

47  
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL  
HACIA ANTÍGENOS DE BAJO PESO MOLECULAR DE  
*Mycobacterium tuberculosis* EN PACIENTES  
CON TUBERCULOSIS ACTIVA UTILIZANDO  
LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ARTURO OROS SALINAS

ASESORES:

MVZ ANGEL GERMÁN MARTÍNEZ SOSA

DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH

DR. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIÉRREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

275055



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.

*Esta tesis fue desarrollada en el Departamento de Investigaciones Inmunológicas del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez", SSA, con el apoyo de la beca del proyecto No. 2374 PM de CONACyT y de la beca de fundación UNAM para tesis de licenciatura en proyectos de investigación*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS.

Evaluación de la respuesta inmune humoral hacia antígenos  
de bajo peso molecular de Mycobacterium tuberculosis en  
pacientes con tuberculosis activa utilizando la técnica  
de Western Blot.

que presenta el pasante: Arturo Oroz Salinas  
con número de cuenta: 3904225-0 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 8 de Diciembre de 199 8

PRESIDENTE C.F.I. Andrea Becerril Osaya Andrea Becerril Osaya  
VOCAL Dr. Marco A. Vega López Marco A. Vega López  
SECRETARIO M.V.Z. Ansel G. Martínez Sosa Ansel G. Martínez Sosa  
PRIMER SUPLENTE C.F.B. Marcela Hernández Vargas Marcela Hernández Vargas  
SEGUNDO SUPLENTE M.en C. Víctor M. Zendejas Buitrón Víctor M. Zendejas Buitrón

## DEDICATORIAS

### *A MIS PADRES :*

*Por darme la existencia y la oportunidad de estudiar. Son parte esencial de mi vida.*

### *A MIS HERMANOS :*

*Por darme el ánimo necesario en los momentos oportunos, lo cual agradezco infinitamente.*

### *MUY EN ESPECIAL A MI HERMANA ADRIANA :*

*Por su confianza y apoyo en todos los aspectos y en todo momento.  
Tu sabes que significas mucho para mí.*

## AGRADECIMIENTOS

*A SILVIA GONZÁLEZ :*

*Por sus valiosas enseñanzas, por su paciencia y por darme mucho de su tiempo y su compañía.*

*A LA DRA. ANA FLISSER, AL MVZ. ANGEL G. MARTÍNEZ SOSA Y AL DR. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIÉRREZ:*

*Por su asesoría, aporte fundamental en el desarrollo de este trabajo.*

*A MIS COMPAÑEROS EN EL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS:*

*Por sus consejos y palabras de aliento, de gran importancia para el buen término de esta tesis.*

*AL BIÓLOGO BALTASAR BRISEÑO:*

*Por las facilidades prestadas para la conclusión del trabajo.*

*A TODOS MIS PROFESORES Y COMPAÑEROS DE ESCUELA:*

*Porque en mayor o en menor medida cada uno de ellos ha cooperado para mi formación académica.*

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	VI

Página

INTRODUCCIÓN.....	1
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	1
ETIOLOGÍA.....	2
ASPECTOS CLÍNICOS.....	3
PATOGENIA.....	4
ANTÍGENOS DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	5
RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	8
<i>Respuesta inmune celular</i> .....	9
<i>Hipersensibilidad de tipo tardío</i> .....	12
<i>Vacunación con BCG</i> .....	12
<i>Respuesta inmune humoral</i> .....	14
DIAGNÓSTICO.....	16
<i>Diagnóstico clínico</i> .....	16
<i>Radiología</i> .....	16
<i>Estudio microscópico (baciloscopia)</i> .....	17
<i>Cultivo tradicional</i> .....	17
<i>Cultivo BACTEC</i> .....	18
<i>Pruebas cutáneas</i> .....	18
<i>Serología</i> .....	19
<i>Diagnóstico molecular</i> .....	20
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
HIPÓTESIS.....	23

MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
<i>MATERIAL BIOLÓGICO</i> ....	24
<i>MATERIAL QUÍMICO Y EQUIPO</i> .....	24
<i>SOLUCIONES Y REACTIVOS</i> .....	25
<i>METODOLOGÍA</i> .....	25
PLAN DE TRABAJO.....	30
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	45
PERSPECTIVAS.....	46
ANEXO 1: PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	47
ANEXO 2: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR LA TÉCNICA DE LOWRY.....	50
ANEXO 3: TINCIONES PARA GELES DE POLIACRILAMIDA.....	51
ANEXO 4: CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	54



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS:	Página
Tabla 1. Proteínas antigénicas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	7
Tabla 2. Resultados de las pruebas aplicadas a la población de sueros problema.....	31
Tabla 3. Índice operativo de las pruebas aplicadas e intervalos de confianza al 95 %.....	34
Tabla 4. Concordancia con respecto al cultivo Lowenstein Jensen.....	34
Tabla 5. Marcadores de bajo peso molecular preteñidos.....	41
Tabla 6. Elaboración de la curva estándar de los marcadores de bajo peso molecular.....	36

FIGURAS:	
Figura 1. SDS-PAGE al 18 % con 1 % de glicerol del ESMTB, en condiciones reductoras.....	35
Figura 2. Curva estándar de marcadores de bajo peso molecular.....	36
Figura 3. Análisis por IET del grupo de sueros problema (1-48).....	38
Figura 4. Análisis por IET del grupo de sueros problema (49-94).....	39
Figura 5. IET con sueros de individuos sanos, leprosos y cisticercosos.....	40
Figura 6. IET con sueros de individuos con histoplasmosis y con otras infecciones micóticas.....	41

## ABREVIATURAS

BAAR	Bacilo ácido alcohol resistente
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
BSA	Albúmina sérica bovina
DAB	Diaminobencidina
DTH	Hipersensibilidad de tipo tardío
ELISA	Ensayo inmunabsorbente ligado a enzimas
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ESMTB	Extracto soluble de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Gp	Glicoproteína
HLA	Antígeno linfocitario humano
HSP	Proteína de choque térmico
IET	Inmunoelctrotransferencia o Western blot
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleucina
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
INH	Isoniazida
LAM	Lipoarabinomanana
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAF	Factor activador de macrófagos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MDGF	Factor de crecimiento derivado de macrófagos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MOOT	Micobacterias diferentes de tuberculosis
MPM	Marcadores de peso molecular
NK	Células "asesinas naturales"
PAS	Acido peryódico de Schiff
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Polimorfonucleares
PPD	Derivado proteico purificado

Rf	Relación de frentes de corrimiento
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
T- $\alpha\beta$	Linfocitos T $\alpha\beta$
T- $\gamma\delta$	Linfocitos T $\gamma\delta$
TBP	Tuberculosis pulmonar
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

## RESUMEN

Debido a un resurgimiento de la tuberculosis en los países desarrollados en donde se le había considerado controlada y a su prevalencia como un problema de salud en los países subdesarrollados, donde se incluye México, está obligada la búsqueda de casos de tuberculosis activa en la población. Confirmar la presencia de la enfermedad por el método de cultivo tradicional es tardado, por esta razón es necesario buscar métodos diagnósticos de laboratorio rápidos, confiables, y de bajo costo.

En este trabajo se hizo una evaluación de la técnica de inmunoelectrotransferencia (IET) o Western blot para la detección de casos de tuberculosis activa en sueros de individuos con síntomas sugerentes de esta enfermedad, utilizando como antígeno un extracto soluble de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, separado en sus constituyentes por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 18 % con 1 % de glicerol. Se tomó como estándar al cultivo en medio Lowenstein-Jensen, y se compararon los resultados con los de la técnica de ELISA y la tinción BAAR para el mismo grupo de sueros.

Se analizaron 6 grupos de sueros: (1) de individuos con síntomas sugerentes de tuberculosis, (2) de individuos aparentemente sanos, (3) con lepra, (4) con cisticercosis, (5) con histoplasmosis y (6) con micosis diferentes de histoplasmosis. Como testigo positivo se utilizó un grupo de sueros con cultivo e identificación de *M. tuberculosis*, y como testigo negativo un grupo de sueros negativos a tuberculosis.

La evaluación de la técnica de IET se realizó con base al reconocimiento por los sueros ensayados de un componente de aproximadamente 4 kDa de *M. tuberculosis*, caracterizado como un lípido por tinción con el colorante Sudán negro después de su separación por SDS-PAGE, el cual presentó reactividad cruzada con sueros de individuos con infecciones micóticas diferentes de histoplasmosis. La sensibilidad y especificidad de la técnica de IET aplicada al grupo de sueros con síntomas sugerentes de tuberculosis fue de 72.4% y de 72.3 % respectivamente, los cuales son significativamente menores a los obtenidos para el BAAR (82.8 % y 93.8%), mientras el ELISA muestra también valores débiles (82.8 % y 56.9 %). Estos resultados demuestran que la técnica de IET no tiene la suficiente calidad para ser utilizada como prueba de diagnóstico única, sin embargo la purificación del antígeno de 4 kDa podría tal vez aumentar dicha calidad y hacer la técnica más útil como apoyo a las pruebas bacteriológicas.

## INTRODUCCIÓN

### *ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS*

La tuberculosis ha sido una de las más importantes y frecuentes enfermedades del hombre, cuya situación epidemiológica se relaciona directamente con el estado económico y social de cada región. En marzo de 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) designó a la tuberculosis como una emergencia de salud pública mundial debido al aumento de casos que se han presentado durante los últimos años, no solamente en los países en desarrollo, sino también en los desarrollados <sup>1,2</sup>.

En los Estados Unidos, la mortalidad por tuberculosis en 1830 era de aproximadamente 400 por 100,000 habitantes, sin embargo comenzó a declinar en forma importante y constante a partir de 1900. Esto se atribuyó en gran parte a la mejoría en las condiciones higiénicas personales, la dieta y recursos económicos generales. Este proceso se aceleró a partir de 1944 con el descubrimiento de la estreptomycinina y otros tuberculostáticos <sup>3</sup>.

En México la tuberculosis es un problema serio de salud pública y el continuo incremento en la infección hasta 1998, es debido al crecimiento poblacional en áreas con deficiente higiene y bajos recursos socioeconómicos, principalmente en estados como Veracruz, Chiapas, Nuevo León, Guerrero y Baja California. Los adultos son los más afectados por la tuberculosis pulmonar, presentando las tasas más altas. En la tuberculosis extrapulmonar, los grupos etarios más afectados son de 1 a 4, los mayores de 65 y los de 45 a 64 años respectivamente. Las causas que condicionan la enfermedad se encuentran con toda seguridad en las condiciones socioeconómicas, sanidad y recursos de salud con que cuenta el país, pero también en el desconocimiento de la historia natural de la enfermedad, patogenia y recursos diagnósticos y terapéuticos <sup>3,4</sup>.

En un informe reciente, un grupo de expertos de la OMS estimó que entre 1990 y el año 2000 ocurrirán 90 millones de casos nuevos y que el número de defunciones por tuberculosis en ese mismo período será de 30 millones de individuos, de los cuales 22,000 corresponderían a norteamérica y 1,210,000 a latinoamérica y a países del Caribe <sup>1</sup>.

## ETIOLOGÍA

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa, generalmente de curso subagudo o crónico, involucra diversos órganos o tejidos, preferentemente a nivel pulmonar, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, bacteria intracelular miembro de la familia *Mycobacteriae*. Mide 1-4 µm de longitud y 0.2-0.6 µm de diámetro; absorbe el colorante carbolfucsina cuando es calentado y una vez teñido resiste a la decoloración por ácidos y alcoholes, de ahí la denominación común de bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR) <sup>3,5</sup>.

Entre las propiedades más importantes de *M. tuberculosis* se mencionan<sup>8</sup>:

1. Es un parásito estricto, por lo cual su transmisión generalmente es directa, de persona a persona.
2. No tiene toxinas conocidas, así puede persistir en bacterioestasis por largos períodos en el interior de las células.
3. Es aerobio estricto, determinado por tener una capacidad de metabolización y de crecimiento muy diferentes según la tensión parcial de oxígeno del órgano o lesión que anida.
4. Es de multiplicación lenta, con un tiempo de división  $\geq$  a 12 horas, factor condicionante de su tendencia a la cronicidad.
5. Las cepas tienen una virulencia variable, explicándose algunas de sus características epidemiológicas.
6. Tiene numerosos antígenos, capaces de despertar una gran variedad de respuestas inmunológicas en el hospedero, algunas de las cuales determinan el característico daño tisular producido.

Esta micobacteria tiene la pared celular más compleja de todas las bacterias conocidas, con un esqueleto de peptidoglucano y moléculas de arabinogalactanomicolato unidas por enlaces covalentes y cubiertas por lípidos libres y polipéptidos, los cuales son responsables no sólo de su carácter hidrofóbico, sino también de su fuerte adyuvanticidad y persistencia intracelular. Estos lípidos contienen ceras, micósidos específicos de especie (glucolípidos complejos y péptidoglucolípidos) y el **factor de cordón** (6,6-dimicolato de trehalosa), el cual se asocia al alineamiento en paralelo de las filas de bacilos (formación de “cordones”), característica de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*, y además se ha encontrado ser el responsable de la inhibición de la migración de células polimorfonucleares (PMN) al sitio de colonización, e induce la formación de granulomas. Los ácidos micólicos son los lípidos principales de la pared celular micobacteriana <sup>6,7</sup>.

Presenta una membrana dos veces más gruesa y fuerte que la de los bacilos Gram negativos, es inmóvil y crece mejor a 37°C, pero puede sobrevivir en un ambiente seco por largo tiempo y muere rápidamente cuando es expuesto a la luz solar directa o a rayos ultravioleta, así como a ebullición durante 1 minuto y por pasteurización a 60°C durante 20 minutos <sup>3</sup>.

### **ASPECTOS CLÍNICOS**

La bacteria se transmite de persona a persona, fundamentalmente por aerosoles, por lo cual los focos primarios de infección se localizan básicamente a nivel pulmonar. Otras formas de transmisión e inicio de la infección son a nivel enteral por ingestión, en piel por contacto directo y otras menos importantes. A partir de los focos primarios, la infección puede diseminarse a cualquier órgano o tejido del cuerpo. Cuando una persona no ha tenido contacto previo con el bacilo, al sufrir el contagio desarrolla una infección primaria o **enfermedad tuberculosa primaria**, en la cual la principal forma de diseminación de la infección es linfohematógena y las principales formas clínicas de la enfermedad son el complejo de Ranke, neumonía tuberculosa, tuberculosis miliar pulmonar, meningoencefalitis tuberculosa y/o tuberculosis miliar sistémica o diseminada. Dicha enfermedad primaria frecuentemente se autolimita, dejando un nódulo calcificado pulmonar, ganglionar o bien focos latentes o "inactivos" en diferentes órganos o tejidos <sup>3</sup>.

Se ha calculado que no más del 5 % de las personas infectadas con el bacilo de Koch son capaces de progresar a enfermedad, la mitad de las veces tempranamente, en los meses o años siguientes a la primera infección, determinando las llamadas *tuberculosis posprimarias*, y en la otra mitad de los casos más tardíamente, con frecuencia muchos años después de haber sido infectados por primera vez, produciendo las tuberculosis de *reactivación endógena* <sup>3</sup>.

Los factores que favorecen el paso de infectado a enfermo son <sup>8</sup>:

- Virulencia de los bacilos.
- Cantidad de bacilos.
- Condiciones del hospedero (edad y sexo, factores genéticos, desnutrición proteica, alcoholismo, infecciones virales -SIDA-, asociación con otras enfermedades, tratamientos inmunosupresores).

Presenta una membrana dos veces más gruesa y fuerte que la de los bacilos Gram negativos, es inmóvil y crece mejor a 37°C, pero puede sobrevivir en un ambiente seco por largo tiempo y muere rápidamente cuando es expuesto a la luz solar directa o a rayos ultravioleta, así como a ebullición durante 1 minuto y por pasteurización a 60°C durante 20 minutos <sup>3</sup>.

