

29
29



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“HETEROGENEIDAD DEL DERIVADO PROTEICO PURIFICADO (DPP) EM- PLEADO EN LA PRUEBA DE TUBERCU- LINA QUE SE REALIZA EN BOVINOS EN LA REPUBLICA MEXICANA”



T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Alfredo Castañeda Ramírez



**Asesores: M.V.Z. Raymundo Iturbe Ramírez
Q.F.B. Mario Huesca Contreras**

México, D. F.

1987



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.

C O N T E N I D O

	Página
RESUMEN -----	1
INTRODUCCION -----	2
MATERIAL Y METODOS -----	8
RESULTADOS -----	11
DISCUSION -----	13
CONCLUSION -----	18
LITERATURA CITADA -----	19
TABLAS -----	26
FOTOGRAFIAS -----	27

R E S U M E N

CASTAÑEDA RAMIREZ ALFREDO. Heterogeneidad del derivado proteico purificado (DPP) empleado en la prueba de tuberculina que se realiza en bovinos en la República Mexicana. (Bajo la dirección de: MVZ Raymundo Iturbe Ramírez y QFB Mario Huesca Contreras).

La tuberculosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa causada por el Mycobacterium bovis que también afecta al hombre. El método más utilizado para el diagnóstico de esta zoonosis en bovinos es la prueba de intradermorreacción de la tuberculina (PT) por las ventajas técnicas y económicas que ofrece. Sin embargo en esta prueba se presentan reacciones inespecíficas inherentes al DPP que para realizarla se utiliza. En este estudio se utilizaron las técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (EGPA-DSS) y la inmunoelectrotransferencia (IET) para analizar los electroferotipos y la antigenicidad de los mismos en 8 muestras del DPP bovino empleado en México. Los resultados mostraron variaciones en la concentración de proteínas en estas muestras. Los electroferotipos obtenidos por EGPA-DSS evidenciaron la presencia de bandas cuyos pesos moleculares (PM) aproximados fueron de 98, 65, 63 y 55 kilodaltones (Kd) designadas A, B, C y D respectivamente. Las diferencias observadas se hicieron más evidentes al emplear sueros inmunes anti M. bovis BCG y anti M. tuberculosis H37Rv en la IET, pues se manifestaron 2 bandas -- PM aproximado de 60 y 24 Kd designadas E y F con el segundo antisuero. Se concluye que las diferencias en los electroferotipos obtenidos en este trabajo, así como la variación antigénica observada en ellos, puede contribuir a la presentación de reacciones no específicas en la PT in vivo realizada en bovinos. La heterogeneidad mostrada con los DPP bovinos solo se ha informado anteriormente para el DPP humano.

INTRODUCCION.

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa crónica causada por distintas variedades del bacilo tuberculoso. El M. bovis produce la enfermedad en bovinos y puede afectar al hombre así como a otras especies animales, por lo que es considerada una zoonosis (12,27,28,45).

Se estima que la prevalencia de la tuberculosis bovina en México es de un 40%. Debido a esto, se considera que la enfermedad esta distribuida en todo el territorio nacional, estando solo un 2.2% de la población bovina (aproximadamente 36 millones) dentro del programa de control de la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis establecido en 1934 (17,43,60).

Las pérdidas económicas que ocasiona y el riesgo de salud pública que representa esta enfermedad, enfatizan la necesidad de un diagnóstico adecuado para el éxito de los programas de control y erradicación de la misma (7,12,20,45).

Los métodos más utilizados para el diagnóstico de esta zoonosis se basan en la evaluación de la respuesta inmune y el aislamiento e identificación del agente etiológico, que aunque costoso y tardado, constituye la prueba definitiva de la infección (8,21,27).

Entre las pruebas inmunológicas tendientes a evaluar la respuesta humoral se encuentran: fijación de complemento -- (FC), aglutinación (A), Hemoaglutinación (HA), contraimmunoelectroforesis (CIE), floculación con bentonita (FB) e inmunofluorescencia (IF). Para evaluar la respuesta celular estan: transformación blastogénica (TB), inhibición de la migración de macrófagos (MIF) e intradermorreacción o prueba de tuberculina (PT) (8,21,39,42,54,58,63,70).

La PT es la prueba comunmente empleada para el diag-

nóstico de la tuberculosis bovina en nuestro país por las ventajas técnicas y económicas que ofrece y que no han sido superadas por otras técnicas (26,30). Esta prueba se basa en la inducción y evaluación de una reacción de hipersensibilidad mediada por células (HMC) que, en animales infectados con el M. bovis aparece entre 48 y 72 horas después de la aplicación intradérmica de 0.1 ml de tuberculina (derivado proteico purificado), que contiene de 2 a 4 mg de proteína por mililitro (equivalentes a 5 000-10 000 UI de tuberculina) (23,35,37,40,41, 51). En esta reacción intervienen principalmente linfocitos T que al liberar sus linfocinas inducen una infiltración de monocitos, linfocitos y macrófagos así como aumento en la permeabilidad vascular, que se manifiesta como una inflamación en el sitio de inoculación (4,8,27,31,53,64).

La PT se puede realizar en bovinos mayores de 6 meses y experimentalmente requiere un tiempo de 2 a 10 semanas - después de efectuar la infección, para que la HMC sea evidente (4,8,27).

El empleo de la tuberculina en bovinos se inició en 1891 (51,59) y desde entonces se han realizado múltiples estudios de este producto dando como resultado modificaciones en su proceso de elaboración, su potencia, la región anatómica empleada para aplicarla y la utilización simultánea de tuberculinas diferentes a la bovina, todo esto con la finalidad de disminuir al mínimo las reacciones inespecíficas que se observan al efectuar la PT y que tienen un origen diverso (21,22,37,52).

Se han producido y utilizado ampliamente 3 tipos de tuberculinas: la primera fué la tuberculina vieja de Koch (TV), consistente del filtrado de un cultivo de M. tuberculosis en caldo-glicerol, esterilizado y concentrado con calor hasta la

décima parte de su volumen original (4,16,21,26,57). Por otro lado, esta la tuberculina en medio sintético concentrada con calor (MSCC) que es el filtrado de un cultivo de Mycobacterium spp en medio sintético, esterilizado y concentrado con calor a la tercera parte de su volumen inicial (5,21) y finalmente, el derivado protéico purificado (DPP) que consiste del filtrado de un cultivo de Mycobacterium spp en medio sintético, esterilizado con calor, precipitado con ácido tricloroacético o sulfato de amonio y posteriormente resuspendido con una solución de fosfatos (4,5,7,16,21,27).

