

Universidad Nacional Autónoma de México  
FACULTAD DE CIENCIAS



TIPIFICACION SEROLOGICA DE MUESTRAS  
DE Mycobacterium tuberculosis.

T E S I S  
Que Para Obtener el Título de;  
B I O L O G O  
P r e s e n t a

MARCO ANTONIO MARTINEZ AVILA

México, D. F.

1978



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., bajo la dirección del Dr. Carlos Larralde Rangel, y el asesoramiento del M.C. Héctor Barbosa Nájera, a quienes agradezco su desinteresada ayuda y colaboración para el desarrollo de esta tesis.

Revisada y aprobada por

DRA. ELVIRA ESTRADA FLORES.

BIOL. LEONOR PERALTA.

Con cariño

a mis padres

MA. CARLOTA AVILA DE M.

JOSE MARTINEZ AMEZQUITA.

A mi abuelita

MA. ANA MONROY DE E.

A mis hermanos

CARLOS

LETICIA

ANA EDITH

GABRIELA

MIRIAM.

A la memoria de mi abuelito

JOSE MARTINEZ CASTILLO

A

TERESITA CASTILLO PATT.

## C O N T E N I D O

	Pág.
INTRODUCCION.....	7
DISEÑO.....	21
MATERIAL Y METODOS.....	23
RESULTADOS.....	39
DISCUSION.....	57
CONCLUSIONES.....	61
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	65

## Introducción

El objetivo de esta tesis es realizar una tipificación serológica de cepas de Mycobacterium tuberculosis, aisladas recientemente de pacientes tuberculosos en nuestro País. La tipificación se hará por medio de pruebas homólogas y cruzadas, entre las fracciones antigénicas extraídas de cada una de las muestras y sus respectivos antisuecos en doble inmunodifusión. Las fracciones antigénicas presentes en la mayor parte de las cepas serán empleadas posteriormente en el montaje de un método de diagnóstico de la tuberculosis, que sea sensible, rápido y específico. Los actuales métodos no cumplen con estas especificaciones, además de que algunos son costosos y en otros se corre el riesgo de la diseminación del bacilo ( 17, 31 ), por lo que son poco aplicables a grandes poblaciones humanas para fines epidemiológicos y de diagnóstico.

La necesidad de optimizar los métodos de diagnóstico de la tuberculosis emerge de la importancia que esta enfermedad tiene en la salud pública nacional, como se demuestra en los datos epidemiológicos que siguen.

### Panorama Epidemiológico de la Tuberculosis.

De 1960 a 1975, la tuberculosis ocupó del 7o. al 15o. lugar en la lista de morbilidad\* entre las enfermedades transmisibles ( Cuadro I ) ( 4, 19, 20 ) y del 1o. al 4o. lugar en la lista de mortalidad \*\* por enfermedades transmisibles ( Cuadro II ) ( 4, 19, 20 ).

En la gráfica 1 aparecen señalados los datos anuales de casos de tuberculosis pulmonar registrados desde 1961 hasta 1975, en ella se pueden apreciar ascensos notables en 1963 y 1971, con 17,501 y 18,499 casos registrados respectivamente ( 4, 19, 20 ). El promedio de casos en ese lapso de 15 años es de 14,743 casos anuales. La tendencia general de la curva es oscilante por lo que no se puede evaluar el descenso de casos en los años subsecuentes a 1975. En la misma gráfica 1, aparecen los datos anuales de defunciones por tuberculosis pulmonar, comprendidos de 1961 hasta 1974, en la que se aprecia un ligero incremento de defunciones por esta enfermedad ( 4, 19, 20 ). El promedio resultante en ese lapso de 14 años es de 7,381 defunciones anuales.

\* Morbilidad: Número de enfermos entre 100,000 habitantes

\*\* Mortalidad: Número de defunciones entre 100,000 habitantes

C a d e r o

Instituto de Estadísticas Nacionales

1968	1967		1966		1965		1964		1963		1962		1961		Cob.
	Case	Mortality													
22.7	68,808	139.9	71,116	137.2	64,161	140.5	65,725	137.5	61,021	139.4	67,103	138.1	69,731	137.1	16.5
51.4	69,459	111.9	73,716	147.1	57,864	138.7	71,166	143.0	67,654	142.6	73,668	139.3	81,691	131.5	56.8
112.0	62,714	119.1	61,969	101.9	47,949	152.4	46,544	87.4	38,268	91.5	50,554	95.6	54,881	117.8	15.6
73.2	67,234	144.9	61,211	88.1	61,716	136.6	37,464	96.3	37,061	83.4	36,895	50.2	34,111	117.6	16.9
53.2	65,383	117.8	52,117	91.3	61,871	126.4	46,219	87.8	37,563	55.9	37,116	57.9	40,937	91.6	14.9
68.3	29,817	14.1	19,219	49.7	29,816	53.9	17,197	44.3	19,132	29.3	12,799	26.5	16,719	117.2	11.3
47.8	18,374	32.8	31,155	31.4	19,679	59.7	20,117	42.9	14,714	47.6	21,605	51.0	19,581	45.1	15.1
28.4	16,143	24.6	14,661	17.5	16,764	46.5	14,179	43.7	16,115	39.8					
24.8	12,199	27.2	11,711	41.9	17,041	41.7	15,946	19.4	13,694	27.5	14,197	26.4	14,304	117.2	11.6
							13,206	44.1			12,244	29.5			
													16,163	16.4	16.7
															168.1

131042

6

4 276 10/10/67



->

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Wirtschaft per Unternehmen (Wirtschaftsplan)

Jahre	1947		1948		1949		1950		1951		1952		1953	
	Ergebnisse	Marktanteil												
4.5	-0.78	18.1	7.107	18.1	7.958	20.0	7.604	19.1	8.954	18.0			10.111	23
10.0	6.714	18.1	8.445	17.8	8.814	18.0	9.924	17.0	7.917	14.1	8.400	13.0	7.841	17

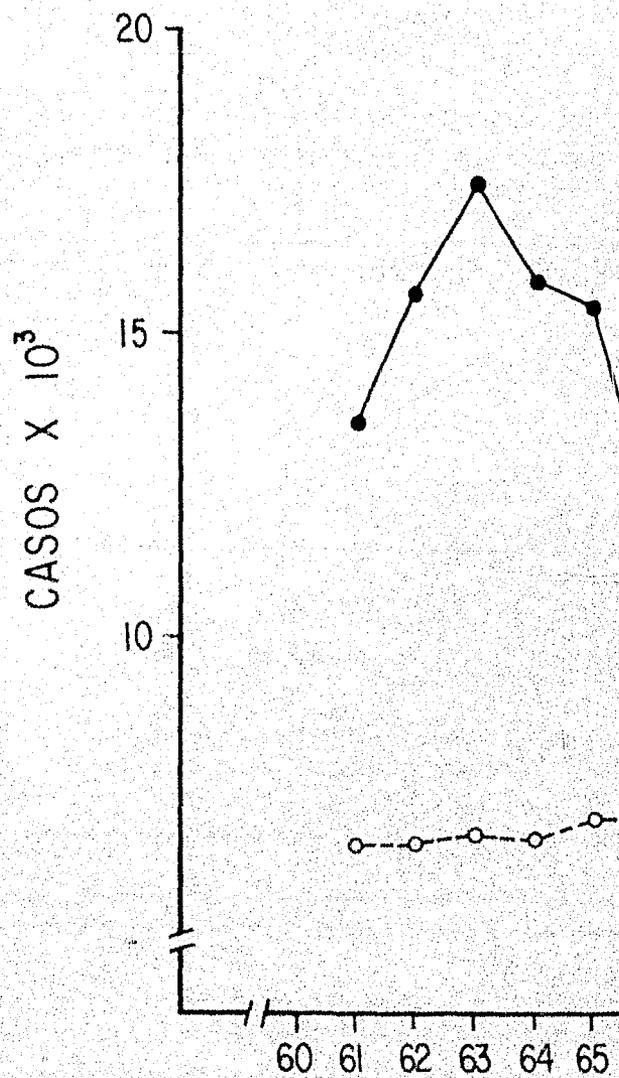
1970	1971		1972		1973		1974	
	Definitives	Montants	Definitives	Montants	Definitives	Montants	Definitives	Montants
31.5			31.504	11.9				
34.1								
102.4	19.337	226.5	69.944	147.9	148.321	105.9	37.942	11.4
17.1	7.659	16.4	4.724	24.8	9.844	16.4	7.944	11.8

## Cuadro III

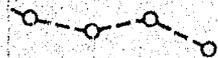
Datos de Casos, Morbilidad, Defunciones y Mortalidad por tuberculosis pulmonar en los Estados Unidos Mexicanos de 1960 a 1975.