## *ASPECTOS CLÍNICOS*

La bacteria se transmite de persona a persona, fundamentalmente por aerosoles, por lo cual los focos primarios de infección se localizan básicamente a nivel pulmonar. Otras formas de transmisión e inicio de la infección son a nivel enteral por ingestión, en piel por contacto directo y otras menos importantes. A partir de los focos primarios, la infección puede diseminarse a cualquier órgano o tejido del cuerpo. Cuando una persona no ha tenido contacto previo con el bacilo, al sufrir el contagio desarrolla una infección primaria o **enfermedad tuberculosa primaria**, en la cual la principal forma de diseminación de la infección es linfohematógena y las principales formas clínicas de la enfermedad son el complejo de Ranke, neumonía tuberculosa, tuberculosis miliar pulmonar, meningoencefalitis tuberculosa y/o tuberculosis miliar sistémica o diseminada. Dicha enfermedad primaria frecuentemente se autolimita, dejando un nódulo calcificado pulmonar, ganglionar o bien focos latentes o "inactivos" en diferentes órganos o tejidos <sup>3</sup>.

Se ha calculado que no más del 5 % de las personas infectadas con el bacilo de Koch son capaces de progresar a enfermedad, la mitad de las veces tempranamente, en los meses o años siguientes a la primera infección, determinando las llamadas *tuberculosis posprimarias*, y en la otra mitad de los casos más tardíamente, con frecuencia muchos años después de haber sido infectados por primera vez, produciendo las tuberculosis de *reactivación endógena* <sup>3</sup>.

Los factores que favorecen el paso de infectado a enfermo son <sup>8</sup>:

- Virulencia de los bacilos.
- Cantidad de bacilos.
- Condiciones del hospedero (edad y sexo, factores genéticos, desnutrición proteica, alcoholismo, infecciones virales -SIDA-, asociación con otras enfermedades, tratamientos inmunosupresores).



El proceso de la primoinfección tuberculosa confiere inmunidad para nuevas infecciones por el germen. Dicha respuesta también es responsable de la reacción de hipersensibilidad tardía que aparece 48 a 72 horas después de la inyección intradérmica de un concentrado de antígenos de *M. tuberculosis* (tuberculina o PPD) <sup>5</sup>.

Por otro lado, cuando la infección tuberculosa ocurre en una persona previamente expuesta al bacilo tuberculoso, se le denomina infección o **enfermedad tuberculosa secundaria**, de reinfección o del tipo "adulto". La reinfección puede ser endógena (a partir de un foco o nódulo tuberculoso latente) o exógena (por contacto del paciente con nuevos bacilos a partir de una persona enferma bacilífera). En ésta las lesiones progresan por extensión directa o por diseminación broncógena y menos frecuentemente por vía hematógena y las formas clínicas más frecuentemente observadas corresponden a tuberculosis pulmonar cavitada, o bien a formas clínicas localizadas en ciertos órganos o tejidos (renal, óseo, ganglionar, etc.) sin aparente relación con un foco pulmonar "activo", difíciles de tratar y que rara vez se autolimitan <sup>3</sup>.

Los síntomas de la tuberculosis diseminada tienden a ser no específicos: fiebre, pérdida de peso, estado mental anormal. Los hallazgos físicos son mínimos usualmente, pueden incluir linfadenopatía periférica, hepato o esplenomegalia y tubérculos coroidales. La imagen de rayos X puede ser normal. Aunque los hallazgos de laboratorio no son diagnósticos, puede haber cambios hematológicos, hiponatremia y elevaciones de la fosfatasa alcalina. En ausencia de tratamiento, el curso de la tuberculosis diseminada puede ser fatal <sup>9</sup>.

## **PATOGENIA**

El bacilo ingresa al organismo generalmente a través de la inhalación de material infectante diseminado por un tuberculoso pulmonar a través de la tos en forma de microgotas. El tamaño de partícula suficiente para alcanzar el espacio alveolar contiene no más de 3 bacilos, y no se conoce cuantas partículas de este tipo deben ser inhaladas antes de que la infección se establezca. El número exacto depende de la virulencia del bacilo y de la resistencia genética del individuo, aunque es probable sean más de 10 partículas. <sup>15</sup>

Con menos frecuencia *M. tuberculosis* ingresa por vía digestiva, que era la forma natural para el acceso de *M. bovis* en la leche de vaca, antes de que se extendiera la pasteurización de ese producto <sup>5</sup>.

El proceso de la primoinfección tuberculosa confiere inmunidad para nuevas infecciones por el germen. Dicha respuesta también es responsable de la reacción de hipersensibilidad tardía que aparece 48 a 72 horas después de la inyección intradérmica de un concentrado de antígenos de *M. tuberculosis* (tuberculina o PPD) <sup>5</sup>.

Por otro lado, cuando la infección tuberculosa ocurre en una persona previamente expuesta al bacilo tuberculoso, se le denomina infección o **enfermedad tuberculosa secundaria**, de reinfección o del tipo "adulto". La reinfección puede ser endógena (a partir de un foco o nódulo tuberculoso latente) o exógena (por contacto del paciente con nuevos bacilos a partir de una persona enferma bacilífera). En ésta las lesiones progresan por extensión directa o por diseminación broncógena y menos frecuentemente por vía hematógena y las formas clínicas más frecuentemente observadas corresponden a tuberculosis pulmonar cavitada, o bien a formas clínicas localizadas en ciertos órganos o tejidos (renal, óseo, ganglionar, etc.) sin aparente relación con un foco pulmonar "activo", difíciles de tratar y que rara vez se autolimitan <sup>3</sup>.

Los síntomas de la tuberculosis diseminada tienden a ser no específicos: fiebre, pérdida de peso, estado mental anormal. Los hallazgos físicos son mínimos usualmente, pueden incluir linfadenopatía periférica, hepato o esplenomegalia y tubérculos coroidales. La imagen de rayos X puede ser normal. Aunque los hallazgos de laboratorio no son diagnósticos, puede haber cambios hematológicos, hiponatremia y elevaciones de la fosfatasa alcalina. En ausencia de tratamiento, el curso de la tuberculosis diseminada puede ser fatal <sup>9</sup>.

## **PATOGENIA**

El bacilo ingresa al organismo generalmente a través de la inhalación de material infectante diseminado por un tuberculoso pulmonar a través de la tos en forma de microgotas. El tamaño de partícula suficiente para alcanzar el espacio alveolar contiene no más de 3 bacilos, y no se conoce cuantas partículas de este tipo deben ser inhaladas antes de que la infección se establezca. El número exacto depende de la virulencia del bacilo y de la resistencia genética del individuo, aunque es probable sean más de 10 partículas. <sup>15</sup>

Con menos frecuencia *M. tuberculosis* ingresa por vía digestiva, que era la forma natural para el acceso de *M. bovis* en la leche de vaca, antes de que se extendiera la pasteurización de ese producto <sup>5</sup>.

Los bacilos, que son fagocitados por los macrófagos alveolares residentes, si no son destruidos, en pocos días se multiplican ilimitadamente en su interior hasta que la célula muere y los nuevos bacilos liberados son ingeridos por macrófagos (monocitos) inmaduros de la sangre, dentro de los cuales crecen en forma logarítmica. Este proceso se repite y en este sitio se forma la lesión primaria. Se forma un tubérculo o granuloma con un centro caseoso sólido en el cual el bacilo se puede multiplicar, aunque muy lentamente. Estas lesiones están compuestas principalmente de macrófagos activados en respuesta a los antígenos micobacterianos; dichos macrófagos producen citocinas como el TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), el MDGF (factor de crecimiento derivado de macrófagos), el TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante  $\beta$ ) y la IL-1, las cuales inducen la proliferación de fibroblastos y la producción de colágeno y juegan un papel importante en la producción de tejido cicatrizante <sup>5,16</sup>.

Cuando la inmunidad celular es débil para detener el crecimiento celular, se produce la licuefacción del caseum que es seguida frecuentemente por la formación de cavidad. En el caseum licuado, los bacilos se multiplican extracelularmente por primera vez en grandes cantidades y entran al árbol bronquial distribuyéndose a otras partes del pulmón y al exterior del mismo. Por vía linfohematógena, los bacilos pueden migrar e iniciar focos infecciosos extrapulmonares, invadiendo así otros órganos <sup>5,15</sup>.

El control de la enfermedad en esta etapa depende de si la cantidad de bacilos (y sus productos antigénicos) exceden la capacidad del hospedero para hacerles frente <sup>5,15</sup>.

### ***ANTÍGENOS DE *Mycobacterium tuberculosis****

Debido a su importancia epidemiológica, la micobacteria ha sido objeto de numerosos estudios encaminados a la identificación y caracterización de sus componentes. En la última década, la obtención de anticuerpos monoclonales y la aplicación de la tecnología del DNA recombinante, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han permitido considerables avances en la caracterización de los antígenos micobacterianos <sup>14</sup>.

El bacilo tuberculoso es un verdadero mosaico de antígenos constituidos por múltiples epítomos o determinantes antigénicos. La mayoría de ellos parecen estar en la pared celular, pero algunos derivan de proteínas citoplasmáticas y algunos son secretados *in vivo* <sup>8</sup>.

Presenta antígenos pertenecientes a la familia de proteínas de choque térmico (García *et al.* 1989), antígenos con actividades enzimáticas (Zhang *et al.* 1991; Garbe *et al.* 1990) y una proteína participante en el metabolismo de fosfatos de la micobacteria (Andersen y Hansen, 1989). Por otra parte, con base en sus propiedades bioquímicas se han encontrado antígenos con capacidad de unirse a fibronectina (Abou-Zeid *et al.* 1988) y proteínas con residuos de carbohidratos de pesos de 50-55 y 38 kDa (Gp50-55 y Gp38) con capacidad de unirse a Concanavalina A (Espitia y Mancilla, 1989) <sup>39</sup>.

La glicoproteína de 38 kDa ha sido la más estudiada, es una proteína específica de especie y se ha demostrado su presencia únicamente en el complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis* y *M. bovis*). La Gp38 se ha considerado como antígeno inmunodominante, un alto porcentaje de los enfermos tuberculosos tienen anticuerpos contra ella y no así los controles sanos. La secuencia de este antígeno es homóloga con el gen PhoS de *E. coli* <sup>13,40,41</sup>.

La proteína de 65 kDa es una proteína de choque térmico, también se presenta en otras micobacterias y tiene homología sustancial con otras proteínas de choque térmico, incluyendo la proteína GroEL de *Escherichia coli*. Se produce en altas cantidades cuando las células crecen bajo ciertas condiciones de estrés, tales como altas temperaturas. Estudios con anticuerpos monoclonales han demostrado que esta proteína tiene múltiples epitopos, algunos de los cuales parecen ser específicos de especie <sup>20</sup>.

La molécula no proteínica inmunodominante en las respuestas humorales es el disacárido arabinogalactana, rápidamente provoca producción de anticuerpos en animales experimentales inmunizados, pero induce poca o nula respuesta inmune celular, y otro complejo antigénicamente importante de la pared celular está constituido por la lipoarabinomanana (LAM), un carbohidrato que provoca respuesta importante de anticuerpos en la mayoría de pacientes con tuberculosis activa, pero no produce reacciones de hipersensibilidad retardada. La LAM inhibe la producción de IFN- $\gamma$  y puede servir como un depósito de radicales libres de oxígeno, inhibiendo de esta manera un mecanismo importante para la destrucción de patógenos intracelulares. Sin embargo, tanto la arabinogalactana como la LAM son moléculas comunes a todas las micobacterias, nocardias y corinebacterias <sup>5,20</sup>.

La protección contra *M. tuberculosis* está asociada definitivamente con antígenos proteínicos constituyentes de la bacteria. Desafortunadamente no se han podido definir aún

los más importantes como protectores. La nomenclatura de estas proteínas toma en cuenta su peso molecular, si se ha clonado su gene completo y si es conocida su función, con numeración progresiva seguida de la letra T (Tabla 1) <sup>5</sup>.

**Tabla 1.** Proteínas antigénicas de *Mycobacterium tuberculosis* <sup>5</sup>.

NOMBRE	PESO	FUNCION	CARACTERISTICAS INMUNOLOGICAS
1T	71 kDa	Proteína de choque térmico Interviene en el plegamiento y translocación de proteínas	Induce respuesta de anticuerpos (ratones y humanos) y proliferación de linfocitos T (sanos y pacientes). Tal vez sea blanco de respuesta autorreactiva.
2T	65 kDa	Proteína de choque térmico. Interviene en el plegamiento y translocación de proteínas.	Induce respuesta B (ratones y humanos) y proliferación y citotoxicidad T (sanos y pacientes). Reconocida por linfocitos T- $\gamma\delta$ . Blanco de autorreactividad.
3T	38 kDa	Es una "proteína de enlace" a fosfatos.	Es específica del complejo <i>M. tuberculosis</i> . Induce proliferación T en pacientes y después de vacunación con BCG
4T	23 kDa	Superoxido dismutasa.	Reconocida por anticuerpos monoclonales.
5T	12 kDa	Proteína de choque térmico Interviene en el plegamiento y translocación de proteínas.	Reconocida por anticuerpos monoclonales Induce proliferación T
6T	44 kDa	L-alanin deshidrogenasa.	
9T	35 kDa	Membranal Función desconocida.	Induce respuestas B y T
10T (a)	30/31 kDa	Se secreta y enlaza a la fibronectina. Función desconocida.	Induce respuestas B y T. Cruza con <i>M. leprae</i> .
13T	19 kDa	Se desconoce.	Respuesta humoral.
17T	14 kDa	Se desconoce.	Induce respuestas T y B. Especie específica.
19T	10 kDa	Se desconoce.	Produce reacciones de hipersensibilidad tardía en cobayos.

Se ha caracterizado bien la de 30 kDa como una proteína antigénica principal de *M. tuberculosis* la cual puede ser preparada con suficiente pureza para su uso en serodiagnóstico por simples medios fisicoquímicos (precipitación con sulfato de amonio al 50 % y cromatografía de intercambio iónico) <sup>42</sup>.

Hay varias moléculas más en diferentes niveles de estudio, como la 20T (100 kDa), 22T (55 kDa), 24T (45 kDa), 25T (47 kDa), 8T (36 kDa), 29T (35 kDa) de la membrana, 31T (34 kDa), 36T (14 kDa) la cual es otra proteína de choque térmico, 40T (77 kDa), 41T (68 kDa), 42T (43 kDa), 43T (41 kDa), 44T (35 kDa) y 45T (33 kDa), además de las proteínas de secreción 43T (41 kDa), 46T (27 kDa), 12T (23 kDa), 48T (19 kDa), 49T (18 kDa) y 51T (15 kDa) <sup>5</sup>.

### **RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA *Mycobacterium tuberculosis***

La respuesta inmunológica frente a la infección con bacilos tuberculosos es muy variable, dependiendo principalmente de las características genéticas del individuo (se ha asociado a HLA-DR2 con mayor riesgo de progresión de infección pulmonar avanzada, y en México se ha asociado un efecto de protección por un gen ligado a HLA-DR11), de su edad, de su estado nutricional, y del ambiente epidemiológico que lo rodea <sup>2, 8, 13, 17</sup>.

El pulmón sirve como la principal vía de entrada para *M. tuberculosis* / *M. bovis*, invaden al hospedero si se inhalan pocos microorganismos encerrados en microgotas. Las gotas grandes son removidas por mecanismos bronquiales no específicos. La adhesión a los tejidos no es gran problema, por estar en condiciones estériles el interior del pulmón <sup>8, 19</sup>.

Los bacilos son engullidos por los macrófagos alveolares y son destruidos por medio de mecanismos potentes como la síntesis de enzimas proteolíticas y radicales tóxicos de oxígeno como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero si estos macrófagos fallan, muchos macrófagos de sangre (monocitos) entran al sitio, probablemente debido a factores quimiotácticos del bacilo liberado por los macrófagos destruidos, el componente C5a del complemento y varias quimiocinas tales como la MCP-1 (Proteína Quimiotáctica de Monocitos-1). Estos nuevos macrófagos inmaduros rápidamente ingieren al bacilo liberado y se establece una simbiosis en la cual no se pueden dañar mutuamente, por que los macrófagos aún no han sido activados. Aquí pueden entrar en acción las células NK, las cuales al ser activadas por la IL-12 producida por macrófagos, pueden lisar directamente células infectadas o producir IFN- $\gamma$  activador de los macrófagos en forma inespecífica <sup>8, 15, 18, 19</sup>.