Como se observa, el proceso de elaboración de las diferentes tuberculinas se lleva a cabo en condiciones en las cuales muy probablemente gran parte de las proteínas son desnaturalizadas, lo cual podría contribuir a la presentación de reacciones no específicas en la PT (16,21,26,27).

Las reacciones inespecíficas observadas en bovinos que sin estar infectados por el M. bovis responden a la tuberculina (falsos positivos), pueden ser causadas por el contacto con otras especies de Mycobacterium (grupo MOTT* o micobacterias atípicas) y con bacterias de los géneros Nocardia y Corynebacterium, con quienes se ha establecido que existe relación antigénica (4,8,13,14,25,38,61,64). Por otro lado, las causas de que bovinos infectados no reaccionen a la tuberculina (falsos negativos) pueden estar relacionadas con: 1) el individuo probado (infecciones concomitantes, desórdenes metabólicos, el uso de drogas inmunosupresoras, edad, gestación, nivel de producción, tensión y estado nutricional principalmente); 2) la tuberculina empleada (mal manejo y/o almacenamiento); 3) el método de aplicación (dosis inadecuada o inoculación no intradérmica); 4) la lectura e interpretación de los resultados obteni

*. Mycobacterium other than tubercle bacillus.

dos y 5) la región anatómica utilizada (la piel del cuello es más sensible que la del pliegue anocaudal (4,46,47,57,61,64).

Debido a que en la actualidad la tuberculina más frecuentemente empleada es el DPP (que no es totalmente protéico ni purificado), se han utilizado diferentes técnicas para el estudio de su composición así como la participación de sus componentes en la reacción de HMC (16,32). Entre las técnicas empleadas (que han proporcionado mayor información en la identificación de antígenos micobacterianos) se encuentran las de ultracentrifugación, de cromatografía y la electroforesis en gels de poliacrilamida (EGPA) (2,16,56).

Los primeros experimentos de electroforesis efectuados para analizar la composición del DPP fueron realizados por F. Seibert en 1942 (16,61) empleando el filtrado de un cultivo de M. tuberculosis no sometido a calor, en el que pudo determinar la presencia de proteínas y polisacáridos. Posteriormente, Daniel y Affronti (16), utilizando la inmunoelectroforesis demostraron que esas proteínas y polisacáridos representaban a su vez varios antígenos.

Utilizando EGPA, Affronti y col. (3) encontraron diversos componentes antigénicos en el DPP humano (DPPh), siendo de bajo peso molecular (PM) los que mostraron mayor actividad en la PT (< 10 Kd). En 1972 Moulton y col. (50) determinaron la presencia de fracciones específicas e inespecíficas con predominio de componentes de alto PM (> 20 Kd), por medio de cromatografía. En 1978, Gupta y Landi (29) aislaron a partir del DPPh, por medio de cromatografía de intercambio iónico, 2 fracciones peptídicas que mostraron mayor potencia y especificidad que el DPPh, cuando fueron probados en cobayos previamente sensibilizados con cepas homólogas y heterólogas de Mycobacterium

Sin embargo, el estudio de la composición del DPP bovino (DPPb) ha recibido poca atención.

Nuevas investigaciones informan de variaciones entre las micobacterias. Así, aunque M. tuberculosis y M. bovis son consideradas serológicamente homogéneas con el empleo de anticuerpos policlonales y pueden diferenciarse únicamente por --- pruebas morfológicas, bioquímicas y de virulencia en animales, Coates y col. (11) observaron diferencias antigénicas entre ellas y aún entre cepas de la misma especie por medio de anticuerpos monoclonales (AcM), situación que también se ha evidenciado por inmunoelectrotransferencia (IET) de proteínas de secreción (33).

Finalmente, los estudios de fraccionamiento del DPP sugieren que este producto es una mezcla de constituyentes antigénicos de bajo PM y de alto PM, además de que contienen --- gran cantidad de polisacáridos, por lo que es posible que existan variaciones en la composición del DPP de un lote a otro -- (16,26).

HIPOTESIS.

Las variaciones antigénicas entre cepas de M. bovis evidenciadas por medio de AcM e IET y los métodos empleados en la elaboración del DPP, probablemente traen consigo variaciones en la constitución de este producto contribuyendo con esto a la presentación de reacciones inespecíficas y a la heterogeneidad de las respuestas obtenidas al utilizar el DPP en la PT para el diagnóstico de tuberculosis.

OBJETIVOS.

1) Determinar los electroferotipos de diferentes --- muestras del DPPb que es utilizado en México para el diagnósti- co de la tuberculosis bovina empleando EGPA.

2) Realizar un análisis antigénico de los electrofe- rotipos por medio de IET, empleando sueros inmunes anti M. tu- berculosis H₃₇Rv y anti M. bovis BCG pues proteínas que presen- tan electroferotipos iguales o similares pueden resultar anti- génicamente diferentes, lo que solo puede ser evidenciable con la IET.

MATERIAL Y METODOS.

DERIVADO PROTEICO PURIFICADO: Del DPPb que se emplea en nuestro país para el diagnóstico de tuberculosis bovina, se obtuvieron 8 muestras de diferentes lotes*, los cuales fueron conservados de acuerdo con las especificaciones del productor hasta su uso.

PREPARACION DE MUESTRAS: Para evitar la interferencia de otros componentes y poder determinar la cantidad de proteína de las muestras obtenidas, se dializaron contra una solución amortiguadora de fosfatos (SAF) 0.01M, pH 7.2 con 6 cambios de 2 litros cada uno en un período de 36 horas (h) a 4°C. Los componentes conocidos que se pretende eliminar son: fenol, glicerol y Tween 80**, los 2 primeros utilizados como preservativos y el último para evitar la adsorción de proteínas a las paredes de los recipientes en que se almacena (4,5,7).

DETERMINACION DE PROTEINAS: Una vez efectuada la diálisis, se procedió a determinar la cantidad de proteínas en cada muestra, utilizando el método de Lowry y col. (9,68).

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-DUODECIL - SULFATO DE SODIO (EGPA-DSS): Se llevó a cabo con base en la técnica descrita por Laemmli (36), preparando por duplicado geles de 14 cm de largo, 12 cm de ancho y 0.15 cm de grosor.