Año	Casos	Morbilidad	Defunciones	Mortalidad
1960	--	34.8	--	--
1961	13,500	37.3	6,739	18.6
1962	15,733	42.0	6,754	18.1
1963	17,501	45.3	6,885	17.8
1964	15,834	39.6	6,814	17.0
1965	15,496	37.5	7,036	17.0
1966	12,131	28.4	7,057	16.5
1967	14,305	32.2	6,920	15.6
1968	13,800	30.1	7,845	17.1
1969	15,033	31.7	7,955	16.8
1970	15,663	31.9	8,434	17.2
1971	18,499	36.4	7,829	15.4
1972	17,766	33.7	7,774	14.8
1973	13,577	24.9	7,806	14.3
1974	11,345	20.1	7,486	12.9
1975	10,964	18.2	--	--
Total	221,147	524.1	103,334	229.1
$\bar{X}$	14,743	32.8	7,381	16.4

Datos tomados de la Salud Pública de México ( Marcial, 1972; Bulnes,1977)



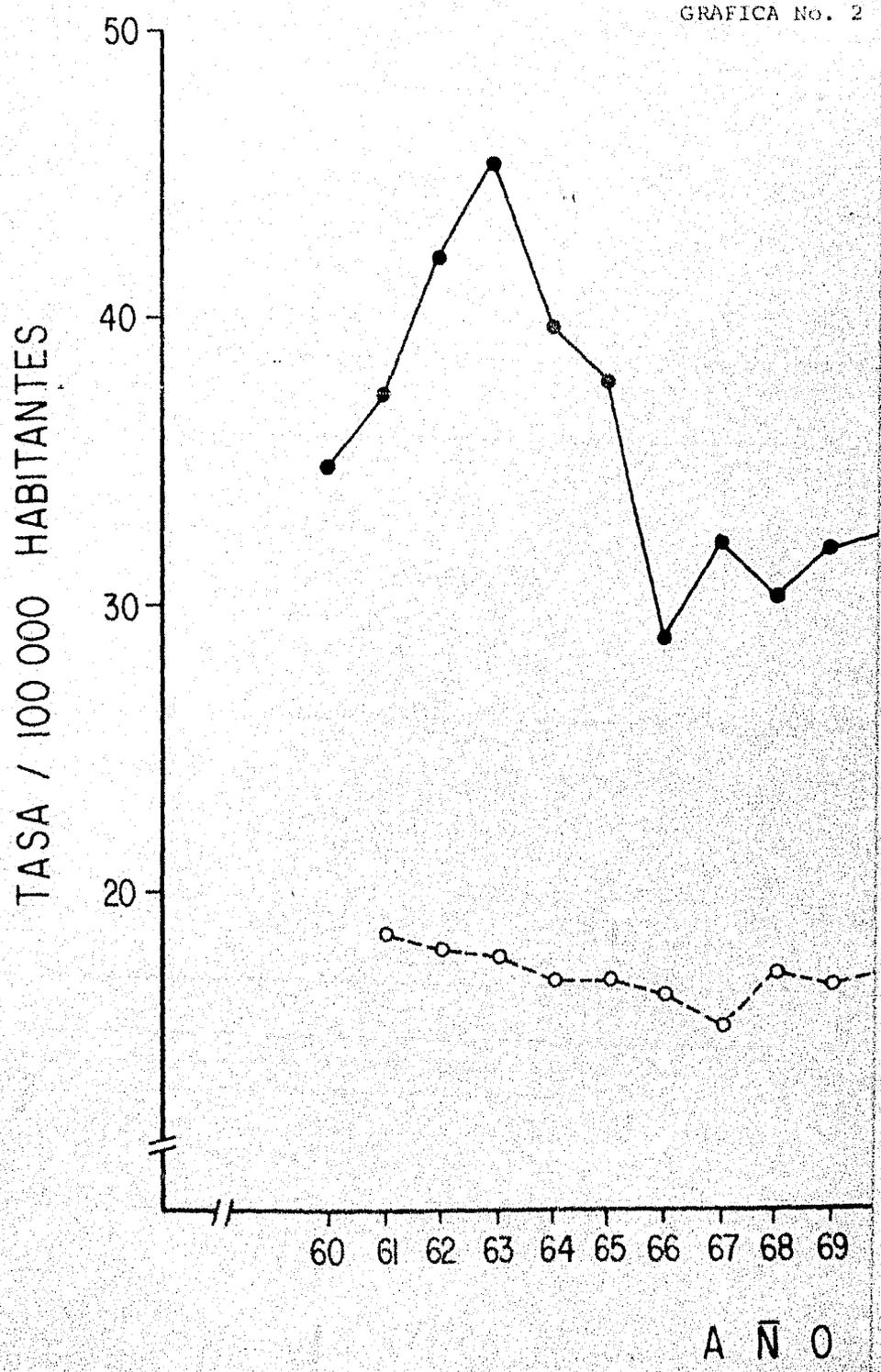
71 72 73 74 75 76 77

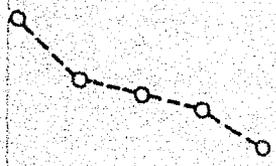
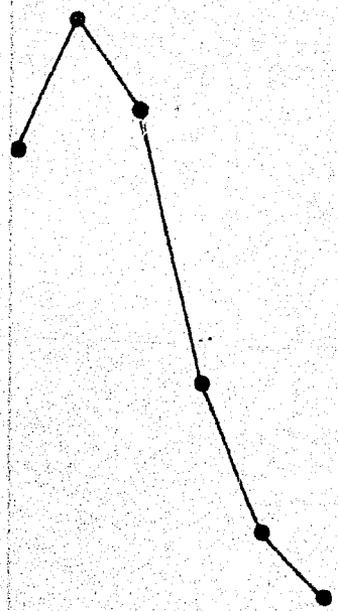


En la gráfica 2, aparecen los datos de morbilidad anual de la tuberculosis pulmonar, registrados de 1960 a 1975 ( 4, 19, 20 ). El promedio obtenido en éstos 16 años es de 32.8 casos en 100,000 habitantes anualmente, y en ellos se puede observar una tendencia hacia la disminución de la morbilidad, según lo ilustra la pendiente de la curva (  $-1.2$  ). En la gráfica 2 aparecen además los datos de mortalidad anual por tuberculosis pulmonar, registrados de 1961 a 1974, ( 4, 19, 20 ). El promedio obtenidos en éstos 14 años es de 16.4 defunciones en 100,000 habitantes anualmente, y la tendencia de la curva es hacia la disminución de la mortalidad con una pendiente de  $-0.33$ .

El Cuadro IV muestra las cifras de casos, morbilidad, defunciones y mortalidad por tuberculosis pulmonar en cada entidad federativa, para los años 1971, 1973 y 1975 ( 4, 19, 20 ), en la que se puede observar que los estados más afectados para esos años son: Veracruz, Chiapas, Chihuahua, Nuevo León, San Luis Potosí, Coahuila y Baja California Sur. En este mismo cuadro, se puede observar que en algunos estados el número de defunciones por tuberculosis excede al número de casos de la misma, lo que indica la inadecuada captación de casos y muertes ocurridos en cada localidad, y por lo tanto la escasa confiabilidad de las cifras expresadas.

