsiella pneumoniae.

2.- Se demostró la presencia de la enzima nitrogenasa en la mayoría de los aislamientos de infecciones intrahospitalarias, por lo tanto parece ser que la presencia de la nitrogenasa no es un evento extraño.

3.- Se ideó una forma diferente para analizar extractos proteínicos totales de bacterias, lo que muy probablemente mejora el método tradicional de obtención.

4.- Se demostró la presencia, en la cepa analizada, de dos proteínas en el sobrenadante del cultivo con fuente de nitrógeno, de las cuales, al menos una de ellas, la de 17 kDa es un verdadero producto de expresión.



5.- Se demostró que existe diferencia en el reconocimiento de una proteína de 50-55 kDa de Klebsiella pneumoniae crecida en medio con fuente de nitrógeno, entre sujetos HLA-B27+ y HLA-B27-.

6.- Aunque no se puede concluir si Klebsiella pneumoniae es un agente involucrado en la etiopatogénesis de la espondilitis anquilosante, sí se puede afirmar que existe una tendencia a reconocer de una manera diferente a un componente de la bacteria y que hace falta, por lo tanto, analizar más casos y utilizar testigos de la población abierta, así como individuos HLA-B27+ sin antecedentes familiares de enfermedades reumáticas.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Burgos-Vargas, R. (1987). Espondilitis anquilosante: evolución de conceptos. Rev. MEx. Reumat. 2 : 97-99
- 2.- Khan, Muhammad A. y Skosey, J. (1968): Ankylosing spondylitis and related spondyloarthropathies. En: Immunological Diseases, Vol. IV, Boston U.S.A., ed. Little Brown & Co. pp. 1509-1538
- 3.- Wagener, P.; Mau, W.; Zeidler, G.; Robin-Win, M. y Deicher, H. (1985). HLA-B27 and clinical aspects of ankylosing spondylitis: results of prospective studies. Imm. Rev. 86 : 93-100
- 4.- Orozco, J.; Navarro, A.; Galván, F. y Hernández, C. (1987). Espondilitis anquilosante: prototipo de las espondiloartropatías seronegativas. Rev. MEx. Reumat. 2 : 100-111
- 5.- Fraga, A.; Gorodezky, C.; Lavalle, C.; Castro-Escobar, L.; Magaña, L. y Escobar-Gutiérrez, A. (1979). HLA-B27 in Mexican patients with ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum. 22:302
- 6.- Calin, A. (1983). Spondyloarthropaty in caucasians and non-caucasians. J. Rheum. 10 : 10-18
- 7.- Schlosstein, L.; Terasaki, P.; Bluestone, R. y Pearson, C. (1973). High association of an HL-A antigen, w27, with ankylosing spondylitis. N. Eng. J. Med. 288 : 704-706
- 8.- Orozco-Medina, H. y Vázquez-Escobosa, C. (1981). Antígenos HLA en espondilitis anquilosante. Rev. Invest. Clin. (MEx). 33 : 369-372
- 9.- Ebringer, A.; Baines, M. y Ptaszynska, T. (1985). Spondyloarthritis uveitis, HLA-B27 and Klebsiella. Imm. Rev. 86 : 101-116.
- 10.- Brewerton, D. y Goddard, D. (1987). The myocardium in ankylosing spondylitis. A clinical, echo-cardiographic and histopatological study. Lancet 1 : 995-998

- 11.- Feltelius, N. (1986). Pulmonary involvement in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 45 : 736-740
- 12.- Moll, J. M. (1974). Associations between ankylosing spondylitis psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies and Behcet's syndrome. *Medicine (Bal)* 53 : 343-364
- 13.- Mc Devitt, H. O. (1974). HLA, immune response genes and diseases. *Lancet* i : 1269-1275
- 14.- Welsh, J.; Avakian, H.; Cowling, P.; Ebringer, A.; Wooley, P.; Panayi, G. y Ebringer, R. (1980). Ankylosing spondylitis, HLA-B27 and Klebsiella. I. Cross-reactivity studies with rabbit antisera. *Br. J. exp. Path.* 61 : 85-91
- 15.- Trull, A.; Ebringer, A.; Panayi, G.; Ebringer, R. y James, D. (1984). HLA-B27 and the immune response to enterobacterial antigens in ankylosing spondylitis. *Clin. exp. Immunol.* 55 : 74-80
- 16.- Schwimmbeck, P.; Yu, D. y Oldstone, M. (1987). Autoantibodies to HLA-B27 in the sera of HLA-B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. *J. Exp. Med.* 166: 173-181
- 17.- Seager, K.; Bashir, H.; Genzy, A.; Edmonds, J.; De Vere-Tyndall, A. (1979). Evidence for a specific B27-associated cell surface marker on lymphocytes of patients with ankylosing spondylitis. *Nature* 277 : 68-70
- 18.- Davis, D.B. y Dulbecco, R. (1984). Microbiology. 3a. Edición. Philadelphia, USA. Harper and Row Pub. pp : 659
- 19.- Avalos-Lira, C.; Ortigoza-Ferado, J. y Mesta-Howard, A. (1982). Klebsiella pneumoniae como agente productor de infecciones sistémicas. *Infectología (Méx)*. 2 : 715-717
- 20.- Cohen, M. (1985). Antigenic characterization of Enterobacteriaceae Associated with Reiter's Syndrome. En: Advances in Inflammation Research. Vol. 9 (The Spondyloarthropathies). New York, Raven Press. pp: 173-177