Con el tiempo se acumulan más macrófagos y más bacilos en la lesión. Esto se da entre los días 7 y 21 después de la infección, el bacilo no estimula el mecanismo microbicida; esto también se observa en cobayos vacunados con BCG <sup>15</sup>.

Hay varias moléculas más en diferentes niveles de estudio, como la 20T (100 kDa), 22T (55 kDa), 24T (45 kDa), 25T (47 kDa), 8T (36 kDa), 29T (35 kDa) de la membrana, 31T (34 kDa), 36T (14 kDa) la cual es otra proteína de choque térmico, 40T (77 kDa), 41T (68 kDa), 42T (43 kDa), 43T (41 kDa), 44T (35 kDa) y 45T (33 kDa), además de las proteínas de secreción 43T (41 kDa), 46T (27 kDa), 12T (23 kDa), 48T (19 kDa), 49T (18 kDa) y 51T (15 kDa) <sup>5</sup>.

### **RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA *Mycobacterium tuberculosis***

La respuesta inmunológica frente a la infección con bacilos tuberculosos es muy variable, dependiendo principalmente de las características genéticas del individuo (se ha asociado a HLA-DR2 con mayor riesgo de progresión de infección pulmonar avanzada, y en México se ha asociado un efecto de protección por un gen ligado a HLA-DR11), de su edad, de su estado nutricional, y del ambiente epidemiológico que lo rodea <sup>2, 8, 13, 17</sup>.

El pulmón sirve como la principal vía de entrada para *M. tuberculosis* / *M. bovis*, invaden al hospedero si se inhalan pocos microorganismos encerrados en microgotas. Las gotas grandes son removidas por mecanismos bronquiales no específicos. La adhesión a los tejidos no es gran problema, por estar en condiciones estériles el interior del pulmón <sup>8, 19</sup>.

Los bacilos son engullidos por los macrófagos alveolares y son destruidos por medio de mecanismos potentes como la síntesis de enzimas proteolíticas y radicales tóxicos de oxígeno como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero si estos macrófagos fallan, muchos macrófagos de sangre (monocitos) entran al sitio, probablemente debido a factores quimiotácticos del bacilo liberado por los macrófagos destruidos, el componente C5a del complemento y varias quimiocinas tales como la MCP-1 (Proteína Quimiotáctica de Monocitos-1). Estos nuevos macrófagos inmaduros rápidamente ingieren al bacilo liberado y se establece una simbiosis en la cual no se pueden dañar mutuamente, por que los macrófagos aún no han sido activados. Aquí pueden entrar en acción las células NK, las cuales al ser activadas por la IL-12 producida por macrófagos, pueden lisar directamente células infectadas o producir IFN- $\gamma$  activador de los macrófagos en forma inespecífica <sup>8, 15, 18, 19</sup>.

Con el tiempo se acumulan más macrófagos y más bacilos en la lesión. Esto se da entre los días 7 y 21 después de la infección, el bacilo no estimula el mecanismo microbicida; esto también se observa en cobayos vacunados con BCG <sup>15</sup>.

Cuando el crecimiento logarítmico dentro de los macrófagos se detiene (2 a 3 semanas después de la inhalación del bacilo), el hospedero posee inmunidad celular y se desarrolla hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) <sup>15</sup>.

### Respuesta inmunológica celular

Experimentos en animales de laboratorio han demostrado que los linfocitos T son las células críticas para la hipersensibilidad de tipo tardío y para la inmunidad protectora <sup>20</sup>.

En modelos murinos, los linfocitos CD4, CD8 y  $\gamma\delta$  tienen un papel en la inmunidad protectora en el siguiente orden relativo: CD4 > CD8 >  $\gamma\delta$ . Estas últimas parecen limitar el paso de células inflamatorias potencialmente dañinas a los granulomas pulmonares <sup>2</sup>.

Estudios con genes de citocinas indican que el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  son esenciales para la protección; parecen activar a los intermediarios reactivos de nitrógeno en macrófagos <sup>21,22</sup>.

La IL-12, producida por macrófagos, promueve la diferenciación de CD4 y también induce a las NK para producir IFN- $\gamma$  activando en forma no específica a los macrófagos, lo cual favorece una subsecuente respuesta inmunológica Th1 sobre una respuesta Th2, y además es un potente estimulante de la tuberculostasis en macrófagos de ratón. El IFN- $\gamma$  también estimula la conversión de 25-hidroxivitamina D3 a 1,25-dihidroxivitamina D3 *in situ*, esta última es la forma activa de la vitamina D3 relacionada con la tuberculoestasis <sup>18</sup>.

Algunos estudios usando ratones *knockout* para  $\beta$ -2 microglobulina han sugerido un papel importante para los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, e igualmente en humanos se ha demostrado que producen IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo con células infectadas, estando este reconocimiento restringido a MHC-I A, B o C <sup>23</sup>.

En humanos, la gran susceptibilidad de pacientes con SIDA hacia la tuberculosis ha demostrado el papel crítico de las células CD4 en la inmunidad protectora, y en el papel de mantener la inactividad de los focos latentes a través de la vigilancia inmunológica activa. Se ha observado un papel secundario de las células no-CD4 individual y colectivamente, por ejemplo las células NK, ya descritas, y las células T- $\gamma\delta$ , que despliegan reactividad contra lipoarabinomanana y ácidos micólicos, así como las células citotóxicas, las cuales pueden destruir directa o indirectamente a macrófagos no activados con bacilos replicándose en su citoplasma <sup>2,18</sup>.



La función de las células T- $\gamma\delta$  es poco conocida, sin embargo, parece ser producen el mismo grupo de citocinas, como el IFN- $\gamma$  y el TNF, y pueden provocar lisis de células infectadas. Su activación por los componentes micobacterianos puede ser inespecífica, asegurando una primera línea de defensa efectiva, o específica, resultante de una sensibilización previa. Como oposición a CD4, las  $\gamma\delta$  no son restringidas a MHC en su activación o en su citotoxicidad <sup>2, 18, 19, 20, 61</sup>.

En personas sanas, las CD4 reactivas con antígenos micobacterianos producen citocinas, principalmente del patrón Th1, y también encajan en el MHC-II de células presentadoras de antígeno infectadas con *M. tuberculosis* o expuestas a antígenos solubles <sup>24</sup>.

Estudios recientes establecen un papel importante para la familia de glicoproteínas de superficie CD1 (codificada fuera del MHC) como moléculas presentadoras de antígenos lipídicos y glicolipídicos a una amplia variedad de células T, incluyendo las doble negativas (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) y las T-CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, las cuales son altamente específicas en su reconocimiento y frecuentemente distinguen entre antígenos derivados de especies micobacterianas estrechamente relacionadas como *M. tuberculosis* y *M. leprae*. Las células T CD8<sup>-</sup> pueden lisar a las células infectadas a través de mecanismos citotóxicos de desgranulación y tienen efecto bactericida, además de producir IFN- $\gamma$ , mientras las CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> usan interacciones Fas-Fas ligando para lisar células, y también producen IFN- $\gamma$  <sup>25, 26</sup>.

Usando una señal citoplasmática, algunas células con marcador CD1 (CD1b y CD1c) se dirigen hacia los compartimientos endosomales y toman los antígenos lipídicos derivados de *M. tuberculosis* para expresar posteriormente estas moléculas en la superficie celular y activen a las células T específicas. Para esto se ha demostrado existe una interacción de alta afinidad entre las moléculas CD1b con la cadena acil terminal de antígenos como los ácidos micólicos, la LAM y el manósido fosfatidil inositol por la vía del receptor manosa, y este mecanismo de interacción CD1b-ligando involucra el desenrollamiento parcial de las  $\alpha$ -hélices de CD1b a pH ácido para revelar un sitio de unión hidrofóbico, el cual pueda acomodar al lípido y posteriormente exponerlo a la acción de citocinas producidas por las células T como el IFN- $\gamma$  <sup>27, 28, 29</sup>.

En relación a la identificación de citocinas mediando la inmunidad protectora contra *M. tuberculosis*, se han hecho estudios en líquido pleural durante este tipo de tuberculosis y se muestra sobreexpresión de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12 con baja expresión de IL-4, la cual sólo ha

sido vista a nivel de mRNA, aunque es capaz de reducir el crecimiento micobacteriano a un grado significativo, y además contribuye a la formación y estabilización de los granulomas, induciendo la entrada de monocitos *in vivo* y la formación de células gigantes multinucleadas *in vitro*. Este patrón remarca el dominio de Th1; CD4 Th1 producen IL-2 e IFN- $\gamma$  y promueven la inmunidad celular, mientras CD4 Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-10 y promueven la inmunidad humoral. La IL-12 promueve la diferenciación de Th0 a la vía Th1. Th1 y Th2 se regulan negativamente, por ejemplo la IL-10 puede disminuir la producción de IFN- $\gamma$ , además de antagonizar la función de macrófagos <sup>2, 18, 24</sup>.

El TNF- $\alpha$  y el TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante) son inducidos por la infección de monocitos y funcionan en vías autócrinas; el primero tiene un efecto positivo y el segundo uno negativo limitando el crecimiento intracelular de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* en monocitos humanos <sup>30</sup>.

En contraste a modelos murinos, en los cuales el IFN- $\gamma$  puede inducir una estasis total de *M. tuberculosis*, en humanos no produce sino una débil inhibición, o incluso un aumento significativo de su crecimiento en los monocitos humanos. Provoca no se despliegue actividad del factor activador de macrófagos (MAF) contra *M. tuberculosis*. Para esto hay 2 explicaciones: (1) La ingestión de bacilos puede inducir a citocinas que interfieren con la acción del IFN- $\gamma$ , como la TGF- $\beta$ , y (2) La actividad principal del IFN- $\gamma$  en especies resistentes, tales como el ratón, es inducir la producción de NO (óxido nítrico). Este mecanismo no opera o es débilmente expresado en especies susceptibles, tales como los humanos y los cobayos <sup>31</sup>.

En humanos, la mayoría de las veces predomina la sensibilización de los linfocitos T CD4, pero en algunas ocasiones, predominaría la sensibilización de T CD8<sup>+</sup> (citotóxicas) capaces de suprimir la respuesta inmunológica defensiva, produciendo las llamadas formas “no reactivas” de la tuberculosis, aparte de estos se ha postulado que en presencia de grandes concentraciones de antígenos aumentaría la síntesis de anticuerpos con la formación de complejos inmunes circulantes, los cuales tendrían acción depresiva sobre la inmunidad celular <sup>8</sup>.

Es importante enfatizar. el bacilo tuberculoso puede permanecer viable en los tejidos por meses, años o durante toda la vida del sujeto, por que la inmunidad celular, si bien inhibe la multiplicación del mismo, no les confiere a las células la capacidad de destruirlos y por lo

mismo estos bacilos, aún en número muy reducido, y contenidos aún en lesiones fibrocalcificadas son perfectamente capaces de iniciar nuevamente su metabolismo, dividirse y multiplicarse y producir enfermedad si la resistencia local se disminuye por cualquier causa. Algunas de las causas comunes incluyen alcoholismo, enfermedades debilitantes, malnutrición, neoplasia y terapia inmunosupresiva<sup>3,9</sup>.

La aparición de cepas MDR-TB (resistencia multi-drogas) ha sido más obvia en pacientes con SIDA, quienes debido a su incrementada susceptibilidad a la infección y al corto intervalo entre la infección y las manifestaciones de la enfermedad representan los principales casos indicadores<sup>32</sup>.

### *Hipersensibilidad de tipo tardío*

El hospedero usa la DTH para causar necrosis caseosa como respuesta al exceso de antígeno local, o en otras palabras, por destrucción de macrófagos no activados en los cuales el bacilo está creciendo, el hospedero elimina el ambiente intracelular que es favorable para tal crecimiento, aunque esto implica la destrucción local de tejido. Tal necrosis se observa en pacientes con alta sensibilidad a la tuberculina (PPD)<sup>15,19</sup>.

La necrosis caseosa es entonces una reacción DTH producida por células T, especialmente citotóxicas (CD8). Otros factores parecen estar involucrados: enzimas hidrolíticas, citocinas (ej. TNF- $\alpha$ ), intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno de macrófagos y probablemente de otras células; y quizá aún, complejos antígeno-anticuerpo, complemento y productos tóxicos liberados de bacilos muertos<sup>15</sup>.

La licuefacción del caseum y su eliminación al exterior, explica las siembras broncogénas o intracanaliculares de la tuberculosis a otras partes de los pulmones, y explica también, el contagio de la enfermedad a través de la expectoración<sup>8</sup>.

### *Vacunación con BCG*

La vacunación con BCG tiene por objeto proteger a los no infectados, especialmente en la poblaciones donde hay muchos tuberculosos bacilíferos y el riesgo de transmisión de la enfermedad es muy elevado; su función es reemplazar una infección natural virulenta con una cepa de bacilos BCG (Bacilo de Calmette y Guérin) de *M. bovis* avirulentos, capaces de

despertar las defensas del hospedero frente a nuevas infecciones <sup>11</sup>.

Es una vacuna viva, correspondiente a una cepa de *M. bovis* atenuada por Calmette y Guérin hace mas de 65 años, subcultivada cada tres semanas durante 13 años con un total de 231 pases, hasta perder su virulencia. A partir de 1974 la vacunación con BCG fue incluida en el programa ampliado de vacunación de la OMS en la mayoría de los países <sup>11</sup>.

Actualmente la vacuna BCG ha sido desarrollada de múltiples subcepas cultivadas en diferentes laboratorios, es conservada por lotes y liofilizada. Se trata de una vacuna bastante frágil, fácilmente afectada por la luz y el calor (la exposición directa al sol es capaz de reducir el número de bacilos viables en un 50 % en menos de 5 minutos). A pesar de ser inocua, en la práctica presenta algunas complicaciones <sup>11</sup>:

*Locales :*

- Ulceración local
- Adenopatías regionales
- Fistulizaciones crónicas
- Cicatrices queloides

*Sistémicas :*

- Osteítis BCG
- Diseminación de la vacuna -becegeítis-  
(solo en individuos con profundas alteraciones de la inmunidad celular).

Su eficiencia en la prevención de la tuberculosis pulmonar ha mostrado variaciones considerables en diferentes poblaciones y experimentos, sin embargo ha mostrado una eficacia consistente (aprox. 80 %) en la prevención de tuberculosis extrapulmonar (meningítis tuberculosa y tuberculosis miliar), en niños, la cual no dura mucho más allá de 15 años. Para explicar esto se han propuesto diferencias en la potencia de las distintas cepas, en las dosis de BCG e interferencia en la respuesta inmunológica a la vacuna por contacto previo con otras micobacterias <sup>2,8,11,33</sup>.

El grado de protección parece depender de la subcepa de BCG: la BCG Pasteur y la BCG Copenhagen, también llamadas cepas fuertes, inducirían niveles altos y más persistentes de inmunidad adquirida, mientras las llamadas cepas débiles (BCG Glaxo, BCG Tokio) lo harían en grado menor <sup>34</sup>.

En México se produce la vacuna liofilizada de la subcepa Copenhagen 1331, tiene la ventaja sobre la líquida de una mayor estabilidad, se puede mantener a 30°C durante casi un mes y a 4°C durante un año. La presentación es de ampollitas de 1.0 mg (10 dosis) <sup>11</sup>.

En todos los casos la eficacia protectora requiere la vacunación con bacterias vivas. Las bacterias vivas y las muertas inducen respuestas similares durante la primera semana después de la vacunación, como se ha determinado por análisis inmunohistoquímico en el sitio de inyección y en el ganglio linfático. La respuesta diferencial subsecuente está caracterizada por la migración de bacilos hacia la corriente de linfa en el caso de la vacuna viva, lo cual parece ser un elemento importante en la eficacia de la vacuna. Esto se acompaña de un aumento de células mononucleares en el ganglio linfático y de la expresión de óxido nítrico sintasa tanto en el ganglio linfático como en el sitio de inyección <sup>35</sup>.