GRAFICA No. 2





70 71 72 73 74 75 76 77

## Cuadro IV

	1971				1973		
	Casos	Morbi- lidad	Defun- ciones	Morta- lidad	Casos	Morbi- lidad	Defun- ciones
Aguascalientes	75	21.1	42	11.8	41	10.8	23
Baja California	852	90.7	209	22.3	498	47.7	194
B. Cal. Terr.	235	171.8	35	25.6	103	68.6	26
Campeche	119	44.6	43	16.1	36	12.4	36
Coahuila	797	69.3	310	27.0	712	59.4	294
Colima	125	49.0	67	26.3	103	37.3	73
Chiapas	1,191	73.1	380	23.3	1,065	61.0	410
Chihuahua	1,088	64.8	356	21.2	1,352	76.1	335
Distrito Federal	1,102	15.2	775	10.7	750	9.7	599
Durango	227	23.4	120	12.4	176	17.4	107
Guanajuato	245	10.4	144	6.1	250	10.0	176
Guerrero	773	46.3	194	11.6	952	53.6	183
Hidalgo	364	29.7	279	22.7	216	17.0	311
Jalisco	674	19.6	289	8.4	517	14.1	268
México	423	9.9	272	6.4	333	6.8	373
Michoacán	992	41.4	285	11.9	516	20.5	251
Morelos	166	25.2	68	10.3	87	12.0	90
Nayarit	180	31.5	109	19.1	174	28.4	103
Nuevo León	2,313	127.7	325	17.9	1,414	71.1	363
Oaxaca	460	20.5	275	12.2	267	11.3	276
Puebla	340	13.1	295	11.4	330	12.1	379
Querétaro	353	69.4	100	19.7	56	10.3	124
Quintana Roo	4	4.2	11	11.5	29	26.9	3
San Luis Potosí	515	39.0	404	30.6	419	30.4	405
Sinaloa	745	55.4	241	17.9	583	39.8	205
Sonora	599	51.9	279	24.2	246	19.9	272
Tabasco	653	79.7	127	15.5	131	14.6	129
Tamaulipas	731	47.6	400	26.1	639	38.7	423
Tlaxcala	65	15.0	56	12.9	45	10.0	33
Veracruz	2,077	51.8	1,119	27.9	1,505	35.0	1,165
Yucatán	14	1.8	127	16.2	25	3.1	103
Zacatecas	2	0.2	93	9.6	7	0.7	74
Total	18,499	36.4	7,829	15.4	13,577	24.9	7,806

1975

Morta- lidad	Casos	Morbi- lidad	Defun- ciones	Morta- lidad
6.1	6	1.4	30	7.4
18.6	217	18.2	195	17.2
17.3	69	40.3	25	15.3
12.4	56	17.4	38	12.3
24.5	1,007	77.3	283	22.2
26.4	37	12.1	58	19.6
23.8	832	44.3	381	20.9
18.9	1,098	56.4	338	17.9
7.7	470	5.5	542	6.5
10.6	91	8.3	115	10.7
7.0	249	9.1	159	6.0
10.3	453	23.2	170	9.0
24.4	170	12.3	279	20.7
7.3	254	6.3	286	7.3
7.6	295	5.1	435	8.0
10.0	383	14.0	251	9.4
12.4	56	6.8	88	11.2
16.8	122	18.0	105	16.0
18.2	593	26.5	334	15.6
11.7	380	16.8	356	15.8
13.9	326	11.0	365	12.6
22.9	83	13.9	100	17.2
2.8	14	11.4	11	9.5
29.4	520	34.9	341	23.4
14.0	250	15.2	214	13.6
22.0	204	14.9	199	15.0
14.4	232	23.0	106	11.0
25.6	459	25.1	349	19.8
7.3	17	3.5	25	5.2
27.1	1,929	40.6	1,134	24.7
12.6	91	10.3	119	13.9
7.4	1	0.1	55	5.2
14.3	10,964	18.2	7,486	12.9

### Tipificación Serológica de Micobacterias.

La tipificación serológica implica la agrupación de individuos, tejidos ó células de acuerdo a características antigénicas comunes.

Los estudios de clasificación serológica realizados en cepas de micobacterias ó géneros relacionados, se utilizan principalmente - como un criterio más en la ubicación correcta de las especies ( 17 ), - dado que por otros criterios ( morfológicos, bioquímicos ó fisiológicos) resulta difícil clasificarlas, sobre todos aquellas denominadas micobacterias atípicas. Estos trabajos se emplean además para establecer relaciones entre virulencia y tipo serológico, con aplicaciones en el diagnóstico de la tuberculosis ( 26 ).

Pocos estudios de tipificación serológica se han llevado a cabo en una especie determinada de micobacterias. Las especies más estudiadas son M. tuberculosis, ( 34 ) y M. avium ( 7 ). Los polisacáridos y nucleoproteínas de M. tuberculosis y BCG fueron muy similares - serológicamente cuando se hicieron reaccionar por Inmunodifusión ( ID ) e Inmunoelectroforesis ( IEF ). Los antígenos de varias cepas de M. tuberculosis y M. bovis dieron reacciones cruzadas con cada uno de los sueros antipolisacáridos.

Existe una gran cantidad de bibliografía acerca de la tipificación serológica de micobacterias, sin embargo la diversidad de las técnicas empleadas para dicho fin las hace poco comparables entre sí. Por ejemplo, de acuerdo a la fracción empleada en las pruebas de tipificación se pueden agrupar en tres clases:

A) Las que utilizan antígenos presentes en el citoplasma bacteriano ( 6, 15, 23 ).

B) Las que utilizan antígenos obtenidos de membrana plasmática y principalmente de pared celular ( 3, 10, 12, 13, 30, 35 ).

C) Las que emplean exoantígenos encontrados en el medio de cultivo como producto de autólisis bacteriana, en forma de filtrado crudo, tuberculoproteína ó PPD ( 5, 11, 14, 18, 22, 28, 29 ).

Los métodos de extracción de antígenos en los estudios serológicos son también muy variados. En el trabajo de Sir ( 28 ), los polisacáridos fueron extraídos con urea; Bojallil ( 3 ) extrajo y purificó polisacáridos con hidrólisis alcalina y solventes orgánicos, respectivamente; Schaefer ( 24 ) inactivó las cepas por calor y obtuvo fracciones

con metanol caliente; Kwapinski ( 14, 15 ) inactivó las cepas con formaldehído.

La inmunización de animales de laboratorio se efectúa con fracciones antigénicas ( 14, 15 ) ó con bacilos intactos.

Las pruebas inmunológicas empleadas en la tipificación de micobacterias son igualmente muy variadas, algunas de éstas son:

- 1) Inmunodifusión ( 14, 15, 21 ) ;
- 2) Inmunolectroforesis;
- 3) Inmunolectroforesis bidimensional ( 1, 2 ) ;
- 4) Electroforesis en patrones discontinuos ( 1, 2 ) ;
- 5) Fijación de complemento ( 7, 13, 27, 33 ) ;
- 6) Aglutinación ( 30 ) ;
- 7) Schultz-Dale ( 8, 9 ).

Los estudios de tipificación serológica más completos son - los realizados por Kwapinski ( 14, 15 ) con antígenos citoplásmicos - de 79 cepas de micobacterias hechos reaccionar por doble inmunodifusión ( DID), frente a 15 antisueros; obtuvo, 17 grupos de citoplasmas

con uno a tres determinantes antigénicos para un serogrupo. Kwapinski informa de una buena correlación entre serogrupos citoplásmicos y los grupos ó especies distinguidos morfológica, cultural, bioquímica ó fisiológicamente ( Cuadro V ).

Como puede verse, no existen criterios uniformes para la tipificación serológica dentro del grupo de las micobacterias, lo que las hace poco comparativas entre sí.

En vista de la escasa sistematización en la clasificación de micobacterias y de que tal vez éstas varíen con distintas regiones geográficas y con el tiempo, nosotros simplemente evaluaremos en cepas mexicanas obtenidas recientemente la presencia de cuando menos un sistema antigénico común, con el fin de utilizarlo en el montaje de un método diagnóstico más sensible y rápido que los existentes.





## Diseño

1 Se obtuvieron las fracciones antigénicas ( proteínas, lípidos y polisacáridos ) de 10 cepas de bacilo de la tuberculosis recojidas recientemente ( 1975 ) por el IMSS.

2 Se obtuvieron antisueros de ratón Balb C, contra cada una de las 10 cepas de M. tuberculosis ( Sueros experimentales ).

3 Se obtuvieron gama globulinas de borrego dirigidas contra una cepa de referencia usada mundialmente, M. tuberculosis H37 Rv.