De cada una de las muestras ya dializadas, se tomaron 60 microgramos (μg) de proteína que fueron sometidos a digestión proteica durante 5 minutos (') a 100°C, para lo cual, se añadió a cada muestra una solución-coctel de Tris HCl 0.05M pH 6.8 (conteniendo 1% de 2-mercaptoetanol, 1% de DSS, 0.74% de ácido etilendinitrilitetracético, 10% de glicerol y azul de bromofenol) a partes iguales. Posteriormente, se colocó una muestra por carril (150 μl como volumen máximo de la mezcla --

* Productora Nacional de Biotológicos Veterinarios.

** Polioxietilenesorbitan monooleato

proteína-coctel) y se realizó la electroforesis con una solución amortiguadora (Tris base 0.3%, glicina 2% y DSS 1%) con pH 8.6 en geles con 10% de acrilamida, bajo condiciones de amperaje constante y voltaje variable utilizando 15 miliamperes (mA) para el gel superior e incrementándolo a 30 mA al entrar las muestras al gel inferior. La solución amortiguadora se mantuvo en agitación constante y se utilizó un sistema de refrigeración para mantener la temperatura a 4°C.

Al finalizar la EGPA-DSS, los geles se tñieron con una solución de azul de Coomasie al 0.125%, metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 12 h. Una vez efectuada la tñición, se procedió a desteñir los geles a 26°C con una solución lavadora (metanol 50% y ácido acético 10%) durante 4 h en constante agitación y después con una segunda solución lavadora (metanol 5% y ácido acético 7%) hasta hacer evidentes los patrones obtenidos.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET): Los duplicados de los geles obtenidos y no tñidos, se transfirieron a papel de nitrocelulosa (PN)^b en una cámara de transferencia^c utilizando una solución amortiguadora (Tris base 0.3%, glicina 1.5% y metanol 20%) y una corriente de 2 amperes durante 1 h. La solución amortiguadora se mantuvo en agitación constante, utilizando un sistema refrigerante para mantener la temperatura a 4°C (24,66).

Posteriormente, con el fin de bloquear la adsorción inespecífica, se procedió a incubar el PN con una solución de albúmina al 0.3% en SAF-Tween 20^d (0.1%) durante 12 h a 4°C. En forma simultánea y para comprobar que la transferencia de las fracciones separadas por EGPA-DSS se ha efectuado, se pro-

- a. Bio Rad Protean, dual vertical slab. Gel electrophoresis cell. Bio Rad Lab. 32 ND & Griffin Av. Richmond, Cal. 94804 USA.
- b. SNC. Pure nitrocellulose BA-85, 0.45 μ m pore size. Schleicher & Schwell Inc. Keene N.H. 03431 West Germany.
- c. TE series transport electrophoresis unit. Hoefer Scientific Instruments. 654 Minnesota St., Sn. Pco. 94107 USA.
- d. Polioxietilenesorbitan monolaurato.

cedió a teñir el gel por la técnica arriba descrita.

Una vez transcurrida la incubación con la solución de albúmina, se lavó el PN utilizando la solución SAF-Tween 20 (0.1%) con 3 cambios durante 30', para después enfrentarlo a un suero hiperimmune anti M. bovis BCG ó M. tuberculosis H37Rv durante 3 h a 26°C en agitación constante. Posteriormente, se lavó el PN en la forma antes descrita y se enfrentó a un complejo Proteína A-Biotina* durante 1 h a 26°C (la Proteína A actuó como segundo anticuerpo). Efectuado esto, se lavó nuevamente el PN en la forma ya mencionada.

Realizado lo anterior, el PN se enfrentó a un complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa* durante 30' a 26°C y después se lavó 2 veces con SAF-Tween 20 (0.1%) 10' cada una y en seguida con SAF por 10' para eliminar el Tween 20. Finalmente, para revelar las fracciones transferidas al PN, se empleó como sustrato una solución con 30 mg de 4-cloro-1-naftol en 10 ml de metanol y 50 ml de SAF con 0.1% de peróxido de hidrógeno al 30% hasta hacer evidentes las proteínas a las que se fijaron los anticuerpos del suero hiperimmune. La reacción se detuvo con agua corriente al ocurrir lo anterior.

*. Biotinylated Protein A and Biotin-Streptavidin system. Amersham International plc. White Lion Road, Amersham Buckinghamshire, England, HP7 9LL.

RESULTADOS.

Los resultados que se muestran son el producto de 4 experimentos realizados por duplicado.

En la tabla no. 1 se pueden observar las concentraciones de proteína aproximadas ($r=0.96$) en los DPPb analizados las cuales se expresan en miligramos por mililitro (mg/ml). El contenido mínimo encontrado fué de 0.82 mg/ml en la muestra -- no. 1 y el máximo de 2.67 mg/ml en la no. 8.

La fotografía y diagrama no.1 muestran los electroferotipos obtenidos de los DPPb por medio de EGPA-DSS. Es posible observar en ellos la presencia de 4 bandas cuyos PM aproximados ($r=0.96$) fueron de 98, 65, 63 y 53 Kd y que se designaron A, B, C y D respectivamente.

El resultado del análisis antigénico de los electroferotipos, realizado por medio de IET empleando el suero inmune anti M. bovis BCG avirulenta, se muestra en la fotografía y diagrama no. 2. En estos, se puede apreciar con mayor claridad las bandas encontradas en EGPA-DSS así como algunas diferencias pues unicamente las muestras 2, 5, 6 y 8 presentaron un patrón de bandas similar al obtenido en EGPA-DSS. En las muestras 1, 3 y 4 las bandas B y C desaparecieron y solo se puede ver la banda D en ellas. En la muestra no. 7 desapareció la -- banda A y se presentaron la B, C y D (tabla no. 2).

De la misma forma, al utilizar el suero inmune anti M. tuberculosis H37Rv virulenta en la IET, se obtuvieron los resultados que aparecen en la fotografía y diagrama no. 3. En este caso el patrón de bandas es más intenso, siendo diferente en todas las muestras a su respectivo electroferotipo. Aquí -- desapareció la banda A de las muestras 5, 6, 7 y 8 y la banda C en todas. Las bandas B y D se hicieron evidentes en las muestras no. 1, 2, 4, 5, 7 y 8. En las muestras 2, 3, 4 y 7 se ma-

nifestaron 2 nuevas bandas, denominadas E y F con PM aproximado ($r=0.96$) de 60 y 24 Kd respectivamente. La banda E también se hizo evidente en la muestra no. 1 y la no. 6 solo presentó la banda B (tabla no. 2). En el último carril (no. 9 no señalado) se observa el patrón característico de un extracto de proteínas de secreción provenientes de un cultivo no sometido a calor de M. tuberculosis H₃₇Rv (virulenta).