Se recomienda vacunar a los recién nacidos para prevenir las formas graves de la enfermedad, la cuales tienden a ocurrir a esas edades. También revacunar a los niños cuando comienzan la escuela, porque esta es la edad en alcanzarse mayor cobertura <sup>8</sup>.

Las contraindicaciones son escasas: recién nacidos por debajo de 2 Kg o con lesiones eczematosas en la piel, y a todas las edades, individuos con inmunodeficiencias evidentes, o en tratamiento con drogas inmunosupresoras, aunque la OMS todavía recomienda vacunar a los niños seropositivos a VIH, no presentando síntomas de enfermedad, en las regiones con alta prevalencia de tuberculosis <sup>8</sup>.

El amplio uso de la vacuna BGC hace necesario discriminar entre respuesta a antígenos de la vacuna y aquella inducida específicamente hacia la infección activa (e idealmente primaria). La comparación de inmunoblots de extractos solubles de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG usando suero de pacientes y de controles vacunados con BCG puede revelar patrones de anticuerpos específicos hacia antígenos particulares ayudando a discriminar entre la respuesta hacia las dos especies e identificar aquellos antígenos que ofrezcan bases para una prueba específica para *M. tuberculosis* <sup>33</sup>.

### Respuesta inmune humoral

La patogénesis de la tuberculosis está en su mayor determinada por la respuesta celular pero, a la vez, uno debe reconocer que la respuesta humoral mediada por linfocitos B ocurre en pacientes con tuberculosis, aunque no tenga un papel claramente demostrado en la patogénesis de la enfermedad <sup>20</sup>.

Consecuentemente al primer uso de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) por Nassau *et*

al. (1976) y a la disponibilidad de conjugados específicos para isotipos individuales de inmunoglobulinas, se han dado rápidos avances en el conocimiento de la respuesta inmunológica humoral en la tuberculosis y en el desarrollo de técnicas serodiagnósticas <sup>20</sup>.

Los niveles de IgG son el indicador usual de la enfermedad activa. Estudios con muchos antígenos usando diversas técnicas, han encontrado a pocos sujetos testigo positivos y testigo negativos con tenidos niveles de IgG detectables. La infección primaria asintomática y la enfermedad pulmonar leve no inducen una respuesta de anticuerpos significativa. Durante el tratamiento los niveles de anticuerpos aumentan un poco en el primero o segundo mes, disminuyendo después, aunque permanecen en niveles detectables por uno o varios años. Pacientes con tuberculosis sanadas no tienen IgG detectada hacia antígenos micobacterianos. Ensayos con el antígeno de 38 kDa y con la lipoarabinomanana han demostrado la producción de anticuerpos de la subclase IgG1 e IgG3 principalmente, estos últimos especialmente en pacientes co-infectados con HIV <sup>20, 36, 37</sup>.

La respuesta de IgM está dirigida principalmente a antígenos polisacáridos no específicos, se desarrolla primero, aunque no en altos títulos, y su nivel no correlaciona bien con la presencia o ausencia de la enfermedad activa. Muchas personas sanas probablemente desarrollan bajos niveles de IgM en respuesta a micobacterias del ambiente. Por otro lado, las IgA se han visto a bajos niveles en el suero de pacientes con tuberculosis activa, pero no en sujetos control. Sin embargo las IgA contra antígenos micobacterianos no se han estudiado adecuadamente en secreciones externas, y además no se debe excluir un papel importante en la protección inmune de mucosas <sup>20</sup>.

Hasta ahora hemos visto los mecanismos de defensa empleados por el hospedero contra *M. tuberculosis*, pero es importante hacer notar también los mecanismos dispuestos por el bacilo para su protección de las defensas orgánicas <sup>8, 18, 38</sup>.

- Produce enzimas detoxificantes de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI).
- El NH<sub>4</sub><sup>+</sup> está involucrado en la neutralización del pH endosomal ácido, en el bloqueo de la producción del ROI y en la inhibición de movimientos del lisosoma y la fusión con fagosomas.
- La lipoarabinomanana interfiere con la preparación/activación de los macrófagos y los sulfolípidos inhiben la fusión del lisosoma-fagosoma e interfieren con la producción de ROI.
- Varios componentes de su pared lipídica sin ser antígenos, actúan como modificadores de la respuesta inmunológica celular y de las reacciones de hipersensibilidad retardada. Entre ellos: el

muramil dipéptido, los ácidos micólicos, las ceras D, el arabinogalactan, el factor cuerda, algunas glicoproteínas y otras moléculas de potente acción biológica.

- Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de escape de *M. tuberculosis* que involucrando la regulación-negativa de la molécula presentadora de antígeno CD1 de la superficie celular de las células presentadoras de antígeno, y esta pérdida de CD1 está asociada con una completa inhibición de la capacidad de las células infectadas para la presentación de antígenos lipídicos y glicolipídicos de *M. tuberculosis* a las células T en el contexto de CD1. Para ser este mecanismo efectivo se requiere la infección de las células con micobacterias vivas, las cuales parecen disminuir los niveles de RNA mensajero para CD1 y de esta manera logran esta regulación y su persistencia intracelular.

## **DIAGNÓSTICO**

### **Diagnóstico clínico**

La tuberculosis está incluida en el diagnóstico diferencial de muchas enfermedades; desde luego de todas las que producen compromiso del estado general, baja de peso inexplicada o fiebre de origen desconocido. Igualmente debe plantearse su presencia en individuos con tos con expectoración que se prolonga más allá de los plazos corrientes para una bronquitis común, en todos los casos en que se expectora con sangre y, desde luego, en todo derrame pleural a cualquier edad. Los signos clínicos no son específicos y pueden ser confundidos, por ejemplo, con cáncer pulmonar o neumopatías agudas, micosis pulmonares o neumonías por *Klebsiella*<sup>8,10</sup>.

### **Radiología**

La radiografía de tórax es el método más sensible para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, el problema es que es un método considerablemente más caro y menos específico que la bacteriología. Las imágenes producidas se incluyen en el diagnóstico diferencial de las patologías respiratorias y de muchas enfermedades sistémicas, y aunque se insiste en su inespecificidad, con frecuencia son bastante sugerentes<sup>5</sup>.

Es característica la localización de lesiones en las partes altas de los pulmones, especialmente en los segmentos apicales. De particular importancia práctica es la distinción entre lesiones radiológicas activas e inactivas. El aspecto radiológico puede ser equívoco,

muramil dipéptido, los ácidos micólicos, las ceras D, el arabinogalactan, el factor cuerda, algunas glicoproteínas y otras moléculas de potente acción biológica.

- Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de escape de *M. tuberculosis* que involucrando la regulación-negativa de la molécula presentadora de antígeno CD1 de la superficie celular de las células presentadoras de antígeno, y esta pérdida de CD1 está asociada con una completa inhibición de la capacidad de las células infectadas para la presentación de antígenos lipídicos y glicolipídicos de *M. tuberculosis* a las células T en el contexto de CD1. Para ser este mecanismo efectivo se requiere la infección de las células con micobacterias vivas, las cuales parecen disminuir los niveles de RNA mensajero para CD1 y de esta manera logran esta regulación y su persistencia intracelular.

## **DIAGNÓSTICO**

### **Diagnóstico clínico**

La tuberculosis está incluida en el diagnóstico diferencial de muchas enfermedades; desde luego de todas las que producen compromiso del estado general, baja de peso inexplicada o fiebre de origen desconocido. Igualmente debe plantearse su presencia en individuos con tos con expectoración que se prolonga más allá de los plazos corrientes para una bronquítis común, en todos los casos en que se expectora con sangre y, desde luego, en todo derrame pleural a cualquier edad. Los signos clínicos no son específicos y pueden ser confundidos, por ejemplo, con cáncer pulmonar o neumopatías agudas, micosis pulmonares o neumonías por *Klebsiella*<sup>8,10</sup>.

### **Radiología**

La radiografía de tórax es el método más sensible para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, el problema es que es un método considerablemente más caro y menos específico que la bacteriología. Las imágenes producidas se incluyen en el diagnóstico diferencial de las patologías respiratorias y de muchas enfermedades sistémicas, y aunque se insiste en su inespecificidad, con frecuencia son bastante sugerentes<sup>8</sup>.

Es característica la localización de lesiones en las partes altas de los pulmones, especialmente en los segmentos apicales. De particular importancia práctica es la distinción entre lesiones radiológicas activas e inactivas. El aspecto radiológico puede ser equívoco,



de modo que el veredicto final dependerá de los estudios bacteriológicos y de la evolución de las lesiones, ya sea espontáneamente o bajo tratamiento <sup>8</sup>.

Otras técnicas radiológicas, tales como la tomografía computarizada del tórax o la resonancia magnética nuclear, pueden emplearse para aclarar más fácilmente la composición de lesiones de estructura compleja, sin embargo son más caras y menos accesibles, y no aportan ventajas diagnósticas especiales en la gran mayoría de los casos <sup>8</sup>.

### Estudio microscópico (baciloscopia)

La muestra clínica, de expectoración comúnmente, se tinte mediante la tinción de Ziehl-Neelsen o de Kinyoun, con lo cual se observan bastoncillos ligeramente curvados, rojos sobre fondo azul. También se usan colorantes fluorocrómicos (auramina-rodamina de Truant) para observación al microscopio de fluorescencia <sup>11</sup>.

El límite más bajo de detección de esta prueba en esputo es de 0.5 a 1.0 x 10<sup>4</sup> bacilos / mL de muestra. La sensibilidad aumenta en muestras respiratorias sobre todo en pacientes con signos radiológicos de cavitación y se incrementa también hasta un 90 % si el esputo se concentra previamente. La especificidad es vecina al 95 %, pero depende de la muestra, por ejemplo, en líquido cefalorraquídeo (LCR) un frotis positivo es diagnóstico de tuberculosis meníngea con alta probabilidad, pero en muestra de esputo es mucho menos específica, ya que la microscopía no discrimina entre *M. tuberculosis* y micobacterias diferentes de tuberculosis (MOOT) <sup>6, 11, 12</sup>.

El informe se da como sigue :

OBSERVACIONES	RESULTADO
No hay BAAR en 100 campos observados	Negativo
Menos de 1 BAAR / campo, en promedio, en 100 campos observados	+
1-10 BAAR / campo, en promedio, en 50 campos observados	++
Más de 10 BAAR / campo, en 20 campos observados	+++

### Cultivo tradicional

El diagnóstico definitivo se establece con el aislamiento del bacilo a partir de expectoración, lavado gástrico, líquido pleural, LCR, orina y en tejido de biopsia <sup>8</sup>.

Las muestras se inoculan en medios con huevo (Lowenstein-Jensen, ATS) o agar (Middlebrook 7H9, 10, 11) y se incuban durante 3 o más semanas. Basta que existan más de 10 bacilos/mL en muestras digeridas (NaOH 2 %) y concentradas para ser positivo. Las colonias aparecen como rugosas, no pigmentadas, formando cordones. La identificación de especies incluye determinación de temperatura de crecimiento, acumulación de niacina y reducción de nitratos (*M. bovis* es negativo para ambos caracteres), actividad de catalasa a un pH de 7 y 68 °C de temperatura y actividad de arilsulfatasa, además de ser sensible a la isoniazida (INH)<sup>5, 8, 12</sup>.

### Cultivo BACTEC

Es un método automatizado, que emplea el medio líquido Middlebrook enriquecido en ácido palmítico marcado con <sup>14</sup>C, un isótopo radioactivo, que emite radiaciones beta<sup>8</sup>.

La muestra se siembra en el medio, y si hay micobacterias vivas, al metabolizar los ácidos grasos con <sup>14</sup>C, liberan el isótopo en forma de CO<sub>2</sub> marcado, de donde es aspirado y llevado a una cámara de ionización y transformado en una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de bacilos que haya en la muestra. El resultado se expresa como "índice de crecimiento". No se utiliza para primoaislamiento sino para pruebas de sensibilidad a antibióticos o para el diagnóstico diferencial entre las distintas especies micobacterianas. El tiempo para la detección es de 1 a 2 semanas<sup>6, 8</sup>.

El cultivo en medio sólido y el sistema BACTEC son significativamente más sensibles y específicos que la tinción. Los cultivos, según Morgan *et al.* (1983), tienen 40 % más de sensibilidad que la tinción, aunque son mucho más lentos. El BACTEC tiene hasta 72 % de capacidad de recuperación comparado con 89 % del sistema convencional (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11 y Lowenstein-Jensen). En conclusión, los frotis permanecen como el estándar de oro para un diagnóstico rápido, mientras el cultivo lo es para un diagnóstico sensible y específico<sup>12</sup>.

### Pruebas cutáneas

Actualmente se utiliza el derivado proteico purificado (PPD), que se aplica con la técnica de Mantoux. La dosis de antígeno más habitual es de 5 unidades de tuberculina (equivalente a 0.1µg de PPD), aunque en México y países de alta endemicidad se emplean 2 unidades. Se

inoculan por vía intradérmica en la parte anterior del brazo y la reacción se mide a las 48-72 horas, interpretándose como sigue <sup>6,8,11</sup>:

DIÁMETRO DE INDURACIÓN	INTERPRETACIÓN
Mayor o igual a 5 mm	<i>positiva</i> en niños menores de 5 años sin antecedentes de aplicación de BCG, en niños con factores de riesgo como inmunosupresión, y en pacientes en contacto reciente con enfermos tuberculosos no tratados.
Mayor o igual a 10 mm	<i>positiva</i> en niños menores de 5 años, pacientes inmunocomprometidos y en individuos en condiciones de alto riesgo.
Mayor o igual a 15 mm	<i>positiva</i> en cualquier individuo sin factores de riesgo.
Sin induración	No excluye la posibilidad de infección*

\* En el Instituto Nacional de Pediatría, en niños con diagnóstico de probable tuberculosis, el PPD es negativo en 50 % de los casos. En Estados Unidos se reporta PPD negativo en 10 % de los niños con tuberculosis confirmada por cultivo.

### Serología

La historia de las pruebas serológicas para la tuberculosis hasta 1972 describe la aplicación de numerosas técnicas sin el conocimiento de la reactividad cruzada de los antígenos micobacterianos. En consecuencia, estas pruebas resultaron altamente variables, y sólo mostraron alta sensibilidad si era correspondida por una pobre especificidad. Entre estas pruebas están: *fijación del complemento*, *hemaglutinación*, *radioinmunoensayo* (en esta última técnica, uno de los mayores avances fue la demostración de anticuerpos contra *M. tuberculosis* en suero de sujetos sin exposición al bacilo) y *ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)* <sup>10</sup>.

Actualmente, con la técnica de ELISA es posible hacer el diagnóstico serológico de la tuberculosis con una sensibilidad cercana al 90 % y una especificidad próxima al 100% en enfermos bacilíferos, con una fuerte carga antigénica. Desafortunadamente, la sensibilidad es menor en las tuberculosis paucibacilares y extrapulmonares, que es justamente donde las técnicas bacteriológicas también muestran sus mayores limitaciones. El serodiagnóstico positivo en la tuberculosis extrapulmonar y en la pulmonar con baciloscopia negativa, ha variado entre 50 y 75 %, aunque su detección ha sido beneficiada con el uso de antígenos como las proteínas de 14 y 19 kDa <sup>13</sup>.

La técnica de ELISA usando antígeno en fase sólida, es el ensayo serológico mas comúnmente usado. Se han desarrollado ensayos empleando extractos crudos, extractos proteínicos y derivados de constituyentes de *M. tuberculosis* como glicolípidos,

polisacáridos y antígenos purificados como el antígeno de 38 kDa, con el cual se ha logrado una especificidad cercana al 80 % en casos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva. Se han desarrollado ensayos empleando extractos solubles de BCG, lográndose una sensibilidad de 91.5 % y una especificidad de 92.5 %, y también se han utilizado derivados de la tuberculina, entre otros <sup>8, 13, 59</sup>.