4 Se hicieron reaccionar en DID todas las fracciones antigénicas frente a todos los antisueros de ratón, y frente a las gama globulinas de borrego anti-M. tuberculosis H37 Rv, como se ilustra en el cuadro VI.

5 Se hicieron reaccionar en IEF, todas las fracciones antigénicas frente a todos los sueros de ratón y frente a las gama globulinas de borrego anti-M. tuberculosis H37 Rv.

6 La frecuencia y distribución de reacciones positivas entre las pruebas homólogas y heterólogas ( Cuadro VI ), sirvieron para determinar las relaciones antigénicas entre las 10 cepas de M. tuberculosis estudiadas.

C u a d r o VI

Diseño experimental. Reacciones de antisueros de ratón y gama globulinas de borrego anti-M. tuberculosis H37 Rv en contra de las fracciones antigénicas de las cepas de M. tuberculosis estudiadas.

Antisero de ratón contra la cepa 1	Antisero de ratón contra la cepa 4...	Antisero de ratón contra la cepa 50.	Gama globulinas de borrego contra <u>M. tuberculosis</u> H37 Rv
---------------------------------------	--	---	---

Fraciones antigénicas  
de la cepa 1

Fraciones antigénicas  
de la cepa 4...

Fraciones antigénicas  
de la cepa 50.

Ver lista de cepas de M. tuberculosis en la página 31

## Material y Métodos.

### A. Crecimiento y cosecha de las cepas de M. tuberculosis.

1A. Se obtuvieron cincuenta cepas de M. tuberculosis aisladas de cincuenta pacientes tuberculosos del Centro Médico Nacional, IMSS, en medio de Lowenstein Jensen.

2A. Se resembraron en tubos de ensayo, conteniendo 7 ml de medio enriquecido de Dubos. Se incubaron a 37° C durante dos semanas, para facilitar su adaptación al medio líquido.

3A. Se resembraron las cepas, cada una en dos matraces, con medio de cultivo sintético de PEY y, conteniendo un trozo de madera de balsa estéril de 1 cm por lado. Sobre la madera se depositaron algunas gotas del medio de cultivo de Dubos con las bacterias en suspensión, para permitir así el crecimiento del bacilo en la superficie del líquido nutritivo. Se incubaron los matraces a 37° C durante dos meses, al cabo de los cuales, apareció una colonia color amarillo paja de aspecto rugoso de micobacterias.

4A. Las colonias sobrenadantes del paso anterior, se resembraron en tres matraces conteniendo 100 ml de PBY, incubándose a 37° C durante dos meses, hasta crecimiento total.

5A. Al final se cosecharon únicamente 26 cepas por filtración en papel Wathman 4, lavando las micobacterias con buffer de fosfatos salina (PBS), pH 7.0, hasta eliminar totalmente el medio de cultivo, el cual se desechó.

B. Desengrasado y lisis del bacilo.

1B. Se desengrasaron 10 de las 26 cepas cosechadas del paso 5A. Esto se realizó resuspendiendo un paquete celular de tres gramos de peso húmedo aproximadamente, de cada cepa, en 100 ml de una mezcla metanol-acetona (3; 1 v/v) a 4° C durante 72 horas.

2B. Las bacterias desengrasadas fueron cosechadas nuevamente por filtración en papel Wathman 4 y lavadas con PBS, hasta obtener un filtrado transparente, el cual se desechó junto con el filtrado de metanol-acetona.

3B. El paquete celular desengrasado y lavado de cada cepa se resuspendió en 30 ml de PBS y se sometió a ultrasonido con un sonicador Branson modelo B-12, en períodos alternos de un minuto de ultrasonido con un minuto de resceso, hasta completar 15 minutos de sonicación efectiva. La temperatura de la mezcla se controló con un baño de acetona y hielo seco. Todo este proceso se realizó en una campana con luz ultravioleta, para eliminar los bacilos presentes en los aerosoles formados durante la sonicación.

C. Obtención de fracciones antigénicas.

( Cuadro VII )

1C. Las bacterias lisadas por sonicación, se centrifugaron a 12,000 g a 4° C durante 30 minutos, para separar los restos celulares y las bacterias enteras del sobrenadante conteniendo los antígenos solubles del citoplasma.

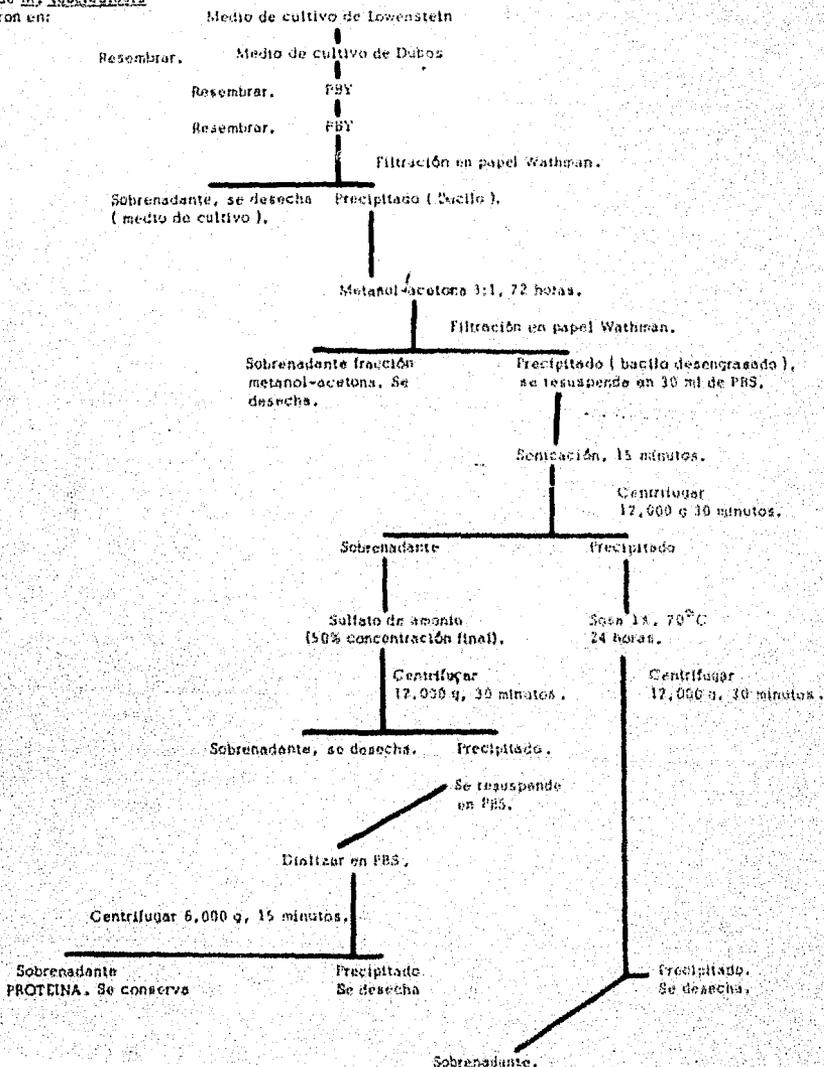
2C. Del sobrenadante del paso anterior se precipitaron las proteínas con una solución saturada de sulfato de amonio, hasta alcanzar una concentración final de 50% de sal. Se centrifugó esa mezcla a 12,000 g a 4° C durante 30 minutos para separar las proteínas precipitadas, las cuales se resuspendieron y dializaron en PBS hasta la eliminación completa de sulfato de amonio. El sobrenadante se desechó. El volumen final de PBS conteniendo las proteínas fue de 5 ml, se envasó y almacenó a 0° C. A esta preparación se le designó Fracción Protéica ( Pr ), y se empleó como antígeno en las pruebas de DID e IEF.