En el experimento testigo realizado para descartar el pegaje inespecífico empleando un suero normal de conejo, no se hizo evidente marca alguna (datos no mostrados).

DISCUSION.

Se sabe que en el proceso de elaboración del DPPb se producen pérdidas de proteína por la aplicación de calor (100°C para la inactivación del M. bovis), la autólisis de cultivos viejos y el empleo de ácido tricloroacético o sulfato de amonio para la precipitación de las tuberculoproteínas, situaciones que pueden originar variaciones en su composición de forma similar a lo que ocurre con el DPPh (16,18,26).

Diferencias en la concentración de proteína como las encontradas en este trabajo, así como la heterogeneidad de los electroferotipos obtenidos en la EGPA-DSS sugieren: a) diferente proceso de elaboración, b) variaciones en el mismo proceso, c) alteraciones en los productos empleados para su conservación y almacenamiento y d) diferencias en las cepas de M. bovis utilizadas. Varios autores han señalado que el contenido de proteínas en el DPP puede ser diferente de un lote a otro, por lo que solo puede ser evaluado y homogeneizado en su actividad biológica misma que esta relacionada con su actividad inmunológica (1,21,22,23).

Lepper y col.(40) demostraron en 1979 (en Australia) que la reacción al DPPb de animales infectados naturalmente -- con M. bovis, varía en intensidad de una región a otra, por lo que se requiere de diferentes concentraciones de proteína para inducir una respuesta que pueda ser evaluada y reproducible. -- Por otro lado, Francis y col.(22) mencionan que el contenido de tuberculoproteínas en el DPPb es un factor determinante en la sensibilidad y especificidad de la PT.

La heterogeneidad de los electroferotipos obtenidos no puede ser atribuida a la técnica de EGPA-DSS pues se observa que los marcadores de PM no muestran alteración alguna, se

encuentran en posición correcta y la cantidad de proteína fué la misma en todas las muestras (60 μ g cada una). Desafortunadamente, no se encontraron informes de otros trabajos con los -- que puedan compararse los electroferotipos obtenidos (ver fotografía y diagrama no. 1). Los datos existentes a la fecha solo se refieren a estudios realizados con el DPPH que se obtiene a partir de M. tuberculosis (2,3).

En los electroferotipos mostrados se aprecian componentes de alto PM (>20 Kd), así como fracciones que probablemente resultan de la hidrólisis que ocurre durante la elaboración del producto y se hacen evidentes en forma discreta al -- ser teñidas con un colorante para proteínas, como el azul de Coomassie, a lo largo del recorrido de las muestras por el gel (fotografía y diagrama no. 1). Esta situación no mejoró con el uso de una tinción más sensible como la de plata (datos no mostrados).

Cabe señalar que Affronti y col.(3) fraccionaron al DPPH por EGPA observando la presencia de varios componentes, -- encontrando la mayor actividad tuberculínica en las eluciones de las porciones con 15% de acrilamida que estimaron corresponder a fracciones de bajo PM (<10 Kd). Augier y Augier-Gibory, también por EGPA, observaron variaciones en los componentes -- del mismo DPPH de una preparación a otra (6).

El estudio antigénico de los electroferotipos, realizado con el suero inmune anti M. bovis BCG, evidenció más claramente las bandas A, B, C y D, lo que resulta lógico pues la IET es una técnica más sensible (<1 pg de proteína). Sin embargo, se observó que la presencia de esas bandas en algunas -- muestras no correspondió a lo encontrado en EGPA-DSS por la ausencia de hasta 3 de ellas (tabla no. 2). Esto pudo deberse a

una cantidad insuficiente de proteína en la muestra incapaz de reaccionar con el antisuero ó a diferencias en el proceso de elaboración, envasado, almacenamiento o cepa de M. bovis utilizada, pues no se descarta la posibilidad de alteraciones en -- bacterias mantenidas permanentemente bajo condiciones de laboratorio (15).

En el estudio antigénico realizado con el suero inmune anti M. tuberculosis H37Rv, se observó la desaparición de -- las bandas A y C probablemente porque no son reconocidas por -- el suero o porque no estan en cantidad suficiente para reaccionar con el. También se observa la aparición de las bandas E y F que indican la presencia de otras moléculas antigénicas que probablemente aún en pequeñas cantidades reaccionan con el --- antisuero. El reconocimiento de las bandas B y D sugieren la -- presencia de antígenos comunes en ambas bacterias que se pueden evidenciar por esta técnica. Cabe señalar que los estudios realizados por inmunolectroforesis en el DPPH han ofrecido in -- formación limitada como lo indican Ma y Daniel así como Turcotte y Boulanger (44,67).

Aún así, varios investigadores han logrado encontrar componentes de bajo PM en el DPPH con evidente actividad en la PT (2,3,16,29). Otros por el contrario, describen a los de alto PM como los principales inductores de la reacción tuberculínica (3,16,44).

Si se consideran las características que debe poseer un componente para ser inmunogénico, es probable que la reacción de HMC que se manifiesta en bovinos infectados con el --- M. bovis, sea producida por tuberculoproteínas de alto PM como los observados en este trabajo y que los de bajo PM sean responsables de las reacciones inespecíficas como lo sugieren los

estudios realizados por Ma y Daniel y Affronti y col. en el -- DPPh (3,44). Así mismo, probables variaciones en la antigenicidad de los componentes del DPPb como las mostradas aquí, pueden originar alteraciones en la respuesta a la tuberculina, ya que los electroferotipos obtenidos aunque similares resultaron antigenicamente diferentes.