- 21.- Yu, D.T. (1985). Immune Response of Patients with Reiter's Syndrome to Yersinia enterocolitica. En: Advances in Inflammation Research. Vol. 9 (The Spondyloarthropathies). New York, Raven Press. pp. 179-187
- 22.- Firestein, G. y Swaifler, N. (1997). Reactive arthritis. Ann. Rev. Med. 38 : 351-360
- 23.- Cavender, D. y Ziff, M. (1986). Anti-HLA-B27 antibodies in sera from patients with Gram-negative bacterial infections. Arthritis Rheum. 29 : 352-357
- 24.- Collado, A.; Sanmarti, R.; Bielsa, I. y Castel, T. (1988). Immunoglobulin A in the skin of patients with ankylosing spondylitis. Ann. Rheum. Dis. 47 : 1004-1007
- 25.- Cooper, R.; Fraser, S.; Sturrock, C. y Gemmell, C. (1988). Raised titres of anti-klebsiella IgA in ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis, and inflammatory bowel disease. Br. Med. Jour. 296 : 1432-1434
- 26.- Peeters, A.; Van-Den Wall, W.; Van-Dalsen, A. y Westedt, M. (1988). Relation of microscopic haematuria in ankylosing spondylitis to circulating IgA containing immune complexes. Ann. Rheum. Dis. 47 : 645-647
- 27.- Mackiewicz, A.; Khan, H. y Reynolds, T. (1989). Serum IgA, acute phase proteins, and glycosylation of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein in ankylosing spondylitis. Ann. Rheum. Dis. 48 : 99-103
- 28.- Ebringer, R.; Cawdell, P.; Cowling, P. y Ebringer, A. (1978). Sequential studies in ankylosing spondylitis: association of Klebsiella pneumoniae with active disease. Ann. Rheum. Dis. 37 : 146-151
- 29.- Warren, R. y Brewerton, D. (1980) Faecal carriage of klebsiella by patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 39 : 37-44

- 30.- Eastmond, C.; Willshaw, H.; Burgess, S.; Shinebaum, R.; Cooke, E. y Wright, V. (1980). Frequency of faecal Klebsiella aerogenes in patients with ankylosing spondylitis and controls with respect to individual features of the disease. Ann. Rheum. Dis. 39:118-123
- 31.- Ogasawara, M.; Kono, D. y Yu, D. (1986). Mimicry of human histocompatibility HLA-B27 antigens by Klebsiella pneumoniae Infect. Immun. 51 : 901-908
- 32.- Brill, Winston. (1980). Biochemical genetics of nitrogen fixation. Microbiol. Rev. 44 : 449-467
- 33.- Hausinger, R. y Howard, J. (1980). Comparison of the iron proteins from the nitrogen fixation complexes of Azotobacter vinelandii, Clostridium pasteurianum, and Klebsiella pneumoniae. Proc. Natl. Acad. Sci. 77 : 3826-3830
- 34.- Dalton, H y Mortenson, L. (1972). Dinitrogen (N<sub>2</sub>) fixation (with a biochemical emphasis). Bacteriol. Rev. 36 : 731-260
- 35.- Arnason, A.; Thorsteinsson, P. (1978). Ankylosing spondylitis, HLA-B27 and Bf. Lancet 1 : 339-340
- 36.- Geczy, A. Alexander, K.; Bashir, H. y Edmonds, J. (1980). A factor(s) in Klebsiella culture filtrates specifically modifies an HLA-B27-associated cell-surface component. Nature 283:782-784
- 37.- Sullivan, J. y Geczy, A. (1985). The modification of HLA-B27-positive lymphocytes by the culture filtrate of Klebsiella K43 BTS 1 is a metabolically active process. Clin. exp. Immunol. 62 : 672-677
- 38.- Druery, C.; Bashir, H. y Geczy, A. (1980). Search for Klebsiella cell wall components cross-reactive with lymphocytes of B27<sup>AS+</sup> individuals. Hum. Immunol. 1:151-160
- 39.- Orban, P.; Sullivan, J.; Geczy, A.; Upfold, I.; Coultis, N. y Bashir, H. (1983). A factor shed by lymphoblastoid cell lines of HLA-B27 positive patients with ankylosing spondylitis, specifically modifies the cells of HLA-B27 positive normal individuals. Clin. exp. Immunol. 53 : 10-16

- 40.- Cameron, F.; Russell, P.; Sullivan, J. y Geczy, A. (1983). Is a Klebsiella plasmid involved in aetiology of ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals? Mol. Immunol. 20 : 563-566
- 41.- Schöllhorn, R. (1967). Acetylene as a competitive inhibitor of N<sub>2</sub> fixation. Proc. Natl. Acad. Sci. 58 : 213-216
- 42.- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature 227 : 680-685
- 43.- Towbin, H.; Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 : 4350-4354
- 44.- Hancock, K. y Tsang, V. (1983). India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. Anal. Biochem. 133 : 157-162
- 45.- Vogel, H. y Bonner, D. (1956). Acetylornithinase of Escherichia coli: partial purification and some properties. J. Biol. Chem. 218 : 97-106
- 46.- Fischer, Frederic. (1973). Classical Significance Test. En: Fundamental Statical Concepts. 1a. ed., New York, USA. Harper and Row Pub. pp: 285-292
- 47.- Oldstone, Michael. (1987). Molecular Mimicry and Autoimmune Disease. Cell 50 : 819-820
- 48.- Husby, G.; Tsuchiya, N.; Schwimmbeck, P.; Keat, A.; Pahle, J., Oldstone, M. y Williams, R. (1989). Cross-Reactive epitope with Klebsiella pneumoniae nitrogenase in articular tissue of HLA-B27+ patients with ankylosing spondylitis. Arthritis and Rheum. 32 : 437-445