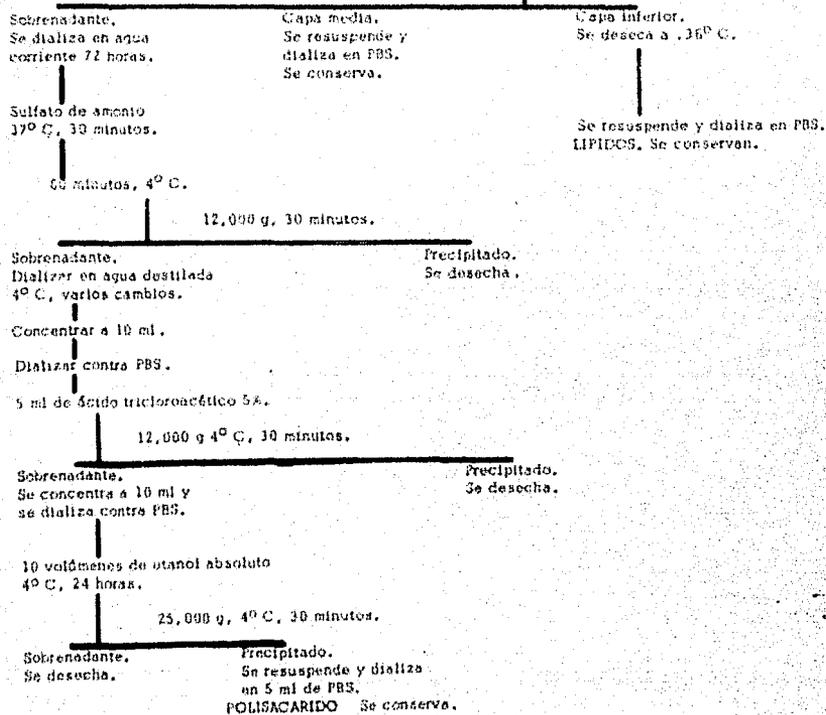
3C. El precipitado del paso 1C, conteniendo restos celulares y bacterias completas, se resuspendió en 100 ml de gosa al 1% y se colocó en un baño de temperatura constante a 70° C durante 24 ho-

C u a d r o VII

Cuadro de Extracción de Antígenos de *M. tuberculosis*.

cepas de *M. tuberculosis* tuvieron en:





Todos estos pasos se siguieron en cada una de las 10 muestras de M. tuberculosis estudiadas.

ras, con agitación (3). Se obtuvo una mezcla homogénea, producto de la hidrólisis alcalina y, esta mezcla se centrifugó a 12,000 g a 4° C durante 30 minutos.

4C. El sobrenadante del paso anterior se dializó contra agua corriente a temperatura ambiente, 18° C, durante 72 horas. Posteriormente se concentró a 10 ml por pervaporación a temperatura ambiente.

5C. A la preparación del paso anterior se le eliminaron los lípidos y proteínas por el método de Sevag (1934), agregándole igual cantidad de una mezcla de cloroformo-butanol (9:1 v/v) en un embudo de separación y con agitación constante durante un minuto. Se centrifugó a 12,000 g durante 15 minutos, formándose tres capas, la superior conteniendo polisacáridos, la intermedia de aspecto lechoso conteniendo proteínas desnaturadas, y la inferior (cloroformo-butanol) conteniendo sustancias lipídicas.

6C. La capa superior del paso anterior se dializó contra agua corriente a temperatura del laboratorio, durante 72 horas y se desproteinizó, agregando igual volumen de una solución saturada de sulfato

to de amonio a 37° C durante 30 minutos. Después se colocó a 4° C durante 60 minutos y se centrifugó a 12,000 g durante 20 minutos, para separar las proteínas precipitadas. El sobrenadante se dializó contra agua corriente, a 4° C durante 72 horas. Posteriormente se concentró a 10 ml y se le agregó 5 ml de ácido tricloroacético al 5%. La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 12,000 g, a 4° C durante 15 minutos. El sobrenadante se dializó contra PBS y se concentró a 10 ml.

7C. El sobrenadante del paso anterior, libre de lípidos y proteínas, de aspecto cristalino, conteniendo los polisacáridos fué tratado con 10 volúmenes de etanol absoluto frío, dejando la mezcla reposar durante 24 horas a 4° C. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 25,000 g, durante 30 minutos a 4° C. El sedimento se disolvió en 5 ml de PBS, con diálisis intensiva en PBS. Este sedimento se almacenó y designó: Fracción Polisacárida ( Ps ). Al igual que las proteínas del paso 2C, se empleó el Ps como antígeno en las pruebas de inmunodifusión.

8C. La capa intermedia del paso 5C, se desecó a temperatura ambiente, se resuspendió y dializó en PBS. Se almacenó.

9C. La capa inferior del paso 5C, se evaporó a 35°C, el precipitado se resuspendió y dializó en PBS. A esta parte se le designó Fracción Lipídica ( LI ), y se almacenó para ser usada -- como antígeno en las pruebas de inmunodifusión.

## D. Lista de Cepas

La extracción de las fracciones antigénicas se realizó únicamente en 10 cepas, las cuales se designaron con la letra C seguido de números arábigos, éstas fueron:

Cepa No.	Clave	del	IMSS
C-1	10 79 58 ES		24 IV 75
C-4	10 73 21 ES		16 IV 75
C-10	10 84 09 ES		30 IV 75
C-12	10 97 58 ES		
C-20	10 76 59 ES		21 IV 75
C-21	11 25 88 ES		27 VI 75
C-31	11 18 59 ES		18 VI 75
C-33	11 31 37 LPS		1 VIII 75
C-45	11 96 29 ES		30 IX 75
C-50	161 E		

De cada una de ellas se obtuvieron tres fracciones ( proteínas, Pr ; polisacáridos Ps; y lípidos Li ), lo que da un total de 30 fracciones antigénicas.

#### E. Determinación de Proteínas.

La determinación de la cantidad de proteínas se llevó a cabo por medio de la técnica de Kjeldahl (36).

#### F. Determinación de Polisacáridos.

La determinación de polisacáridos se llevó a efecto por medio del método de Fenol-Sulfúrico. ( Dubois, 1956; 37 ).

#### G. Determinación de lípidos.

La determinación de los lípidos totales se llevó a cabo por medio de la técnica de Zöllner y Kirch, ó reacción de sulfofosfo-vainillina, (SPV). ( 39 ).

H. Obtención de sueros de ratón anti M. tuberculosis

( Sueros experimentales )

1H. Se formaron 11 lotes con 5 ratones Balb C por lote.

2H. Cada lote se inmunizó con una de las 10 cepas empleadas como fuente de antígeno, dejando un lote testigo.

3H. Los ratones recibieron dos inmunizaciones con 0.5 mg de M. tuberculosis muerto por calor, mezclado en 0.4 ml de adyuvante incompleto de Freund, por vía subcutánea, con un intervalo de 15 días entre las dos inmunizaciones. Quince días después, cada ratón recibió una tercera estimulación con .1 mg de bacilo en 0.2 ml de PBS, por vía subcutánea.

4H. Se sangraron los ratones 8 días después de la última inmunización. Se separó y congeló el suero para ser usado posteriormente en las pruebas de inmunodifusión, contra las fracciones antigénicas obtenidas en C.

I. Obtención de gama globulinas de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv

II. Se inmunizó un borrego con 5 mg de M. tuberculosis H37 Rv, en 1 ml de adyuvante incompleto de Freund, por vía intramuscular.

2I. 6 meses después se dió un segundo estímulo con la misma dosis de bacilo y adyuvante.

3I. 3 meses después se sangró el borrego y se separó el suero del que se purificaron las inmunoglobulinas por precipitación con sulfato de amonio, las que se usaron posteriormente, en las pruebas de inmunodifusión.

J. Doble inmunodifusión.

1J. Las pruebas de DID se realizaron por medio de la técnica de Ouchterlony (39) utilizando agar fundido al 1% en PBS, pH 7.0.

2J. Se colocaron las fracciones antigénicas obtenidas de las cepas de M. tuberculosis en los pozos periféricos y los antisueros en el pozo central, hasta llenarlos de tal manera que se realizaron todas las combinaciones posibles entre los sueros dirigidos contra las 10 cepas de M. tuberculosis y sus respectivas fracciones antigénicas como se ilustra en la fotografía 3.

3J. Se guardaron los geles en cámaras húmedas a temperatura ambiente durante 72 horas.

4J. Después de ese tiempo se observaron macroscópicamente las bandas de precipitación por medio de luz indirecta con fondo oscuro.

5J. Se tñieron las bandas con azul Coomassie.

## K. Inmunolectroforesis

1K. Se colocaron 4 ml de agar fundido al 1% con buffer de boratos pH 8.6 por cada portaobjetos.