Se ha logrado hacer el diagnóstico de tuberculosis meníngea con la medición de IgG e IgM anti-PPD en LCR, con una sensibilidad y especificidad superiores al 90 %. De igual manera se ha utilizado un ELISA indirecto amplificado para detectar IgG en LCR empleando un extracto soluble de *M. tuberculosis* y se han obtenido valores de sensibilidad de 95 % y de especificidad cercana al 100 %. Otros autores se han acercado también al 100 % con el empleo de un doble antígeno (antígeno citosólico de *M. tuberculosis* muy específico y antígeno 60 derivado de BCG muy sensible). También se ha demostrado respuesta inmunodominante de IgG contra la LAM (lipoarabinomanana) y contra la proteína de 14 kDa en estos casos <sup>8, 13, 60</sup>.

Se ha evaluado una preparación del antígeno 6 (cuyo principal constituyente es el antígeno de 30 kDa de *M. tuberculosis*) con resultados menos satisfactorios que con el antígeno 5 y el antígeno de 38 kDa <sup>10</sup>.

La extracción de antígenos proteínicos purificados del bacilo tuberculoso ha dado como resultado sólo un antígeno semipurificado (A60), el cual forma las bases de una prueba comercial de diagnóstico (Anda Biologicals, Strasbourg, Francia) <sup>10</sup>.

### Diagnóstico molecular

Desde el primer reporte por Brisson-Noël *et al.* (1989) un gran número de secuencias de DNA de *M. tuberculosis* se han usado como blancos para la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), una técnica rápida en donde se logra la generación *in vitro* de millones de copias de un segmento de DNA específico. Estos blancos específicos están representados por el gen de la proteína de 38 kDa, la secuencia de inserción IS6110, repetida 10-16 veces en el cromosoma del complejo *M. tuberculosis*, el gen de la proteína de choque térmico (HSP) de 65 kDa y el RNA ribosomal (rRNA) <sup>12</sup>.

Usando iniciadores complementarios a la secuencia del gen de la proteína de 38 kDa,

Miyazaky *et al.* (1993) lograron en 35 ciclos un límite de detección de 100 unidades formadoras de colonias (cfu) de *M. tuberculosis*/mL, y cuando el producto del primer PCR se amplificó por segunda ocasión (35 ciclos más) se logró detectar hasta 0.1 cfu / mL. La sensibilidad de la prueba fue de 97 % <sup>12</sup>.

Por otro lado, amplificando la secuencia repetida IS6110 de esputo, lavado bronquioalveolar, líquido pleural, sangre y orina, varios investigadores como Eisenach *et al.* (1991) y Forbes and Hicks (1993) han detectado hasta 0.23-0.023 cfu/mL usando 40 ciclos de amplificación. La sensibilidad de la técnica ha variado de 74 a 91 % con rangos de especificidad de 72 a 100 % <sup>12</sup>.

Utilizando secuencias conservadas del gen de la hsp de 65 kDa de *M. tuberculosis* y de MOTT se ha buscado un diagnóstico genérico de la infección micobacteriana, y con la hibridación del producto de PCR se ha buscado la identificación de las especies infectantes. Pierre *et al.* (1991) obtuvieron un 39 % de sensibilidad con este ensayo usando 50 ciclos de amplificación, y los mismos autores, usando un protocolo con 50 ciclos más obtuvieron un 63 % de sensibilidad y un 91 % de especificidad, mejor incluso que con el cultivo <sup>12</sup>.

Por último, la transcripción reversa del RNA ribosomal 16S (un componente abundante de los ribosomas micobacterianos), presenta varias ventajas; primero, se facilita la detección por la alta expresión del rRNA 16S ( $10^3$ - $10^4$  copias por célula) al ser producido un número igual de copias de cDNA para un PCR, y segundo, por la presencia de secuencias altamente conservadas del rRNA 16S se puede lograr la amplificación del DNA para un diagnóstico genérico de la infección, en forma similar al que se busca con la hsp 65. Incluso existe un equipo comercial empleando la amplificación del rRNA 16S (MTD, Gen-Probe). La sensibilidad de esta prueba está entre 82-100% con una especificidad de 99-100% <sup>12</sup>.

Seguramente el uso de la biología molecular es la solución a futuro, aunque todavía requiere de su estandarización en forma adecuada y definitiva <sup>14</sup>.

Como ya se describió en la parte de serología, se han desarrollado múltiples ensayos inmunoenzimáticos, sin embargo el hecho de ser pruebas indirectas y además la existencia de reacciones cruzadas con otros antígenos micobacterianos han provocado que dichos ensayos sólo sean utilizados como pruebas complementarias y que el cultivo siga siendo la prueba confirmativa, aún con sus limitaciones.

La técnica de inmunoelectrotransferencia (IET), descrita por Towbin (1979), es uno de los métodos inmunoenzimáticos más útiles en la actualidad para el diagnóstico de algunas infecciones activas así como para analizar una mezcla de antígenos o para demostrar variaciones individuales de la magnitud de las respuestas. Permite identificar antígenos inmunodominantes reconocidos por anticuerpos específicos provenientes del paciente. La IET combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida, que separa moléculas de acuerdo a su peso molecular y carga, las cuales a su vez son electrotransferidas a papel de nitrocelulosa para posteriormente llevarse a cabo el reconocimiento antígeno-anticuerpo en la fase sólida. Esta inmunodetección se hace evidente por la adición de un segundo anticuerpo marcado con una enzima y la adición del sustrato correspondiente<sup>40, 49</sup>.

Esta técnica no ha sido considerada aún en el diagnóstico de tuberculosis, debido a la falta de un patrón definido de antígenos que ofrezcan resultados consistentes en los diferentes laboratorios y al hecho de tratarse de una prueba indirecta al igual que la prueba de ELISA, lo cual es importante considerar porque la presencia de anticuerpos no es indicativo obligado de enfermedad activa, por encontramos en un país en el cual la gran mayoría de la población ha estado expuesta a micobacterias, ya sea naturalmente o por vacunación. Actualmente sólo tiene aplicación en el área de investigación de esta enfermedad, donde resulta de gran utilidad por permitir observar la respuesta hacia antígenos individuales con una alta especificidad, aunque la sensibilidad sea menor a la de un ELISA.

En este trabajo se evalúa la utilización de la técnica de IET para el diagnóstico de la tuberculosis activa en base a la existencia de reacción hacia antígenos de bajo peso molecular (por debajo de 15 kDa), los cuales no han encontrado una aplicación definitiva en el diagnóstico serológico de esta enfermedad. Para evaluar dicha técnica se toma como "estándar de oro" el desarrollo de *M. tuberculosis* en medio de cultivo Lowenstein Jensen, y también se comparan otras técnicas (BAAR y ELISA).

Un producto importante de la investigación puede ser la aplicación del método para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar cuya identificación correcta aún es un serio problema para los médicos tratantes.

## OBJETIVO GENERAL

- Identificar los antígenos de bajo peso molecular inmunorrelevantes para el diagnóstico de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* mediante la evaluación de la respuesta humoral de pacientes con tuberculosis activa, de pacientes con padecimientos pulmonares no tuberculosos y de testigos aparentemente sanos, utilizando la técnica de inmunoelectrotransferencia (Western-blot).

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Separar y caracterizar los antígenos de bajo peso molecular de *M. tuberculosis* por medio de la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida al 18 % y con 1% de glicerol.
- Estandarizar la metodología a seguir en la técnica de inmunoelectrotransferencia para la evaluación de los antígenos de bajo peso molecular.
- Estimar y comparar la calidad diagnóstica de la IET con la de algunas técnicas de rutina (BAAR, ELISA) en la detección de casos de tuberculosis activa.

## HIPÓTESIS

La utilización de geles de poliacrilamida al 18 % para la separación de moléculas de bajo peso molecular de *M. tuberculosis* y la estandarización de la técnica de inmunoelectrotransferencia para evaluar la respuesta inmunológica hacia dichas moléculas permitirán contar con una técnica suficientemente específica y sensible para ser utilizada como prueba diagnóstica de tuberculosis activa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *MATERIAL BIOLÓGICO*

- Cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* en medio Lowenstein-Jensen.
- 94 sueros de individuos adultos tosedores clasificados clínicamente como sugerentes de tuberculosis, provenientes del servicio de Neumología del Hospital General de México.
- 20 sueros de individuos aparentemente sanos, provenientes del banco de sueros del IMSS Centro Médico La Raza.
- 14 sueros de individuos con lepra, obtenidos del banco de sueros del Departamento de Investigaciones Inmunológicas, INDRE.
- 16 sueros de pacientes con histoplasmosis, del laboratorio de Micología, INDRE.
- 12 sueros de pacientes con otras micosis, del laboratorio de Micología del INDRE.
- 18 sueros de pacientes con cisticercosis, del banco de sueros del Departamento de Investigaciones Inmunológicas, INDRE.
- Sueros negativos a tuberculosis, del IMSS La Raza.
- Sueros positivos a tuberculosis pulmonar comprobada por cultivo, del banco de sueros del Departamento de Investigaciones Inmunológicas, INDRE.

### *MATERIAL QUÍMICO Y EQUIPO*

- Sonicador *Cell Disruptor Model W-370*, Heat Systems; Ultrasonics.
- Estufa para medios de cultivo.
- Centrifuga refrigerada *Damon/IEC*.
- Microcentrifuga refrigerada *Hermle Z252M*.
- Campana de bioseguridad tipo II.
- Agitador mecánico.
- Equipo de electrotransferencia *Bio-Rad*.
- Equipo de electroforesis *Bio-Rad Protean II*.
- Fuente de poder *Bio-Rad*.
- Multiscreen *Bio-Rad*.
- Potenciómetro digital *Corning*.
- Material de vidrio *Pyrex* (matraces, tubos de ensaye, vasos, probetas, embudos, etc.)
- Balanza granataria *Ohaus*.
- Balanza analítica *Chyo*.
- Refrigerador (4°C).
- Congelador (-20°C).
- Ultracongelador (-70°C).
- Espectrofotómetro *Spectronic 21D*.
- Parrilla con temperatura variable.
- Micropipetas de 1-10µL, 10-100µL y 250-1000µL *Eppendorf*.
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL.
- Tubos *Eppendorf*.
- Filtros *MSI Cameo* de 0.45 y 0.22 µ.
- Baño María *Fisher Scientific*.
- Papel de nitrocelulosa *Bio-Rad*.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### *MATERIAL BIOLÓGICO*

- Cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* en medio Lowenstein-Jensen.
- 94 sueros de individuos adultos tosedores clasificados clínicamente como sugerentes de tuberculosis, provenientes del servicio de Neumología del Hospital General de México.
- 20 sueros de individuos aparentemente sanos, provenientes del banco de sueros del IMSS Centro Médico La Raza.
- 14 sueros de individuos con lepra, obtenidos del banco de sueros del Departamento de Investigaciones Inmunológicas, INDRE.
- 16 sueros de pacientes con histoplasmosis, del laboratorio de Micología, INDRE.
- 12 sueros de pacientes con otras micosis, del laboratorio de Micología del INDRE.
- 18 sueros de pacientes con cisticercosis, del banco de sueros del Departamento de Investigaciones Inmunológicas, INDRE.
- Sueros negativos a tuberculosis, del IMSS La Raza.
- Sueros positivos a tuberculosis pulmonar comprobada por cultivo, del banco de sueros del Departamento de Investigaciones Inmunológicas, INDRE.

### *MATERIAL QUÍMICO Y EQUIPO*

- Sonicador *Cell Disruptor Model W-370*, Heat Systems; Ultrasonics.
- Estufa para medios de cultivo.
- Centrífuga refrigerada *Damon/IEC*.
- Microcentrífuga refrigerada *Hermle Z252M*.
- Campana de bioseguridad tipo II.
- Agitador mecánico.
- Equipo de electrotransferencia *Bio-Rad*.
- Equipo de electroforesis *Bio-Rad Protean II*.
- Fuente de poder *Bio-Rad*.
- Multiscreen *Bio-Rad*.
- Potenciómetro digital *Corning*.
- Material de vidrio *Pyrex* (matraces, tubos de ensaye, vasos, probetas, embudos, etc.)
- Balanza granataria *Ohaus*.
- Balanza analítica *Chyo*.
- Refrigerador (4°C).
- Congelador (-20°C).
- Ultracongelador (-70°C).
- Espectrofotómetro *Spectronic 21D*.
- Parrilla con temperatura variable.
- Micropipetas de 1-10µL, 10-100µL y 250-1000µL *Eppendorf*.
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL.
- Tubos *Eppendorf*.
- Filtros *MSI Cameo* de 0.45 y 0.22 µ.
- Baño María *Fisher Scientific*.
- Papel de nitrocelulosa *Bio-Rad*.

## ***SOLUCIONES Y REACTIVOS***

- Medio Sauton a pH 7.2.
- Solución salina al 0.85 %.
- Solución de acrilamida para el gel separador (37.7% T 0.5% C<sub>bis</sub>).
- Solución de acrilamida para el gel concentrador (39.4% T 4.8% C<sub>bis</sub>).
- Buffer para el gel separador (Tris 3.0 M, pH 9.3).
- Buffer para el gel concentrador (Tris 0.5 M, pH 6.8).
- Dodecil sulfato de sodio al 10% *Bio-Rad*.
- Persulfato de amonio (psa) al 10% *Sigma*.
- Azul de bromofenol (0.5% w/v en etanol al 10%).
- Glicerol al 10% *Sigma*.
- Reactivo de Schiff.
- Acido peryódico al 0.25 % *Sigma*.
- Acido clorhídrico 2N.
- Acido acético al 7.5 % y al 10 %.
- Dicromato de potasio 3.4 mM.
- Acido nítrico 3.2 mM.
- Carbonato de sodio 0.28 M.
- Formaldehído 0.008 %.
- Metanol 40 % / ácido acético 10 %.
- Etanol 10 % / ácido acético 5 %.
- Nitrato de plata 0.020 M.
- Regulador de corrimiento.
- Regulador de muestra.
- Colorante de trabajo azul de Coomassie (ver anexo 1).
- Solución decolorante de geles teñidos con azul de Coomassie (ver anexo 1).
- Regulador de transferencia.
- PBS 0.01 M pH 7.4.
- PBS-Tween 0.1 %.
- PBS-Tween 0.1 %-albúmina sérica bovina 1.0 %.
- Rojo de Ponceau S *Sigma*.
- Anti-IgG humana en cabra-peroxidasa *Bio-Rad*.
- Tetracloruro de diaminobencidina (DAB).
- Marcadores de peso molecular *GIBCO* preteñidos (2.9-44 kDa).
- Carbonato de sodio 2 % en NaOH 0.1N.
- Tartrato de sodio al 2 %.
- Sulfato de cobre al 1 %.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu *Sigma*.
- Albúmina sérica bovina *Sigma* (0.2 mg /mL).
- Sudán negro B *Sigma*.
- Etanol 60 %.
- Propilenglicol al 85 %.

## ***METODOLOGÍA***

### **Obtención del extracto soluble**

1. Se inoculó en medio Sauton la cepa H37Rv y se incubó 5 semanas a 37°C<sup>43,44</sup>.
2. Se inactivó la masa bacteriana a 65°C por 30 minutos en baño María y se cosechó por filtración a través de papel filtro, se recolectó la masa bacilar con ayuda de un

## **SOLUCIONES Y REACTIVOS**

- Medio Sauton a pH 7.2.
- Solución salina al 0.85 %.
- Solución de acrilamida para el gel separador (37.7% T 0.5% C<sub>bis</sub>).
- Solución de acrilamida para el gel concentrador (39.4% T 4.8% C<sub>bis</sub>).
- Buffer para el gel separador (Tris 3.0 M, pH 9.3).
- Buffer para el gel concentrador (Tris 0.5 M, pH 6.8).
- Dodecil sulfato de sodio al 10% *Bio-Rad*.
- Persulfato de amonio (psa) al 10% *Sigma*.
- Azul de bromofenol (0.5% w/v en etanol al 10%).
- Glicerol al 10% *Sigma*.
- Reactivo de Schiff.
- Acido peryódico al 0.25 % *Sigma*.
- Acido clorhídrico 2N.
- Acido acético al 7.5 % y al 10 %.
- Dicromato de potasio 3.4 mM.
- Acido nítrico 3.2 mM.
- Carbonato de sodio 0.28 M.
- Formaldehído 0.008 %.
- Metanol 40 % / ácido acético 10 %.
- Etanol 10 % / ácido acético 5 %.
- Nitrato de plata 0.020 M.
- Regulador de corrimiento.
- Regulador de muestra.
- Colorante de trabajo azul de Coomassie (ver anexo 1).
- Solución decolorante de geles teñidos con azul de Coomassie (ver anexo 1).
- Regulador de transferencia.
- PBS 0.01 M pH 7.4.
- PBS-Tween 0.1 %.
- PBS-Tween 0.1 %-albúmina sérica bovina 1.0 %.
- Rojo de Ponceau S *Sigma*.
- Anti-IgG humana en cabra-peroxidasa *Bio-Rad*.
- Tetracloruro de diaminobencidina (DAB).
- Marcadores de peso molecular *GIBCO* preteñidos (2.9-44 kDa).
- Carbonato de sodio 2 % en NaOH 0.1N.
- Tartrato de sodio al 2 %.
- Sulfato de cobre al 1 %.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu *Sigma*.
- Albúmina sérica bovina *Sigma* (0.2 mg /mL).
- Sudán negro B *Sigma*.
- Etanol 60 %.
- Propilenglicol al 85 %.