Es interesante señalar que la banda B de este trabajo, posiblemente se encuentra relacionada con un componente de PM similar (63 Kd) descrito por Huesca y col.(34), Morales y col.(49) y Mondragón y col.(48) encontrado en proteínas de secreción de M. tuberculosis y en pacientes con tuberculosis causada por la misma micobacteria. Este componente soportó más de 100°C/1 h y resistió los procesos degradativos de una línea de macrófagos de origen murino. Así mismo, Emmrich y col.(19) informaron del aislamiento y clonación de una proteína de 64 Kd a partir de extractos de M. bovis BCG, hecho que puede llegar a constituirse en una importante herramienta en la producción de reactivos específicos para el diagnóstico de tuberculosis y en la elaboración de nuevas vacunas contra esta zoonosis.

Cabe mencionar también que existe información de otros métodos en la producción del DPPh que han dado buenos resultados y que pueden ser empleados en la producción del DPPb. Así, Choi y col.(10) informan de la producción de DPP a partir de cultivos de M. bovis inactivados con fenol con resultados satisfactorios. Stanford y col.(62) elaboraron una tuberculina empleando ultrasonificados de M. ulcerans que aunque contiene antígenos compartidos por el género Mycobacterium, son más ricos que los DPP tradicionales en antígenos específicos, pues se evita la desnaturalización de proteínas durante su elaboración. Por otro lado, el aislamiento de antígenos específicos como el

obtenido por Yano y col. a partir de M. bovis BCG por técnicas cromatográficas también podrían contribuir al mejoramiento de la prueba (69). Esto es esencial, pues Rook y Stanford demostraron en ratones consanguíneos (BALB/c) inoculados con varias especies de micobacterias, que la HMC es causada al menos por 2 reacciones inmunológicas distintas llamadas por ellos reacción tipo Listeria y reacción tipo Koch, concluyendo que algunas especies del grupo MOTT tienden a producir la primera y bacilos tuberculosos (M. tuberculosis, M. bovis) la segunda (59). Hay que señalar, sin embargo, que los compuestos del bacilo tuberculoso para la PT en humanos producidos con tecnologías de recombinación genética, no brindaron los resultados esperados al ser evaluados en personas DPP positivas como lo informan To ida y col. (65).

Como se observa, existen en la actualidad metodologías utilizables en la producción de DPP, que disminuyen las posibilidades de desnaturalización protéica. Consideramos que el mejoramiento en la elaboración y evaluación del DPPb en nuestro país será un factor determinante en el éxito de programas de control y erradicación de tuberculosis bovina, pues el DPPb ha dado buenos resultados cuando se ha utilizado adecuadamente y los esfuerzos encaminados a su substitución por otras pruebas no han brindado los resultados deseados como lo informan varios autores (55,63,67).

CONCLUSION.

Se concluye que la heterogeneidad de los electroferotipos y las diferencias antigénicas observadas en los DPPb analizados por EGPA-DSS e IET en este estudio pueden contribuir a la presentación de reacciones inespecíficas en la PT in vivo - que se realiza en bovinos en la República Mexicana.

Pensamos que sería interesante realizar, con los productos aquí estudiados, pruebas in vivo para relacionar los resultados observados con pruebas de intradermorreacción.

LITERATURA CITADA

1. Affronti, L.F., Lind, A., Ouchterlony, O., Ridell, M. and Wisingerova, E.: An evaluation of the polyacrylamide gel electrophoresis fractionation method for the production of Mycobacterium tuberculosis skin test preparations I. Production, physicochemical characterization and serological analyses. J. Biol. Stand., 14:177-186 (1986).
2. Affronti, L.F., Bentson, M.W., Lind, A., Magnusson, M., Ouchterlony, O., Ridell, M. and Wisingerova, E.: An evaluation of the polyacrylamide gel electrophoresis fractionation method -- for the production of Mycobacterium tuberculosis skin test preparations II. Comparative skin testing on guinea-pigs. J. Biol. Stand., 14:187-200 (1986).
3. Affronti, L.F., Grow, L., Ouchterlony, O., Lind, A. and Norlin, M.: Fractionation of the international standard tuberculin, -- PPD-S. Am. Rev. Res. Dis., 79:893 (1971).
4. American Thoracic Society: The tuberculin skin test. Am. Rev. Res. Dis., 124:356-363 (1981).
5. Angus, R.D.: Production of reference PPD tuberculins for veterinary use in the United States. J. Biol. Stand., 6:221-227 (1978).
6. Augier, J. et Augier-Gibory, S.: Analyse électrophoretique bidimensionnelle en gel de polyacrilamide des tuberculoprotéines présentes dans l'IP48 et dans diverses autres préparations de PPD. Ann. Inst. Pasteur, 116:713-726 (1969).
7. Centro Panamericano de Zoonosis: Preparación y estandarización de tuberculina PPD. Org. Panam. de la Salud, Nota Técnica 17, Rev. 1, Buenos Aires 1980.
8. Chaparas, S.D.: Immunity in tuberculosis. Bull. World Health Org., 60:447-462 (1982).
9. Chase, M.W. and Williams, C.A.: Chemical analyses A. Protein - analyses. In: Immunology and Immunochemistry. (Eds. Chase, M.W. and Williams, C.A.), 2nd Ed. vol. II, pp. 273-275. Academic Press Inc., New York 1968.
10. Choi, C.S., Frost, A.J., Francis, A.J. and Francis, J.: Specificity of PPD extracts from cultures of mycobacteria killed by

- phenol. Res. Vet. Sci., 31(3):284-288 (1981).
11. Coates, A.R.M., Allen, B.W., Hewitt, J., Ivanyi, J. and Mitchinson, D.A.: Antigenic diversity of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis detected by means of monoclonal antibodies. Lancet, 2:167-169 (1981).
 12. Collins, C.H. and Grange, J.M.: A review: The bovine tubercle bacillus. J. Appl. Bacteriol., 55:13-29 (1983).
 13. Corner, L.A. and Pearson, C.W.: Pathogenicity for cattle of atypical mycobacteria isolated from feral pigs and cattle and the correlation of lesions with tuberculin sensitivity. Aust. Vet. J., 54:280-286 (1978).
 14. Corner, L.A. and Pearson, C.W.: Response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria of bovine origin. Aust. Vet. J., 54:379-382 (1978).
 15. Crowle, A.J., Tsang, A.Y., Vatter, A.E. and May, M.H.: Comparison of 15 laboratory and patient-derived strains of Mycobacterium avium for ability to infect and multiply in cultured human macrophages. J. Clin. Microbiol., 24(5):812-821 (1986).
 16. Daniel, T.M. and Janicki, B.W.: Mycobacterial antigens: A review of their isolation, chemistry and immunological properties. Microbiol. Rev., 42:84-113 (1978).
 17. Dirección General de Economía Agrícola: Estadísticas del subsector pecuario de los Estados Unidos Mexicanos. Subsecretaría de Agricultura y Operación. SARH., México 1981.
 18. Editorial: New tuberculins. Lancet, 1(8370):199-200 (1984).
 19. Emmrich, F., Tholf, J., van Embden, J. and Kaufmann, S.H.E.: A recombinant 64 kilodalton protein of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin specifically stimulates human T₄ clones - reactive to mycobacterial antigens. J. Exp. Med., 163:1024-1029 (1986).
 20. Ferriol, F.R., Pérez, J., González, E., Delgado, L. y González, J.A.: Relación entre el número de la reacción alérgica y el porcentaje de detectabilidad de tuberculosis bovina. Rev. Cub. Cienc. Vet., 13:137-142 (1982).