2K. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y guardó en cámara húmeda a 4° C durante 12 horas.

3K. Se horadó para inmunolectroforesis ( dos orificios ).

4K. En los orificios se colocaron las fracciones antigénicas de M. tuberculosis.

5K. Se colocó la placa en la cámara de IEF con buffer de boratos pH 8.6 y con papel filtro se formaron los puentes entre las placas y el buffer.

6K. Se corre durante 30 minutos con 250 voltios.

7K. Pasado ese tiempo se hace un canal de 2 x 70 mm entre los dos orificios donde se habían colocado los antígenos.

8K. En los canales se colocaron los sueros de ratón ó borrego.

9K. Posteriormente se colocó la placa en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 48 horas.

10K. Se observaron las bandas de precipitación por medio de luz indirecta.

11K. Se lavaron las placas y se colorearon con azul de Coomassie.

L. Coloración de las bandas de inmunoprecipitado

1L. Se lavaron las placas con cambios continuos de PBS durante tres días.

2L. El último cambio se hizo con agua destilada durante treinta minutos.

3L. Se cubrieron las placas con papel filtro y secaron a temperatura ambiente.

4L. Posteriormente se cubrieron con azul de Coomassie 1% en solución acuosa de ácido acético al 7% durante 10 minutos.

5L. Se decoloraron con ácido acético al 10%.

### Resultados.

El el cuadro VIII aparecen las cantidades de proteínas, polisacáridos y lípidos obtenidos en las fracciones antigénicas correspondientes a cada una de las 10 cepas tratadas. Se puede observar que el rendimiento de proteínas y polisacáridos en algunas cepas, fué muy bajo, ( cepas 12 33 y 50 ) y que la fracción identificada por nosotros como lípidos no contuvo cantidades de tectables de lípidos en la técnica empleada.

Las concentraciones finales de todas las fracciones antigénicas, se ajustaron a 2 y a 4 mg/ml para las pruebas de Inmuno-difusión.

## C u a d r o   V I I I

Cantidades de proteínas , polisacáridos y lípidos  
correspondientes a las 10 cepas estudiadas .

Cepa	Proteínas en mg.	Polisacá- ridos	Lípidos
C-1	14.0	5.1	---
C-4	9.9	4.4	---
C-10	4.6	4.1	---
C-12	3.5	2.3	---
C-20	9.8	13.9	---
C-21	8.3	9.1	---
C-31	8.0	7.2	---
C-33	3.3	2.2	---
C-45	7.0	9.7	---
C-50	2.0	1.0	---

Fraciones Protéicas. - En el cuadro IX aparecen los resultados de las reacciones de DID, entre los sueros experimentales y testigo, frente a las fracciones protéicas de las 10 cepas de M. tuberculosis estudiadas. La concentración de cada fracción protéica fué de 2 mg/ml. Como se ve, los sueros que más reacciones positivas dieron, fueron el 4 y el 31. Las fracciones protéicas que más resultados positivos presentaron, fueron las de las muestras 1, 20 y 31. No se obtuvieron reacciones homólogas positivas a excepción de la 1 y 31. En general los datos sugieren una pobre respuesta inmune de los ratones con el esquema de inmunización empleado.

En el cuadro XX, aparecen los resultados de las reacciones de DID, entre los sueros experimentales y testigo, frente a todas las fracciones protéicas de las muestras de M. tuberculosis estudiadas. La concentración de cada fracción fué de 4 mg/ml. En todos los sueros, a excepción del suero 33, se obtuvieron resultados positivos. El suero 31 fué el que presentó más reacciones positivas. Las fracciones protéicas de las muestras 12, 33 y 50, no reaccionaron frente a los sueros experimentales. La fracción de la muestra 31, fué la que reaccionó con más número de sueros experimentales. Las pruebas homólogas 1 y 31 - fueron las únicas que reaccionaron positivamente.

C u a d r o IX

Cuadro de resultados de DID de las fracciones protéicas ( 2 mg/ml )  
frente a sueros experimentales de ratón.

	S-1	S-4	S-12	S-20	S-21	S-31	S-33	S-45	S-50	S-T
C-1	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
C-4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-10	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
C-12	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
C-20	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
C-21	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
C-31	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
C-33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-45	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
C-50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S: Antisuero experimental de ratón.

C u a d r o X

Cuadro de resultados de DID de las fracciones protéicas ( 4 mg/ml )

frente a sueros experimentales de ratón.

	S-1	S-4	S-12	S-20	S-21	S-31	S-33	S-45	S-50	S-T
C-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C-4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C-10	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
C-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-20	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
C-21	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
C-31	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C-33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-45	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
C-50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S: Antisuero experimental de ratón.

En el cuadro XI, aparecen los resultados de las pruebas de IEF de las fracciones protéicas ( 4 mg/ml ) de 9 cepas de M. tuberculosis, frente a 5 sueros experimentales, suero testigo y gama globulinas de borrego inmunizado con M. tuberculosis, H37 Rv. En ésta se apreció que las gama globulinas reaccionaron positivamente frente a todas las reacciones protéicas, a excepción de la fracción protéica de la muestra 12. El suero experimental 1, no reaccionó en ninguna combinación. Los sueros 4 y 21 reaccionaron con la mayoría de las fracciones protéicas. En las fotografías 1 y 2, aparecen los resultados de IEF, entre las fracciones protéicas ( 4 mg/ml ) de las cepas 1, 4, 20 y 21, y las gama globulinas de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv, en las que se aprecia una sola banda de precipitado, desplazada hacia el cátodo.

En la fotografía 3, aparecen las bandas de precipitación en un sistema de DID, entre las fracciones protéicas ( 4 mg/ml ) de 9 muestras de M. tuberculosis, frente a gama globulina de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv. En todos los casos los resultados son positivos -- apreciándose una banda de identidad entre las fracciones protéicas.

C u a d r o X I

Cuadro de resultados de IEF de las fracciones protéicas ( 4 mg/ml ) frente a sueros experimentales de ratón y gama globulina de borrego anti M.tuberculosis H37 Rv .

	S-1	S-4	S-12	S-20	S-21	Gama globulinas	S-T
C-1	-	+	+	+	-	++	-
C-4	-	+	-	+	-	++	-
C-10	-	+	-	-	+	++	-
C-12	-	+	-	-	-	--	-
C-20	-	-	-	-	+	++	-
C-21	-	+	+	-	+	++	-
C-31	-	+	+	-	+	++	-
C-45	-	-	-	-	+	++	-
C-50	-	-	-	-	-	++	-

46

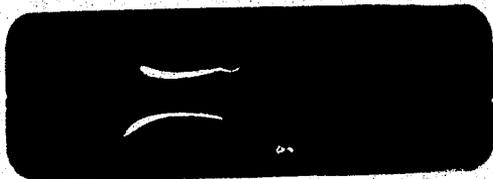
Pr 1



Pr 4

Fotografía 1

Pr 20



Pr 21

Fotografía 2

En las fotografías 1 y 2, aparecen los resultados de IEF, entre las fracciones protéicas (4 mg/ml) de las cepas 1, 4, 20 y 21, y las gamma globulinas de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv. En éstas se aprecia una sola banda de precipitado desplazada hacia el cátodo.

Pr 50

Pr 1

Pr 4

Pr 45



Pr 10

Pr 33

Pr 12

Pr 31

Pr 21

Pr 20

Fotografía 3

Resultados de DID. Pozos periféricos con fracciones protéicas (4 mg/ml). Pozo central con gama globulinas de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv. Obsérvese una banda de identidad entre todas las cepas.

Fracciones de polisacáridos.- En el cuadro XII, se señalan los resultados de las reacciones de DID, entre los sueros experimentales y el suero testigo, frente a las fracciones de polisacáridos --- ( 2 mg/ml ) , de las 10 cepas estudiadas de M. tuberculosis. Aparecen reacciones positivas en los sueros 1, 45 y 50. La mayoría de las fracciones de polisacáridos, dieron una ó dos reacciones positivas a excepción de los polisacáridos de las cepas 4, 33 y 50. No se observaron reacciones homólogas positivas.