## **METODOLOGÍA**

### **Obtención del extracto soluble**

1. Se inoculó en medio Sauton la cepa H37Rv y se incubó 5 semanas a 37°C<sup>43,44</sup>.
2. Se inactivó la masa bacteriana a 65°C por 30 minutos en baño María y se cosechó por filtración a través de papel filtro, se recolectó la masa bacilar con ayuda de un

abatelenguas y se lavó 3 veces con solución salina al 0.85 %. Se conservó en solución salina al 0.85 % en tubos con tapón de rosca hasta su uso, a -70°C.

3. Se sonicaron aproximadamente 15 g de la biomasa en baño de hielo durante 10 minutos a 118 watts con intervalos de 1 minuto.
4. Se centrifugó a 17000 g durante 20 minutos a 4°C.
5. Se desechó el precipitado, se colectó el sobrenadante y se filtró por 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$  para obtener finalmente el extracto soluble de *M. tuberculosis*.
6. Se determinó la concentración de proteínas del extracto por el método de Lowry <sup>45</sup> (ver anexo 2), y se obtuvo una concentración de 2.5 mg/mL. Se dividió en alícuotas y conservó hasta su uso a -70° C.

### Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

1. Se llevaron los reactivos para preparar geles a temperatura ambiente, es necesario preparar nuevos por lo menos cada mes y evitar la formación de componentes indeseables en la mezcla de monómeros.
2. Se lavaron los vidrios de las cámaras de electroforesis con detergente neutro líquido (extrán), secando al aire o con lavados de etanol.
3. Se armaron los vidrios formando un "sandwich" con los separadores, se ajustaron y colocaron en sus respectivos soportes, se marcó el límite de los geles con ayuda de la tarjeta alineadora.
4. Para asegurar que no existiera fuga se agregó agua a cada compartimiento, se vertió ésta y se secaron los compartimientos.
5. Se preparó el persulfato de amonio justo antes de usarse.
6. Se agregó en un matraz limpio cada reactivo para formar el gel separador y se vertió la mezcla hasta la marca dibujada en los vidrios <sup>46</sup>:

<i>Componente del gel separador</i>	<i>Cantidad para 2 geles chicos</i>
<i>Acrilamida</i>	<i>9.07 mL</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>1.75 mL</i>
<i>Glicerol al 10%</i>	<i>1.7 mL</i>
<i>Amortiguador del gel separador</i>	<i>4.24 mL</i>
<i>SDS al 10%</i>	<i>170 <math>\mu\text{L}</math></i>
<i>Persulfato de amonio al 10%</i>	<i>48 <math>\mu\text{L}</math></i>
<i>TEMED</i>	<i>24 <math>\mu\text{L}</math></i>

7. Después se agregaron lentamente unas gotas de isopropanol, lo cual permitió observar la formación del límite superior del gel separador. El tiempo en gelificar para un gel chico fue de aproximadamente 20 minutos.
8. Se lavó con agua para eliminar el exceso de alcohol y se secó.
9. Se prepararon las cantidades de extracto de *M. tuberculosis* de la siguiente forma:  
Para la IET se usaron 200 µg/gel preparativo y para las tinciones se usaron 40µg/carril en un gel con 5 carriles. Posteriormente se agregó un volumen igual de regulador de muestra y se hirvió la mezcla durante 90 segundos, se dejó enfriar y se agregó 1µL de azul de bromofenol por cada 100 µL de volumen total.
10. Se agregó en un matraz limpio cada reactivo para formar el gel concentrador <sup>46</sup>, se vertió la mezcla hasta el borde superior de los vidrios y se colocó el peine deseado.

<i>Componente del gel concentrador</i>	<i>Cantidad para 2 geles chicos</i>
<i>Acrilamida</i>	<i>2.52 mL</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>3.82 mL</i>
<i>Glicerol al 10%</i>	<i>1 mL</i>
<i>Amortiguador del gel separador</i>	<i>2.5 mL</i>
<i>SDS al 10%</i>	<i>100 µL</i>
<i>Persulfato de amonio al 10%</i>	<i>30 µL</i>
<i>TEMED</i>	<i>24 µL</i>

12. Se preparó el regulador de corrimiento.
13. Al término de la gelificación (10-15 minutos), se retiraron los peines y se lavó con agua.
14. Se ensamblaron los "sandwiches" de vidrio en el soporte que contiene los electrodos.
15. Se agregó el regulador de corrimiento en los 2 tanques de la cámara, el interior debe ser nuevo en cada corrida y el exterior puede usarse 3 ó 4 veces.
16. Se colocaron cuidadosamente los extractos en los carriles deseados.
17. Se colocaron 5 µL de los marcadores de bajo peso molecular *Gibco* en el carril correspondiente.
18. Se conectaron los cables a la fuente de poder y se ajustó la corriente empleada para cada gel:

	<i>1 gel</i>
<i>Gel concentrador</i>	<i>13 mA</i>
<i>Gel separador</i>	<i>16 mA</i>

19. Se procedió a teñir con las siguientes tinciones: azul de Coomassie, Sudán negro <sup>47</sup>, plata <sup>48</sup> y tinción de PAS <sup>47</sup> (ver anexo 3), o bien a transferir a papel de nitrocelulosa.

### Electrotransferencia<sup>49</sup>

1. En un recipiente se colocó la cantidad suficiente del regulador de transferencia pH 8.3 para cubrir las esponjas y papel filtro.
2. Los geles se sacaron cuidadosamente de los vidrios y se colocaron en otro recipiente conteniendo el mismo regulador. Se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Se cortó el papel de nitrocelulosa del tamaño del gel y también se hidrató, primero con agua (5 minutos) y luego en el regulador de transferencia (10 minutos).
4. Se alinearon tanto el papel de nitrocelulosa como el gel y se hicieron unas marcas con lápiz en el papel para reconocer los límites y orientación del gel. Es necesario revisar perfectamente que entre ellos no existan burbujas, ya que provocarían una mala transferencia de las proteínas al papel.
5. Se procedió a ensamblar los cassettes formados por la esponja, un pedazo del papel filtro, el papel de nitrocelulosa, el gel, papel filtro y esponja.
6. Cada cassette se incorporó al tanque de la cámara de transferencia lleno con el regulador y su refrigerante previamente congelado.
7. Se conectaron los electrodos de la tapa a la fuente de poder y se realizó la transferencia durante 1 hora a 100 volts o bien toda la noche a 80 mA. La cámara debe contener una barra magnética que disperse el calor generado por el voltaje además del refrigerante previamente congelado, y estar colocada encima de un agitador magnético.

### Inmunodetección

1. Una vez transcurrido el tiempo, se sacaron los cassettes y se tomó el papel de nitrocelulosa transferido, se tiñó con rojo de Ponceau S para verificar la correcta transferencia y después se destiñó con agua corriente. Se colocó en un recipiente con PBS-Tween 20 0.1% y se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno.
2. La membrana se bloqueó con PBS-Tween 20 0.1%-albúmina sérica bovina 1% durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
3. Se hicieron 3 lavados (10 min c/u) con PBS-Tween 20 0.1%.
4. Se acomodó la membrana de nitrocelulosa en el *multiscreen* (Bio-Rad).
5. Se diluyeron los sueros problema y los testigos 1:100 en PBS-Tween 20 0.1%-albúmina sérica bovina 0.1%. Se colocaron 500  $\mu$ L de la dilución de cada suero por carril y se incubó 1 hora a temperatura ambiente con agitación.
6. Se lavó 5 veces (6 minutos c/u) con PBS-Tween 20 0.1%.

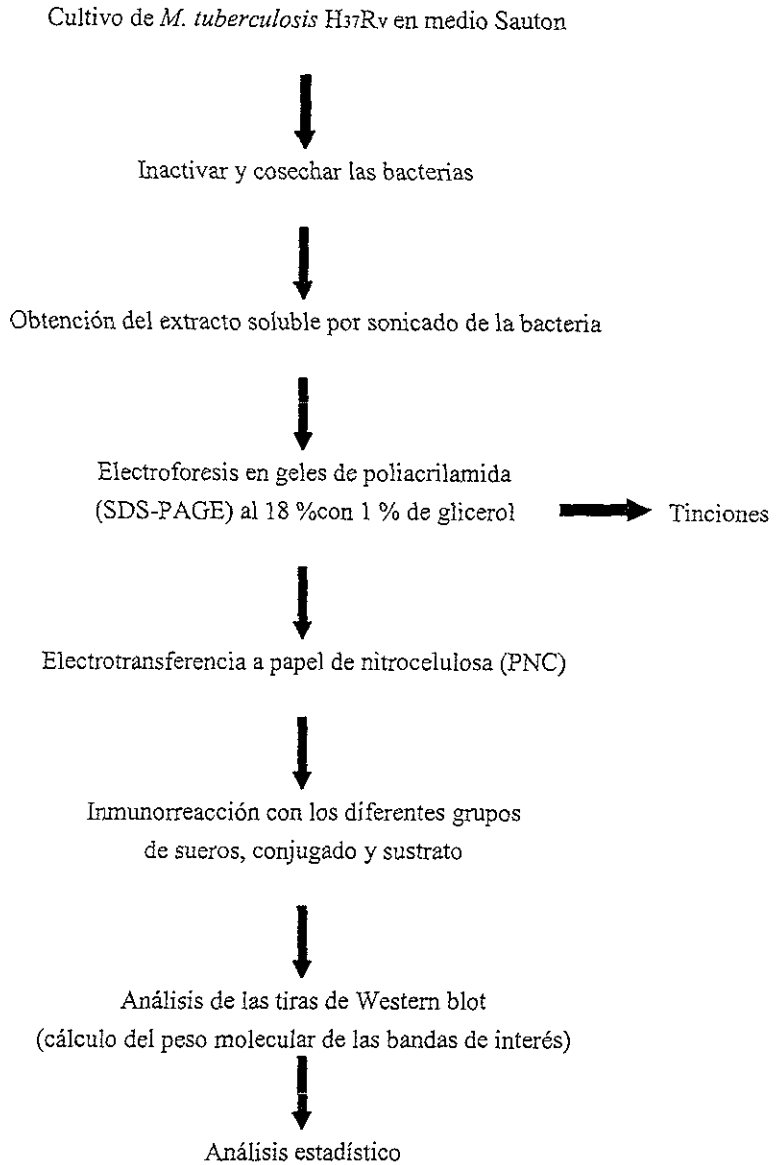
7. Se agregó el conjugado anti-IgG humana-peroxidasa *Bio-Rad* (diluido 1:500 en PBS-Tween 20 0.1%-leche 5%) e incubó 1 hora a temperatura ambiente y en agitación <sup>43</sup>.
8. Se lavó 5 veces (12 minutos c/u) con PBS-Tween 20 0.1%.
9. Finalmente se agregó el sustrato ( $H_2O_2$  al 30 %) y el cromógeno (DAB *Sigma*), que se prepararon justo antes de usarse, y se incubó 20 minutos hasta observar las bandas de color café. Se lavaron las tiras con suficiente agua destilada y se secaron al aire para el análisis posterior.

#### *Análisis de las tiras de Western blot*

El cálculo de el peso molecular de las bandas antigénicas reconocidas se efectuó por determinación del Rf (*distancia del límite del gel a la banda de interés / distancia del límite del gel hasta el frente del corrimiento*). Se comparó el patrón antigénico revelado por cada suero problema con el de los sueros testigo tanto negativos como positivos y se determinó la banda que discriminaba los casos positivos de los negativos a la enfermedad.

Estos resultados se compararon con resultados obtenidos en estudios aplicados al grupo de sueros problema: ELISA (con un extracto de *BCG*), realizado en el laboratorio de Investigaciones Inmunológicas del INDRE y cultivo en medio Lowenstein-Jensen y baciloscofia (BAAR) por la técnica de Zehl-Neelsen, efectuados en el laboratorio de Micobacterias del INDRE. Posteriormente se realizó el análisis estadístico correspondiente (ver anexo 4), tomando como estándar al cultivo.

## PLAN DE TRABAJO





## RESULTADOS

En la tabla 2 se muestra una comparación de los resultados de la IET con los resultados obtenidos en el cultivo en medio Lowenstein-Jensen, la prueba de ELISA y baciloscopia con Zehl-Neelsen para las 94 muestras estudiadas.

**Tabla 2.** Resultados de las pruebas aplicadas a la población de sueros problema.  
0 = resultado negativo; 1= resultado positivo; TBP= tuberculosis pulmonar;  
EPOC= enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

SUERO	EDAD	DIAGNÓSTICO	BAAR	C-LJ	ELISA	IET
1	27	TBP	0	0	0	1
2	39	Cáncer metastásico	0	0	0	0
3	62	Cáncer broncogénico	0	0	0	0
4	71	Cáncer broncogénico	0	0	1	1
5		Asma	0	0	1	1
6	22	Derrame pleural	0	0	1	0
7		Derrame pleural	0	0	0	0
8	62	Cáncer broncogénico	1	0	1	0
9	38	Neumonía	0	0	1	1
10	45	TBP III	1	1	1	1
11	33	TBP III reactivación	1	0	1	1
12	27	TBP (-) laringea	1	1	1	1
13	45	TBP III	1	1	0	0
14	38	TBP III	0	1	1	1
15	71	TBP III	0	1	1	1
16	50	Bronquitis crónica	0	0	0	0
17	25	TBP III	1	1	1	1
18	26	Bronquitis crónica	0	0	1	0
19	23	EPOC B	0	0	0	0
20	25	Bronquitis crónica	1	1	1	1
21	28	TBP III	1	1	1	1
22	43	Bronquitis crónica	0	0	1	0
23	19	TBP	1	1	0	1
24	29	EPOC	0	0	1	1
25	58	EPOC	0	0	1	0
26	52	EPOC	0	0	1	1
27	28	Bronquitis crónica	0	0	0	1
28	64	TBP	1	1	1	1
29	60	Bronquitis crónica	0	0	1	1
30	42	TBP III	0	0	1	0
31	55	TBP III	0	0	1	0
32	52	TBP III	1	1	1	0
33	37	TBP III	1	1	1	1