21. Francis, J., Choi, C.L. and Frost, A.J.: The diagnosis of tuberculosis in cattle with special reference to bovine PPD tuberculin. Aust. Vet. J., 49:246-251 (1973).
22. Francis, J., Seiler, R.J. and Frost, A.J.: The efficiency and dose of bovine PPD tuberculin. Aust. Vet. J., 54:44-46 (1978).
23. Francis, J., Seiler, R.J., Wilkie, I.W., O'Boyle, D., Lumsden, M.J. and Frost, A.J.: The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. Vet. Rec., 103:420-425 (1978).
24. Gershoni, J.M. and Palade, G.E.: Review. Protein blotting: --- principles and applications. Anal. Biochem., 131:1-15 (1983).
25. Good, R.C.: Nontuberculous mycobacteria. Clin. Microbiol. News letter, 1:1-4 (1979).
26. Goren, M.B.: Immunoreactive substances of mycobacteria. Am. -- Rev. Res. Dis., 125:50-59 (1982).
27. Grange, J.M.: Mycobacterial diseases. (Current topics in infection, No.1), The Pittman Press, London, 1980.
28. Gillespie, J.H. and Timoney, J.F.: Hagan and Bruner's Infectious diseases of domestic animals. 7th. ed. Cornell University Press., USA, 1981.
29. Gupta, K.G. and Landi, S.: Isolation of tuberculin peptides -- from tuberculin purified protein derivative (PPD). Can. J. Microbiol., 24:1242-1249 (1978).
30. Kantor, I.N. and Roswurm, J.D.: Mycobacteria isolated from nasal secretions of tuberculin test reactor cattle. Am. J. Vet. Res., 39:1233-1234 (1978).
31. Kostiala, A.A.I., Lefford, M.J. and McGregor, D.D.: Immunological memory in tuberculosis II. Mediators of protective immunity, delayed hypersensitivity and macrophage migration inhibition in central lymph. Cell. Immunol., 41:9-19 (1978).
32. Haslov, K., Bentzon, M.W. and Moller, S.: Comparisons in sensitized and unsensitized guinea-pigs of tuberculin PPD₃ RT23 and PPD-M by skin tests. Effect of immunization time. J. Biol. ---

Stand., 14:143-152 (1986).

33. Huesca, M y Goodsaid, Z.F.: Taxón: Un programa en basic para el desarrollo de clasificaciones taxonómicas a partir de información densitométrica. Aplicación a la taxonomía del género -- Mycobacterium. IV Congreso Nacional de Inmunología. Memorias, ref. 085, México, Octubre 1985.
34. Huesca, M., Sada, E. and Goodsaid, Z.F.: Detection of Mycobacterium tuberculosis antigens in immune complex isolated from patients with pulmonary tuberculosis. 6th International Congress of Immunology. Toronto, Canada. Abstracts, ref. 2.76.3. July 1986.
35. Hurltel, B., Hurltel, M. and Lagrange, P.H.: Time course and - histological differences between sheep red blood cells and tuberculin DTH reactions in mice. Ann. Immunol., 135C:219-230 (1984).
36. Laemmlí, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685 (1970).
37. Leslie, I.W., Hebert, C.N., Burn, K.J., McClancy, B.N. and Donnelly, W.J.C.: Comparison of the specificity of human and bovine tuberculin PPD for testing cattle. Vet. Rec., 96:332-334 (1975).
38. Lepper, A.W.D.: The use of bovine PPD tuberculin in caudal fold test. Aust. Vet. J., 53:451-452 (1977).
39. Lepper, A.W.D., Corner, L.A. and Pearson, C.W.: Serological responses in experimental bovine tuberculosis. Aust. Vet. J., 53:301-305 (1977).
40. Lepper, A.W.D., Carpenter, M.T., Williams, O.J., Scanlan, W.A., McEwan, D.R., Andrews, L.G., Thomas, T.R. and Corner, L.A.: Comparison of the efficiency of two doses of bovine PPD tuberculin in single caudal fold tests on Australian cattle. Aust. Vet. J., 55:251-256 (1979).
41. Lepper, A.W.D., McKay, D.J. and Lord, V.: Comparison of the efficiency of 4 doses of bovine PPD tuberculin in cattle and guinea-pigs: recommendations for the most suitable dose for --

- use in the single caudal fold test in cattle. Aust. Vet. J., - 55:507-513 (1979).
42. Little, T.W.A. and Naylor, P.F.: The development of an indirect migration inhibition test for use in cattle using tuberculosis as a model. Br. Vet. J., 133:374 378 (1977).
 43. López, M.E.: México leyes y decretos. Legislación vigente en materia de salubridad y disposiciones conexas. S.S.A., México 1971.
 44. Ma, Y. and Daniel, T.M.: Immunochemical analyses of tuberculin purified protein derivative with special reference to United States-Japan antigen 7. J. Infect. Dis., 148:500-509 (1983).
 45. Mandell, G.L., Douglas, R.G. and Bennett, J.E.: Principles and practice of infectious diseases. John Wiley & Sons, Inc., USA 1979.
 46. McMurray, D.N. and Echeverri, A.: Cell-mediated immunity in allergic patients with pulmonary tuberculosis. Am. Rev. Res. Dis. 118:827-834 (1978).
 47. McMurray, D.N. and Yetley, E.A.: Cell-mediated immunity in malnourished Guinea-pigs after Mycobacterium bovis vaccination. - Infect. Immun., 35(3):909-914 (1982).
 48. Mondragón, V., Sada, E. and Goodsaid, Z.F.: Mycobacterium tuberculosis secretion proteins and selectively bound by macrophages & accumulated in monocytes isolated from patients with pulmonary tuberculosis. 6th International Congress of Immunology. Toronto, Canada. Abstracts, ref. 2.76.4. July 1986.
 49. Morales, S., Sada, E. and Goodsaid, Z.F.: Mycobacterium tuberculosis antigens which discriminate between sera from patients with pulmonary tuberculosis & healthy subjects in immunoblots. 6th International Congress of Immunology. Toronto, Canada. Abstracts, ref. 2.76.5. July 1986.
 50. Moulton, R.G., Dietz, T.M. and Marcus, S.: Isolation of specific and nonspecific components from purified protein derivative. Am. Rev. Res. Dis., 106:213-218 (1972).
 51. Myers, J.A. and Steele, J.H.: Bovine tuberculosis: control in man and animals. Warren H. Green Inc., USA 1969.