En el cuadro XIII, aparecen los resultados de las reacciones de DID, de los sueros experimentales y del suero testigo, frente a todas las fracciones de polisacáridos ( 4 mg/ml ) de las cepas de M. tuberculosis estudiadas. Sólo se obtuvieron resultados positivos en los sueros 12, 21 y 31. En las fracciones de polisacáridos en las cepas 4, 31 y 50. En general los resultados de las reacciones fueron negativos.

C u a d r o XII

Cuadro de resultados de DID de las fracciones de polisacáridos ( 2 mg/ml )  
frente a sueros de ratón, experimentales y testigo.

	S-1	S-4	S-12	S-20	S-21	S-31	S-33	S-45	S-50	S-T
C-1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
C-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-10	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C-12	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C-20	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C-21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-31	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C-33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-45	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C-50	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

C u a d r o XIII

Cuadro de resultados de DID de las fracciones de polisacáridos ( 4mg/ml ),  
a los sueros de ratón, experimentales y testigo.

	S-1	S-4	S-12	S-20	S-21	S-31	S-33	S-45	S-50	S-T
C-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-4	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
C-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-31	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
C-45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-50	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

En el cuadro XIV, aparecen los resultados de las pruebas de IEF de las fracciones de polisacáridos ( 4 mg/ml ), de 9 muestras de M. tuberculosis, frente a 5 sueros experimentales, suero testigo y gama globulinas de borrego inmunizado con M. tuberculosis H37 Rv. Aquí apreciamos que las gama globulinas de borrego, reaccionaron positivamente con todos los polisacáridos de las 9 cepas, a excepción del de la 31. Todos los sueros experimentales reaccionaron negativamente a excepción del suero 20. En las fotografías 4 y 5, aparecen los resultados de IEF, entre las fracciones de polisacáridos ( 4 mg/ml ) de las cepas 20, 21 y 50 y las gama globulinas de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv. Obsérvese una banda de precipitación desplazada ligeramente hacia el cátodo.

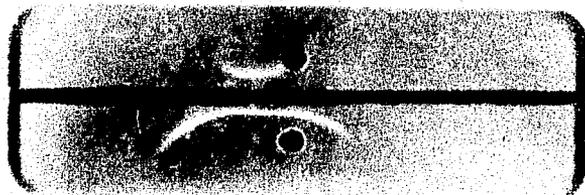
En la fotografía 6, aparecen las bandas de precipitación en DID, entre las fracciones de polisacáridos ( 4 mg/ml ) de 9 cepas de M. tuberculosis, frente a gama globulinas de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv. Se aprecian bandas de identidad entre los polisacáridos de todas las cepas.

C u a d r o XIV

Cuadro de resultados de IEF de las fracciones de polisacáridos ( 4 mg/ml),  
frente a sueros de ratón experimentales y testigo, y gama globulinas  
de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv .

	S-1	S-4	S-12	S-20	S-21	Gama Globulinas	S-T
C-1	-	-	-	-	-	++	-
C-4	-	-	-	-	-	++	-
C-10	-	-	-	+	-	++	-
C-12	-	-	-	-	-	++	-
C-20	-	-	-	-	-	++	-
C-21	-	-	-	-	-	++	-
C-31	-	-	-	+	-	-	-
C-45	-	-	-	-	-	++	-
C-50	-	-	-	+	-	++	-

Ps 20



Ps 21

Fotografía 4

Ps 50



Fotografía 5

En las fotografías 4 y 5, aparecen los resultados de IEF, entre las fracciones de polisacáridos (4 mg/ml) de las cepas 20, 21 y 50, y gama globulinas de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv. Obsérvese una banda desplazada ligeramente hacia el cátodo.

Ps 50

Ps 1

Ps 4

Ps 45

Ps 33



Ps 10

Ps 12

Ps 31

Ps 21

Ps 20

Fotografía 6

Resultados de DID entre fracciones de polisacáridos (4mg/ml), de 9 cepas de M. tuberculosis (pozos periféricos) y gama globulinas de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv. Obsérvese una banda de identidad entre los polisacáridos de todas las cepas.

Fracciones Lipídicas. - En el cuadro XV, aparecen los resultados de las reacciones de DID, entre los sueros experimentales y testigo, frente a las fracciones lipídicas de las 10 cepas estudiadas. - El suero 31 tuvo 5 reacciones positivas y el suero 20 una. No hubo reacciones homólogas positivas. En general los resultados de las reacciones fueron negativas. No se concentraron estas fracciones, ni se hicieron reaccionar frente a gama globulinas de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv.



### Discusión.

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que M. tuberculosis H37 Rv, es una fiel representante de las micobacterias causantes de la tuberculosis actualmente en México, porque posee antígenos comunes a las cepas estudiadas, tanto en su fracción protéica como en su fracción polisacárida, por lo que luce, como un buen candidato para el montaje de una técnica de diagnóstico de la enfermedad.

Las fracciones protéicas, reaccionaron en general negativamente frente a los sueros experimentales de ratón, no así frente a las gama globulinas de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv, a las concentraciones usadas. Lo que indica, por un lado, la estrecha relación antigénica entre todas las cepas en sus fracciones protéicas con M. tuberculosis H37 Rv, y por otro lado la deficiencia de los sueros experimentales para reaccionar frente a estos antígenos micobacterianos.

Las fracciones de polisacáridos, reaccionaron negativamente frente a los sueros experimentales y positivamente frente a las gama globulinas de borrego anti M. tuberculosis H37 Rv, de donde se concluye que las relaciones antigénicas entre los polisacáridos de las cepas estudiadas y los de M. tuberculosis H37 Rv, son bastante estrechas, y que los

sueros experimentales de ratón no fueron capaces de detectar tales similitudes.

Las fracciones lipídicas, reaccionaron negativamente frente a los sueros experimentales. En general esta fracción es poco empleada en pruebas inmunológicas, por su carácter hidrofóbico (Kwapinski, -17), y las eventuales reacciones positivas se explican en función de moléculas contaminantes.

Cabe notar también, que el rendimiento de antígenos fué bajo, y esto debe tomarse en cuenta para futuros trabajos de tipificación serológica de micobacterias u otros géneros, ya que dependiendo de la cantidad de antígeno disponible, podrán hacerse las pruebas inmunológicas en distintos diseños experimentales.

Los resultados negativos de la mayoría de las reacciones de DID e IEF con los sueros de ratón, se deben probablemente a deficiencias en el protocolo de inmunización, pues aquí utilizamos el que convencionalmente seguimos para otros antígenos y otras especies animales. Sabida es la bondad de ajustar los protocolos de inmunización a cada combinatoria antígeno-animal para obtener buenos resultados --- (Larralde, 38). Menos probable, pero mucho más interesante, es la -

posibilidad de una deficiencia genética de ratones Balb C para sintetizar anticuerpos anti-micobacterias, lo que sería objeto de distintos planteamientos experimentales.

La variación de los resultados en los sueros experimentales cuando se utilizaron diferentes concentraciones de antígenos se pueden explicar por los siguientes motivos.

- a) Formación de bandas de precipitado poco visibles.
- b) Alteración de la reactividad del suero, por manejo inadecuado del mismo, en función del tiempo y/o contaminantes

No hay que olvidar que en las reacciones de precipitación, existe una zona de equivalencia y que se deben estudiar distintas combinatorias empleando diferentes concentraciones de antígenos y anticuerpos para poder encontrar dicha zona.

La técnica de extracción de los antígenos es larga para los propósitos de tipificación, y aunque el grado de pureza obtenido en los polisacáridos es alto, no se puede decir lo mismo para las proteínas. Así, es preferible seguir una técnica que además de rápida y sencilla, permita ser comparable con otras ya existentes.

Continuaremos este trabajo con objeto de terminar la tipificación serológica de las restantes 16 cepas que se lograron cosechar, pero mientras usaremos a M. tuberculosis H37 Rv como fiel representante de las micobacterias causantes de la tuberculosis en vista de tener antígenos comunes con todas las cepas examinadas hasta ahora e iniciaremos el montaje del radioinmunoensayo para el diagnóstico de la tuberculosis.