SUERO	EDAD	DIAGNÓSTICO	BAAR	C-LJ	ELISA	IET
34	39	TBP III	0	0	0	0
35	58	TBP III	1	1	1	1
36	65	TBP III	0	0	1	0
37	64	TBP III	0	1	0	0
38	26	TBP III	1	1	1	0
39	28	TBP III	1	1	1	1
40	38	TBP III	1	1	1	0
41	29	EPOC	0	0	0	0
42	24	Asma bronquial	0	0	0	0
43	54	Asma	0	0	0	0
44	19	TBP III prob Renal	1	1	1	1
45	36	EPOC	0	0	0	1
46	69	Bronquitis	0	0	0	0
47	39	Bronquitis asmático	0	0	0	1
48	33	TBP III	1	1	1	1
49	49	Bronquiectasias	0	0	1	1
50	71	Bronquitis crónica	0	0	0	0
51	25	Bronquitis crónica	0	0	0	0
52	46	Bronquitis crónica	0	0	0	0
53	21	Asma bronquial	0	0	0	0
54	55	TB miliar	1	0	0	0
55	31	Bronquitis crónica	0	0	0	0
56	79	Bronquitis crónica	1	0	0	0
57	60	Bronquitis crónica	0	0	0	0
58	58	Bronquitis crónica	0	0	0	0
59	63	Bronquitis crónica	0	0	0	0
60	23	TBP III	1	1	1	1
61	65	Derrame pleural	0	0	0	0
62	74	Bronquitis crónica	0	0	0	0
63	61	Derrame pleural	0	0	0	1
64	74	Prob. Cáncer broncogénico	0	0	1	0
65	45	Hemoptisis en estudio	1	1	1	0
66	38	Granuloma faríngeo	0	0	0	0
67	40	TBP III	0	0	1	1
68	60	Cáncer broncogénico	0	0	1	1
69	55	Prob. TBP	1	1	1	1
70	56	Empiema izquierdo	0	0	0	0
71	49	Prob. Absceso pulmonar	0	0	0	0
72	73	Bronquitis crónica	0	0	0	0
73	72	Prob. Cáncer broncogénico	0	0	1	0
74	60	TB V	0	0	1	0
75	30	TBP III	1	1	1	1
76	50	Prob. TBP	0	0	1	0
77	18	TBP III	0	1	1	1
78	53	COR Pulmonalle	0	0	0	1
79	55	Asma	0	0	0	0

SUERO	EDAD	DIAGNÓSTICO	BAAR	C-LJ	ELISA	IET
80	64	Cáncer broncogénico	0	0	0	0
81	35	TBP III	0	0	1	1
82	73	EPOC	0	0	0	0
83	75	Hemoptisis	0	0	1	1
84	66	EPOC	0	0	1	0
85	60	Cáncer pulmonar	0	0	1	0
86	45	TBP III	1	1	1	1
87	21	Aspergilloma pulmonar	0	0	0	0
88	20	TBP III	0	0	1	0
89	51	Asma	0	0	0	0
90	69	Neumonía basal	0	0	1	0
91	38	TBP III	1	1	1	1
92	71	TBP III	0	1	0	0
93	25	TBP III	1	1	0	0
94	40	TBP III	1	1	1	1

## ESTIMACIÓN DE LA CALIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS TÉCNICAS USADAS

Se aplicaron 4 aspectos para evaluar la calidad de las técnicas empleadas, tomando como estándar al cultivo en medio Lowenstein-Jensen: *sensibilidad (s)*, *especificidad (sp)*, *valor predictivo de positividad (VPP)* y *valor predictivo de negatividad (VPN)* (ver anexo 4) <sup>50,51</sup>.

### IET

	Enfermedad +	Enfermedad -	Total
W-B +	21	18	39
W-B -	8	47	55
Total	29	65	94

$$s = (21 / 29) 100 = 72.4 \% \quad sp = (47 / 65) 100 = 72.3 \%$$

$$VPP = (21 / 39) 100 = 53.8 \% \quad VPN = (47 / 55) 100 = 85.5 \%$$

### BAAR

	Enfermedad +	Enfermedad -	Total
BAAR +	24	4	28
BAAR -	5	61	66
Total	29	65	94

$$s = (24 / 29) 100 = 82.8 \% \quad sp = (61 / 65) 100 = 93.8 \%$$

$$VPP = (24 / 28) 100 = 85.7 \% \quad VPN = (61 / 66) 100 = 92.4 \%$$

### ELISA

	Enfermedad +	Enfermedad -	Total
ELISA +	24	28	52
ELISA -	5	37	42
Total	29	65	94

$$s = (24 / 29) 100 = 82.8 \% \quad sp = (37 / 65) 100 = 56.9 \%$$

$$VPP = (24 / 52) 100 = 46.2 \% \quad VPN = (37 / 42) 100 = 88.1 \%$$

Tabla 3. Índice operativo de las pruebas aplicadas e intervalo de confianza al 95 %.

MÉTODO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
BAAR	82.8 % (69.1-96.6)	93.8 % (88.0-99.6)	85.7 % (72.7-98.7)	92.4 % (86.0-98.8)
ELISA	82.8 % (69.1-96.6)	56.9 % (44.9-68.9)	46.2 % (32.6-59.8)	88.1 % (78.3-97.9)
IET	72.4 % (56.1-88.7)	72.3 % (61.4-83.2)	53.8 % (38.2-69.4)	85.5 % (75.8-95.2)

### PRUEBA DE CONCORDANCIA DE LAS TÉCNICAS APLICADAS

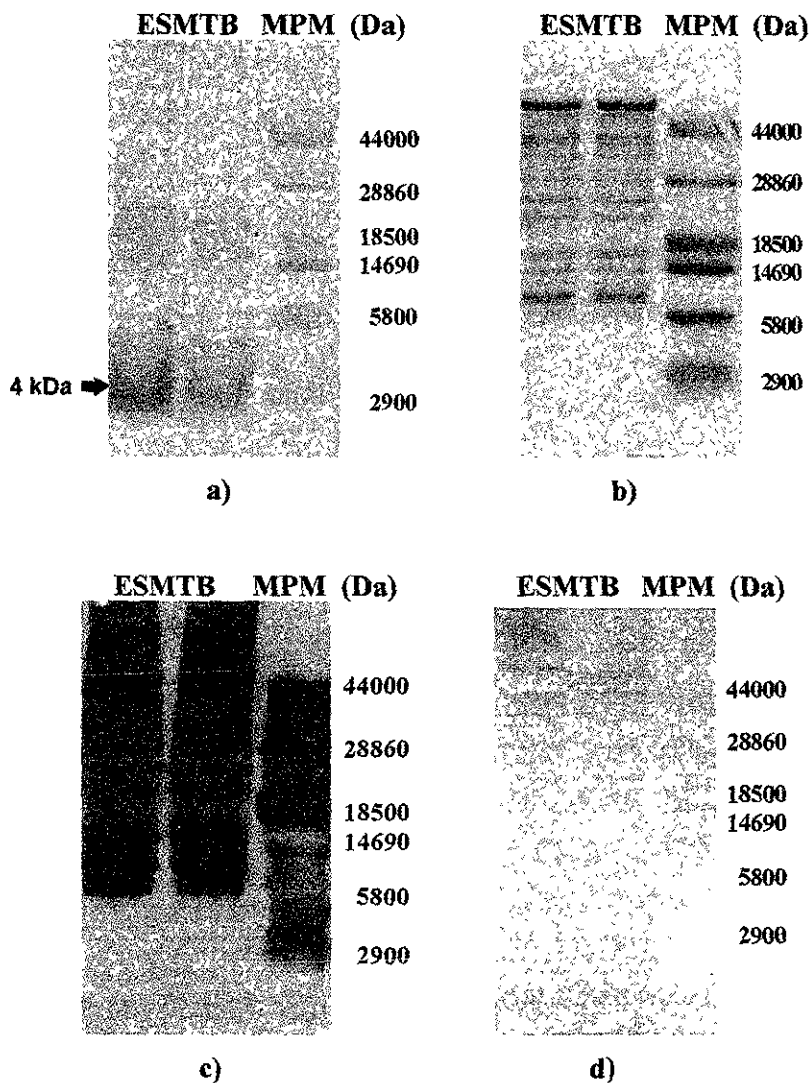
Este análisis es de utilidad para saber si los diferentes métodos aplicados tratan de igual manera los casos similares, es decir para averiguar si los métodos detectan la misma proporción de casos y si dichos casos son los mismos. Se aplica la *K* de Cohen como medida de concordancia; esta se basa en comparar la concordancia observada en un conjunto de datos con respecto a la que podría ocurrir por simple azar<sup>50</sup>. Con ayuda del programa estadístico *SPSS Versión 6.1.4* obtenemos los valores de este estimador de concordancia para las distintas técnicas aplicadas (tabla 4), en relación al cultivo:

Tabla 4. Concordancia con respecto al cultivo Lowenstein-Jensen.

METODO	KAPPA (K)	ERROR ESTANDAR (ES)	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 %	SIGNIFICANCIA (p)
BAAR	0.7734	0.0715	0.6333-0.9135	0.0000
ELISA	0.3254	0.0843	0.1602-0.4906	0.0003
W-B	0.4082	0.0948	0.2224-0.5940	0.0000

En la figura 1 se muestra el corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida al 18 % con 1 % de glicerol, del extracto soluble de *M. tuberculosis* en el cual se caracterizó a la molécula de 4 kDa por tinción con Sudán Negro B, con lo cual se demuestra cierta naturaleza lipídica de la molécula antigénica. También se muestran otras tinciones ensayadas para reafirmar lo anterior.

La banda de 4 kDa fue utilizada para discriminar los casos positivos de los negativos en la prueba de IET, cuyos resultados se muestran en las figuras 2, 3, 4 y 5.



**Figura 1.** SDS-PAGE al 18 % con 1 % de glicerol del extracto soluble de *M. tuberculosis* (ESMTB) en condiciones reductoras. Se ensayaron diferentes tinciones: a) Sudán negro, en donde se observa la banda de interés de 4 kDa, b) azul de Coomassie, c) Plata y d) PAS. Los pesos moleculares de los marcadores se indican en Daltones en el extremo derecho de cada figura.

El cálculo del peso molecular se realizó por determinación del Rf como se muestra:

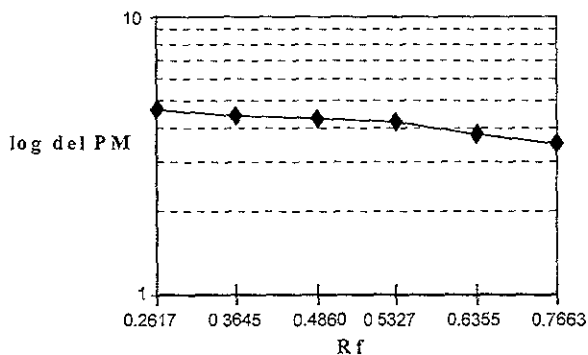
**Tabla 5.** Marcadores de bajo peso molecular (MPM) preteñidos (Gibco)

<i>Componente</i>	<i>Peso molecular reportado (Da)</i>
Insulina ( $\alpha$ y $\beta$ )	2900
Inhibidor de tripsina bovina	5800
Lisozima	14690
$\beta$ -lactoglobulina	18500
Anhidrasa carbónica	28860
Ovalbúmina	44000

**Tabla 6.** Elaboración de la curva estándar de marcadores de bajo peso molecular

<i>Distancia recorrida por el MPM (cm)</i>	<i>Eje X: Rf de cada MPM (distancia/5.35 cm)</i>	<i>Eje Y (log del peso molecular)</i>
4.1	0.7663	3.4624
3.4	0.6355	3.7634
2.85	0.5327	4.1670
2.6	0.4860	4.2672
1.95	0.3645	4.4603
1.4	0.2617	4.6435

**Figura 2.** Curva estándar de marcadores de bajo peso molecular



$$y = mx + b; \quad \log_{10}PM = m(Rf) + b$$

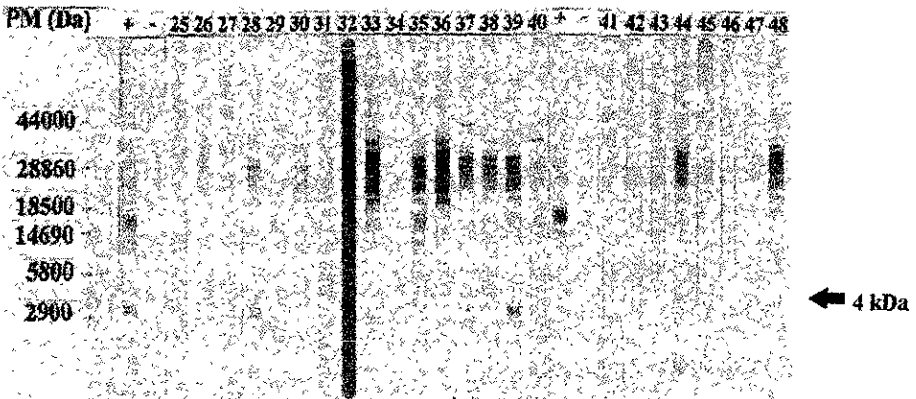
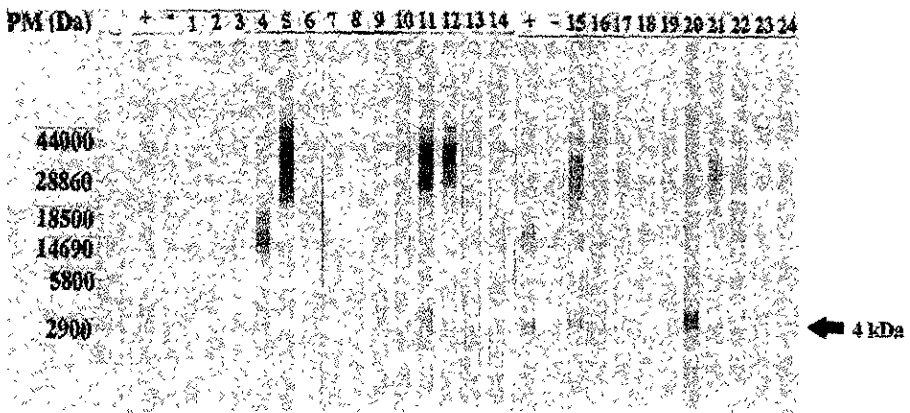
donde  $b = 5.3410$ ;  $m = -2.3902$ ;  $r^2 = 0.9707$

Interpolando el Rf de la banda de interés ( $3.9 / 5.35 = 0.729$ ) en la curva estándar y calculando el antilog, el peso molecular obtenido es de **3.97 kDa**.

En los resultados de la IET del grupo de 94 individuos con síntomas sugerentes de tuberculosis se observa reconocimiento de una molécula de 4 kDa por 39 de los sueros, lo cual no ocurre en los restantes 55 sueros del mismo grupo ( ver figuras 3 y 4).