52. O'Reilly, L.M. and MacClancy, B.N.: Estimation of the sensitivity, specificity and predictive value of the intradermal tuberculin test. Irish Vet. J., 32:127-128 (1978).
53. Pelletier, M., Forget, A., Bourassa, D. and Skamene, E.: Histological and immunopathological studies of delayed hypersensitivity reaction to tuberculin in mice. Infect. Immun., 46(3):---873-875 (1984).
54. Quezada, F.P.: Diagnóstico inmunológico de la tuberculosis. Salud Pública Méx., 25:601-611 (1983).
55. Radunz, B.L.: Observations on the short thermal tuberculin test. Aust. Vet. J., 61(6):195 (1984).
56. Ranadive, S.N., Bhattacharya, S., Kale, M.K. and Bhattacharya, A.: Humoral immune response in tuberculosis: initial characterization by immunoprecipitation of ¹²⁵Iodine labelled antigens and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Clin. Exp. Immunol., 64:277-284 (1986).
57. Reichman, L.B.: Tuberculin skin test; the state of the art. -- Chest, 76(6 suppl.):764-770 (1979).
58. Rojas-Espinoza, O.: Anticuerpos antimicrobianos en la tuberculosis. I. La prueba de contrainmuno-electroforesis (CIE). Rev. Invest. Clin., 30:121-126 (1978).
59. Rook, G.A.W. and Stanford, J.L.: The relevance to protection -- of the three forms of delayed skin-test response induced by -- M. leprae and other mycobacteria in mice. Parasite. Immunol., 1:111-123 (1979).
60. Secretaría de Salubridad y Asistencia: Programa nacional de -- control de la tuberculosis. Direc. Gral. de Control de la Tuberc. y Enf. del Ap. Resp., México 1977.
61. Snider, D.E.: The tuberculin skin test. Am. Rev. Res. Dis., -- 125:108-118 (1982).
62. Stanford, J.L., Revill, W.D.L., Gunthorpe, W.J. and Grange, J. M.: The production and preliminary investigation of Burulin, a new skin-testing reagent for M. ulcerans infection. J. Hyg., 74:7-16 (1975).

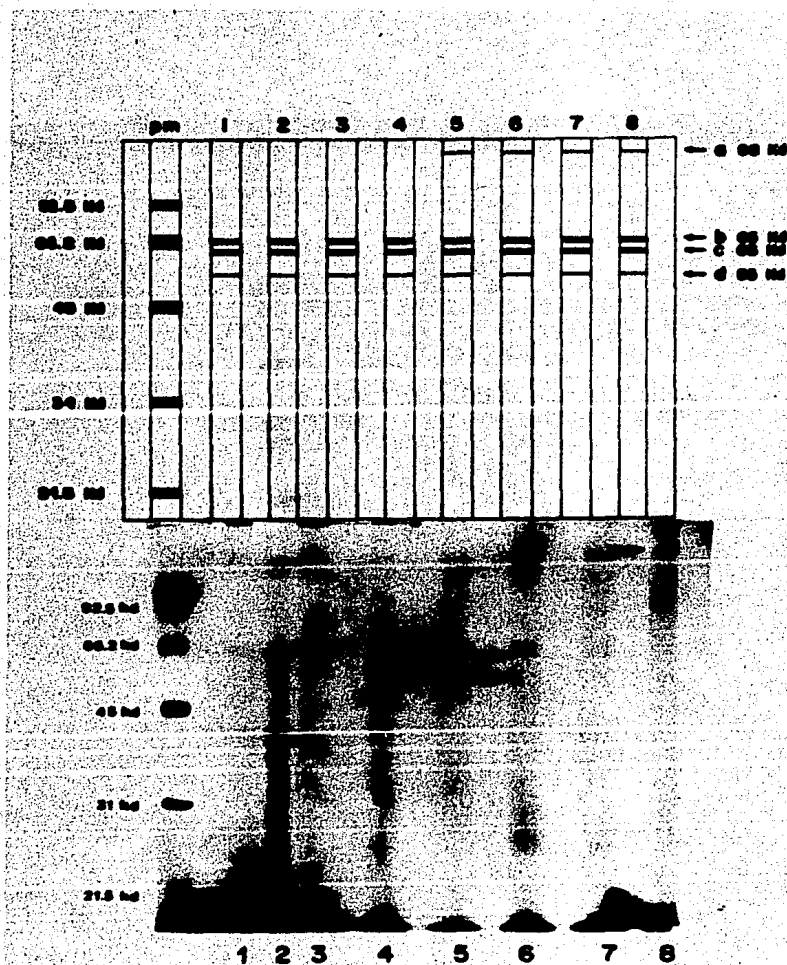
63. Timms, L.M.: Correlation of the lymphocyte transformation, leucocyte migration inhibition and the delayed hypersensitivity tests in chickens sensitized to Mycobacterium tuberculosis. -- Res. Vet. Sci., 27:347-353 (1979).
64. Tizard, I.R.: An introduction to veterinary immunology. 2nd. - Ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1982.
65. Toida, I., Yamamoto, S., Takuma, S., Suzuki, T. and Hirata, M.: Lack of tuberculin activity of synthetic peptides. Infect. Immun., 50(3):614-619 (1985).
66. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76:4350-4354 (1979).
67. Turcotte, R. and Boulanger, R.P.: Comparison between the antigenic components extracted from virulent and avirulent strains of mycobacteria. Can. J. Microbiol., 17:95-100 (1971).
68. Wright, G.L., Affronti, L.F. and Reich, M.: Characterization and comparison of mycobacterial antigens by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Infect. Immun., 5:482-490 (1972).
69. Yano, O., Toizumi, S. and Sudo, T.: Properties of TAS-1D3, a tuberculin-active substance from BCG, in regard to delayed hypersensitivity. Microbiol. Immunol., 28(10):1149-1157 (1984).
70. Yugi, H. and Nosaki, G.: Serological diagnosis of bovine tuberculosis. Am. J. Vet. Res., 33:1377-1384 (1972).