## Conclusiones.

- 1.- M. tuberculosis H37 Rv presentó relaciones antigénicas con las cepas estudiadas en sus fracciones protéica y de polisacáridos.
- 2.- Las fracciones lipídicas de las cepas estudiadas resultaron ser poco reactivas en las pruebas de inmunodifusión.
- 3.- Surgió la posibilidad de que los ratones Balb C empleados en este trabajo, fueran inmunodeficientes genéticamente para montar una respuesta contra las cepas de M. tuberculosis.
- 4.- La técnica de tipificación seguido por nosotros, debe simplificarse con el fin de ampliar el número de cepas a estudiar.
- 5.- Se terminará con la tipificación con las restantes cepas cosechadas y se usará a M. tuberculosis H37 Rv para el montaje del radio-inmuno-ensayo, para el diagnóstico de la tuberculosis.

## Referencias Bibliográficas

- (1) Affronti, L.F., and F.B., Selbert, (1965). Mycobacterial antigen fractionations. Some early investigations of Mycobacterium tuberculosis. Am. Rev. Resp. Dis., 92 ( Parte 2 ): 1 a 8.
- (2) \_\_\_\_\_, L.F., Roberts, D.B., G.L. Wright, Jr., and M. Reich, ( 1972 ). Characterization and comparison of mycobacterial antigens by two dimensional immunoelectrophoresis. Infect. Immun., 6 : 564 a 573.
- (3) Bojallil, F., Gómez Reyes, A., y Zamora, A., -- ( 1963 ). Relaciones inmunológicas y demostración de serotipos en mycobacterium fortuitum. Rev. Latinoamer. Microb.
- (4) Bulnes, F.G., (1977). Informe Epidemiológico -- Anual 1975. Salud Pública de México, 19 - No. 1: 111 a 149.

- (5) Castelnouvo , G. , Gaudiano, A. , Morellini, P. Penso. G. , and Polizzi-Sciarrone, M, (1959). La Costituzione Antigenica di Alcuni Mico - batteri. Ann. Inst. Forlanini, 19, Fasc.I: 1.
- (6) ———— , G. , Belezza, G. , Duncan, M.E. , and Asselineau, J. , (1964). Étude sur les mycobactéries et les nocardie. I. Constitution antigénique. II. Relations serologiques entre mycobactéries et nocardie. III. Sensibilité aux phages. Ann. Inst. Pasteur, 107: -828.
- (7) Furth , J. , (1926). On the serological relationship of acid-fast bacilli, J. Immunol. , 12: 273 a 292.
- (8) Jensen , K. A. , Klaer, I. , and Lundberg. L. , (1965). Studies of the antigenic structure of mycobacteria. Acta Path. Microb. Scandinav, 66: -79.
- (9) ———— , K.A. , (1966). Studies of the antigenic structure of mycobacteria Report 4. Acta Path. Microb. Scandinav , 67: 488.

- (10) Jones , W.D. , Salto, H. , and Kubica, G.P. ,  
(1965). Fluorescent antibody technique  
with mycobacteria. Amer. Rev. Resp. -  
Dis., 92: 256.
- (11) Kara , J. , and Keil, B. , (1958). Coll. Czech.  
Commun., 23: 1392.
- (12) Kirsh , D. , and Shepard, C. , (1961). Serologi-  
cal relationships among mycobacteria.  
Fed. Proc., 20: 16.
- (13) Kwaplinski , J. B.G. , (1964). Research on the antige-  
nic structure of Actinomycetales. VII. Che-  
mical and serological similarities of cell  
walls from 100 actinomycetales strains.  
J. Bact., 88: 1211.
- (14) \_\_\_\_\_ , J. B.G. , (1966). Antigenic structure of the  
actinomycetales, X. Spectra of serological  
activities of the exo-antigens. Zentralbl. -  
Bakteriol Parasit. Abt. I. Orig., 200: 80.

- (15) Kwapinski , J.B.G.,(1966). Antigenic structure of the actinomycetales XI. Spectra of the serological activity of the plasm antigens. Zentr. -Bakt. Parasitk. I. Abt. Orig.,200:380.
- (16) \_\_\_\_\_ , J.B.G. , (1967). A proposed classification of mycobacteria abstr. XIX. Int. Tuberculosis Conf. Amsterdam, p. 33.
- (17) \_\_\_\_\_ , J.B.G. , (1969). Analytical Serology of Microorganisms. Interscience Publishers. N.Y. -1.
- (18) Lind , A. , (1960). Serological studies of mycobacteria by means of diffusion-gel-techniques. IV. The precipitinogenic relationships between different species of mycobacteria with reference to M. tuberculosis , M. phlei , M. smegmatis , M. avium. Int. Arch. Allergy , 17:300.
- (19) Marcial , L.D. , (1971). Boletín epidemiológico anual de 1970. Salud Pública de México, 13 No. 6: 999 a 1043.
- (20) \_\_\_\_\_ , L.D. , (1977). Boletín Epidemiológico Anual de 1971. Salud Pública de México, 14 No. 6.

- (21) Parlett, R. C., and Youmans, G. P., (1956). Antigenic relationships between mycobacteria as determined by agar diffusion precipitin techniques. Amer. Rev. Tuberc., 72: 637.
- (22) Pepys, J., Augustin, R., and Paterson, A. B., (1959) Common antigenic components of mycobacterial extracts. Tubercle, 40: 163.
- (23) Richards, W. D., Ellis, E. M., Wright, H. S., and -- Van Deusen, R. A., (1966). The stimulating effect of tuberculin skin test on precipitin levels in cattle. Amer. Rev. Resp. Dis., 93:912.
- (24) Schaefer, W. B., (1964). Serological classification of mycobacteria and extraction of their type-specific antigens. Bact. Proc., 58 (M80).
- (25) \_\_\_\_\_, W. B., (1965). Serologic identification and classification of atypical mycobacteria. Amer. Rev. Dis., 92: Suppl. 85.
- (26) \_\_\_\_\_, W. B., K. J. Birn, P. A. Jenkins, and J. Marks, (1969). Infection with the Avian-Battery group of mycobacteria in England and Wales Br. Med. J. 2: 412 a 415.

- (27) Selbert , F.B. , and Soto Figueroa , E. , (1956). Complement Fixation by Tuberculopolysaccharide. Proc. Soc. Experim. Biol. Med. , 92:811.
- (28) Sir , Pokorny , J. , and Hasenbergová , E. , (1962). Srovnávací studie nativních filtrátů kultur BCG-podkernu. Rozhledy. V. Tuberkulóze, 22:89.
- (29) Sourek , T. , and Sir , Z. , (1959). Antigenní příbuznost nativních filtrátů kultur některých zástupců Mycobacteriales. Co. Epid. Mikrobiol. Immunol, 8:1.
- (30) Takahashi , Y. , Sasaki , A. , and Yamamoto , K. , (1960). Aspects sérologiques des antigènes de mycobactéries dites atypiques et de mycobactéries tuberculeuses. C.R. Soc. Biol. (Paris), 154: 1901.
- (31) Villegas , I. C. , (1971). Aparato Respiratorio. Francis y Taylor Editores. México: 477 a - 484.

- (32) Vué , S. M. , (1964). Lab. Delo. 8:496.
- (33) Wilson ,G.S. , (1975). The serological classifications of the tubercle bacilli by agglutination and absorption of agglutinins. J. Path. Bacteriol. 28: 69.
- (34) Yoneda , M. , and Y. Fukui. , (1965). Isolation, purification, and characterization of extracellular antigens of Mycobacterium tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis., 92: 9 a 18.
- (35) Zamora , A. , Bojalil, L.F. , y Gómez Reyes, A. , -- (1963). Relaciones inmunológicas entre Mycobacterium smegmatis y otras micobacterias de crecimiento rápido. Rev. Latinoamer. de Microb., 6:91.
- (36) Campbell , D.F. , Justine and S.G. , Natale, E.C.,(1970) Dieter H.S. , (1970). Methods in Immunology. W.A. Benjamín, Inc. N.Y.
- (37) Williams , C.A. , and Chafe, J. W. , (1968). Method In Immunology and Immunochemistry. Academic Press. N.Y.

(38)

Larraide , C. , Héctor B. , Octavio R. , J. Luis M. ,  
Rogello del A. , (1974). Optimización de la  
producción Industrial de anti toxina tetáni-  
ca equina por medio del adyuvante completo  
de Freund y de la frecuencia de inmunización.  
Rev. Ind. Salud Pública, México, 34: 125 a  
153.