TABLA No. 1

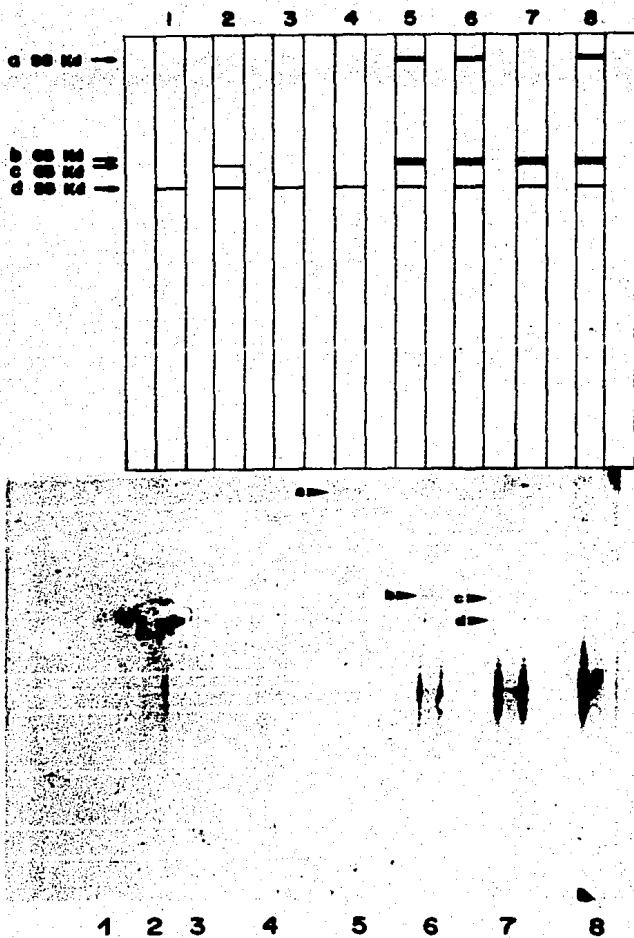
MUESTRAS		CONTENIDO DE PROTEINA (mg/ml)
LOTE No.	IDENTIFICACION	
A 18-08-85	1	0.82
A 45-10-84	2	1.81
A 45-10-84	3	1.56
A 18-07-84	4	2.00
A 45-10-84	5	1.38
A 39-10-81	6	1.76
A 45-10-84	7	1.50
A 30-09-81	8	2.67

TABLA No. 2

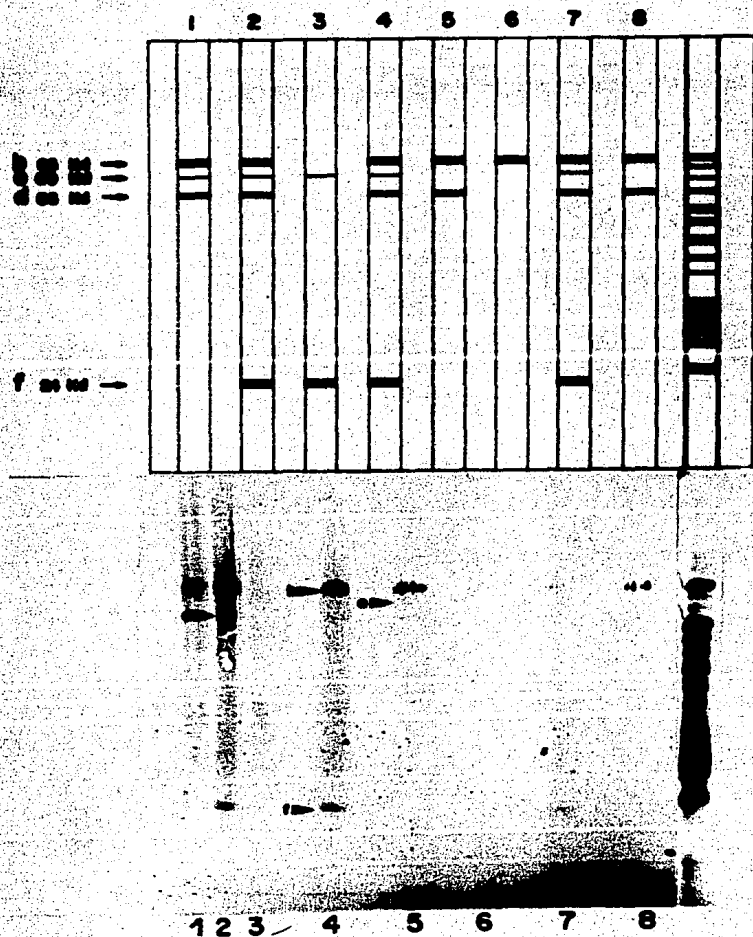
BANDAS OBSERVADAS EN CADA EXPERIMENTO			
MUESTRAS	TINCION CON AZUL DE COOMASIE	IET CON ANTISUERO ANTI- <i>M. bovis</i>	IET CON ANTISUERO ANTI- <i>M. tuberculosis</i>
1	B, C y D	D	B, D y E
2	B, C y D	B, C y D	B, D, F y E
3	B, C y D	D	F y E
4	B, C y D	D	B, D, F y E
5	A, B, C y D	A, B, C y D	B, D, F y E
6	A, B, C y D	A, B, C y D	B
7	A, B, C y D	B, C y D	B, D, F y E
8	A, B, C y D	A, B, C y D	B y D



Fotografía y diagrama No. 1 Electroferotipos de las muestras estudiadas obtenidos por EGPA-DSS.



Fotografía y diagrama No. 2 IET realizada con el suero inmune anti-M. bovis BCG.



Fotografía y diagrama No. 3 IET realizada con el suero inmune anti-M. tuberculosis H₃₇Rv.