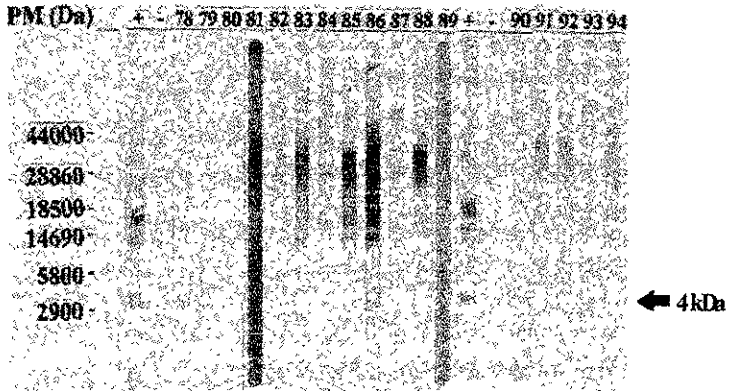
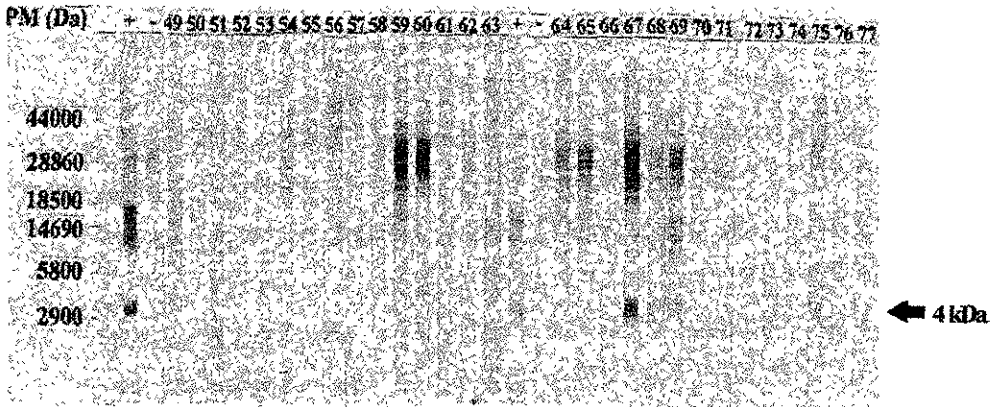
En los grupos de sueros testigos negativos a tuberculosis y de individuos con otras enfermedades pulmonares no tuberculosas, tales como histoplasmosis o nocardiosis, que se muestran en las figuras 5 y 6 se destaca lo siguiente:

- Ninguno de los sueros testigo negativo mostró reactividad contra la banda de interés.
- De los sueros de individuos leproso sólo uno (el número 4) mostró reacción contra la banda de 4 kDa.
- En los sueros de individuos con cisticercosis sólo hay reacción muy débil de uno de ellos (el número 14) con el antígeno de 4 kDa.
- Ninguno de los sueros de individuos con histoplasmosis mostró reactividad en la prueba contra la banda de interés.
- De los individuos con otras micosis se encontró que 4 de ellos (3, 4, 5 y 9) tuvieron reacción contra el antígeno de 4 kDa. Uno de ellos de una persona con infección por *Actinomyces madurae* (el número 3), los sueros 4 y 9 corresponden a individuos infectados con *Nocardia brasiliensis* y el suero 5 es de un individuo infectado por *M. grisea*

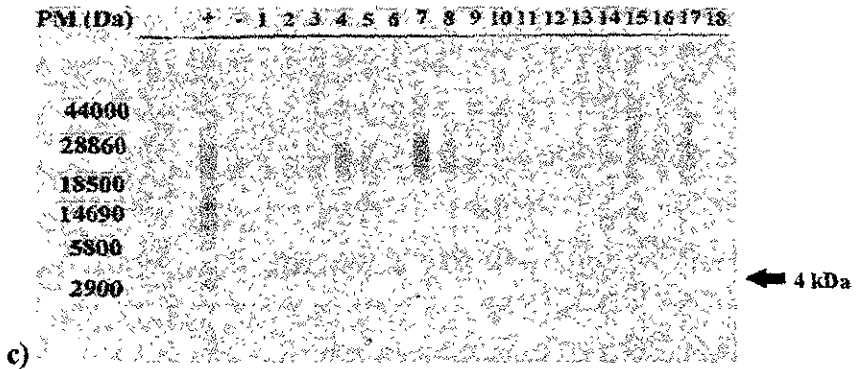
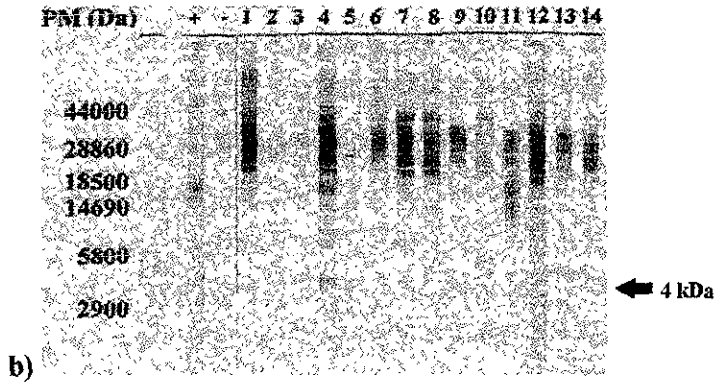
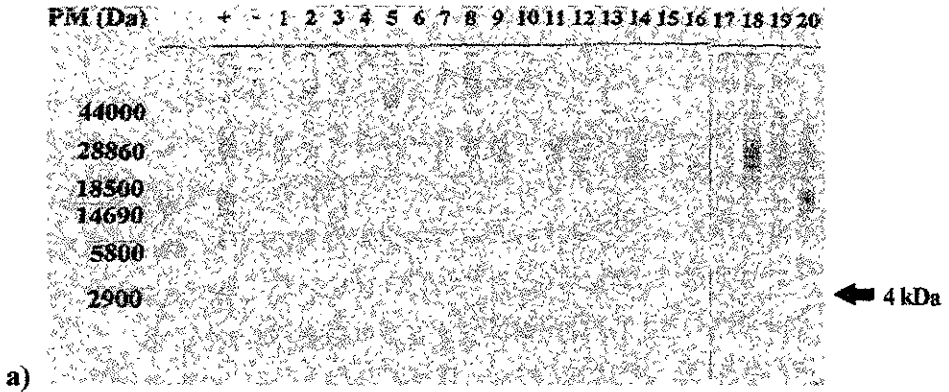


**Figura 3.** Análisis por IET del grupo de sueros de individuos con síntomas sugerentes de tuberculosis (1-48). Se señala la banda de interés de 4 kDa y en el extremo izquierdo se señalan los pesos moleculares (PM) de los marcadores, expresados en Daltones; además se incluyen un control positivo (+) y uno negativo (-).

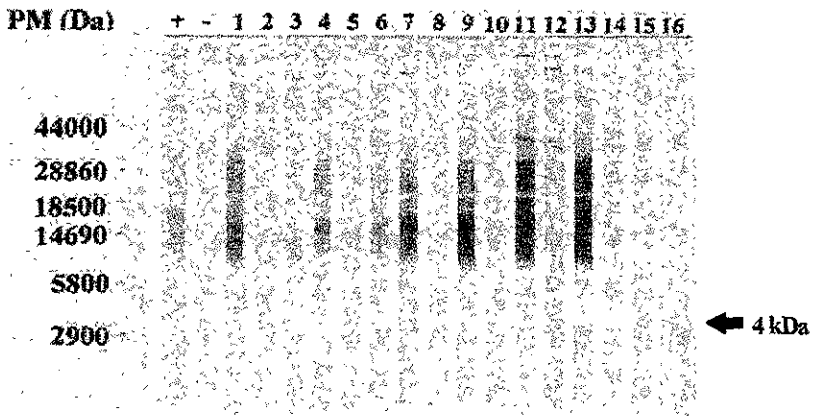




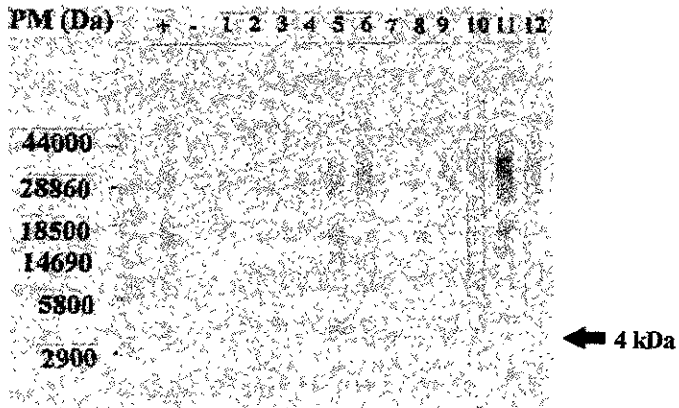
**Figura 4.** Análisis por IET del grupo de sueros de individuos con síntomas sugerentes de tuberculosis (49-94). Se señala la banda de interés de 4 kDa y en el extremo izquierdo se señalan los pesos moleculares (PM) de los marcadores, expresados en Daltones; además se incluyen un control positivo (+) y uno negativo (-).



**Figura 5. a)** IET con sueros de individuos sanos (1-20), **b)** IET con sueros de individuos leprosos (1-14) y **c)** IET con sueros de individuos con cisticercosis (1-18). Se señala la banda de interés de 4 kDa y los marcadores de peso molecular en Daltones.



a)



b)

**Figura 6.** a) IET con sueros de individuos con histoplasmosis, b) IET con sueros de individuos con otras infecciones micóticas, en donde se observa reacción hacia la molécula de 4 kDa en los sueros 3, 4, 5 y 9. Los pesos moleculares de los marcadores se indican en el extremo izquierdo y se incluyen el control (+) y el control (-).

## DISCUSIÓN

El resurgimiento de la tuberculosis en los países desarrollados en donde se le había considerado controlada y su prevalencia como problema de salud pública en los subdesarrollados, obliga a la búsqueda de casos de tuberculosis activa en la población para poder establecer mejores programas de vigilancia epidemiológica y limitar la posibilidad de la infección por estos pacientes a sus contactos <sup>52</sup>.

Además de las limitaciones inherentes a cada fase del padecimiento (inespecificidad de los signos y síntomas clínicos o la necesidad de expulsar más de 10000 bacilos/mL para una baciloscopia positiva, por citar solo dos ejemplos), hay múltiples causas para entorpecer la eficiencia de los procedimientos diagnósticos “convencionales” (hallazgo de bacilos ácido-alcohol resistentes en la baciloscopia y, mejor aún, el cultivo del agente causal), tales como la edad del paciente (muy jóvenes o ancianos), la forma pulmonar no sea productiva, se trate de tuberculosis extrapulmonar o esté presente un estado avanzado de inmunodeficiencia, especialmente si está causado por el VIH. Por otra parte se debe tomar en cuenta que las condiciones óptimas para realizar el diagnóstico no siempre se encuentran disponibles, su costo puede estar muy por encima de las capacidades económicas del país con el problema y muchas veces la oportunidad con la cual se requieren los resultados es menor a el tiempo necesario para obtenerlos utilizando métodos convencionales <sup>14, 53, 54</sup>.

El estudio demostró mediante la IET el reconocimiento de una banda antigénica de muy bajo peso molecular (4 kDa) de un ESMTB cepa H37Rv, por anticuerpos IgG en sueros de individuos con enfermedad tuberculosa activa; dicho antígeno, presumiblemente de naturaleza lipídica demostrada por una tinción específica para lípidos (Sudán negro), no es fracción de alguna molécula de mayor tamaño, lo cual se comprobó al correr el mismo extracto en un gel en condiciones no reductoras (resultados no mostrados).

Este resultado es importante porque hasta ahora no se ha considerado como antígeno de relevancia inmunológica en la tuberculosis a ninguna molécula de tal naturaleza y peso molecular, y que sin embargo no resulta extraño si consideramos que 60 % del total de los componentes de la pared micobacteriana, de gran importancia en su patogenicidad, son lípidos <sup>7</sup>.

Se ha observado respuesta inmunológica hacia un antígeno proteínico de 4.8 kDa en

pacientes con tuberculosis pulmonar activa, aunque su frecuencia es muy baja (10 %), así como contra un antígeno también de naturaleza proteínica de 10.5 kDa, el cual sí presenta una mayor frecuencia de respuesta (80 %) en estos individuos<sup>55</sup>, también algunas moléculas proteínicas de secreción purificadas, como el antígeno de 6 kDa (ESAT-6), parecen activar una respuesta de células T, aunque esto sólo se ha probado en modelos murinos<sup>56</sup>.

Así como lo anterior, la mayoría de estudios realizados para caracterizar antígenos de importancia, en el desarrollo de la enfermedad tuberculosa, mencionan como relevantes solamente a antígenos de naturaleza proteínica, tales como la glicoproteína de 38 kDa, la de más alta especificidad, presente solamente en el complejo *M. tuberculosis*<sup>40, 41</sup>, la cual sin embargo no provoca respuesta inmunológica en el 100 % de casos confirmados, y la molécula de 65 kDa, una proteína de choque térmico relevante presente también en otras micobacterias y con homología substancial con otras proteínas de choque térmico, incluyendo la proteína GroEL de *Escherichia coli*<sup>20</sup>.

La proteína de 30 kDa también se ha caracterizado como inmunodominante, así como algunas moléculas de naturaleza carbohidrato como la lipoarabinomanana y la arabinogalactana, sin embargo estas moléculas son comunes a otras micobacterias, nocardias y corinebacterias y, por tanto no tienen la especificidad necesaria para ser utilizadas en pruebas diagnósticas de esta enfermedad<sup>5, 20</sup>.

Por todo esto, aún con sus limitaciones, el cultivo sigue siendo la prueba confirmativa de casos de tuberculosis activa<sup>3</sup>, y por ello en éste estudio se tomó como “estándar de oro” para comparar los resultados obtenidos.

Se piensa que la respuesta de anticuerpos no refleja la inmunidad celular anti-tuberculosa, y aún más, que puede ser inespecífica por la reactividad cruzada con proteínas micobacterianas atípicas<sup>58</sup>, sin embargo, aunque en este trabajo se encontró una comparación regular entre los resultados obtenidos por la técnica de IET y la presencia de bacilos que se identificaron como *M. tuberculosis* después del cultivo en medio Lowenstein-Jensen, es posible que mejore si se purifica el antígeno de 4 kDa, lo cual demostraría que si es importante la respuesta de anticuerpos para el diagnóstico.

Los resultados fueron menos afortunados en el caso de la prueba de ELISA, aunque debemos tomar en cuenta que ésta lleva como antígeno un extracto soluble de BCG y esto

la hace menos comparable con los resultados de la IET.

Después del correspondiente análisis estadístico se estimaron resultados solamente regulares para la técnica de IET (72.4 % de sensibilidad y 72.3 % de especificidad) indicativos de semejante capacidad de identificar a los que presentan la enfermedad (verdaderos positivos) como a los exentos de ella (verdaderos negativos) en una población con una prevalencia del 30 % de la enfermedad tuberculosa, aunque su valor predictivo para distinguir a individuos sanos es significativamente mayor que para distinguir a los enfermos.

En relación a las otras pruebas aplicadas al grupo de sueros problema, el BAAR demostró mejores resultados (sensibilidad =82.8 %, especificidad =93.8%) y semejantes valores predictivos (VPP= 85.7 % y VPN=92.4 %), estos la hacen una prueba muy confiable, mientras la prueba de ELISA como ya se esperaba tiene una mayor sensibilidad (82.8 %), pero una pobre especificidad (56.9 %), aunque su valor predictivo para identificar casos negativos es alto (88.1 %) en comparación de su VPP (46.2 %).

En cuanto a la concordancia de las pruebas aplicadas, la IET presenta un valor de kappa muy bajo en relación al cultivo, lo cual significa que no se puede considerar como una prueba alternativa para el diagnóstico de tuberculosis activa, sino solamente como una prueba complementaria, al igual el ensayo de ELISA presenta incluso una menor concordancia. Por otro lado el BAAR presenta una concordancia significativa con el cultivo, lo cual confirma su gran utilidad para una rápida detección de casos por su alta sensibilidad y especificidad.

Por otro lado, se evaluó la reactividad cruzada de la IET considerando la molécula de 4 kDa y se observó reacción de dicho antígeno con anticuerpos IgG en sueros de individuos con infecciones con actinomicetos como *Actinomyces madurae* y *Nocardia brasiliensis*, lo cual se sabe ocurre también con la lipoarabinomanana y otros antígenos importantes de *M. tuberculosis*, que reaccionan además contra *Histoplasma sp* y con BCG<sup>5,20,57</sup>.

Estos resultados demuestran que es difícil que la prueba de IET sola y en general las pruebas serológicas, puedan tomar un papel equiparable al de las pruebas bacteriológicas en relación al diagnóstico confirmatorio de la enfermedad tuberculosa activa, por ser pruebas indirectas donde se mide respuesta de anticuerpos, los cuales como ya vimos, pueden tener

reacción inespecífica o cruzada con antígenos de otras micobacterias e incluso de otros géneros. Además la respuesta inmunológica en esta enfermedad está determinada principalmente por la acción de células y no de anticuerpos y esto hace a la demostración de la presencia del agente etiológico lo más confiable para el diagnóstico confirmatorio, aunque esto implique una mayor demora en los resultados.

Aún con todo lo anterior, no se descarta a la IET para ser utilizada como prueba de tamizaje como es utilizada la prueba de ELISA, o en conjunto apoyar en forma importante en casos de difícil decisión.

## CONCLUSIONES

Existen una gran variedad de moléculas antigénicas en el bacilo tuberculoso involucradas en la respuesta de anticuerpos por el individuo afectado, y ninguna de ellas tiene una especificidad absoluta para *M. tuberculosis*.

El empleo de geles con una alta concentración de acrilamida (18 %) y con glicerol permitió una buena separación de los componentes de bajo peso molecular en un extracto soluble de *M. tuberculosis*, y de entre ellos identificar por IET a la molécula de 4 kDa como un antígeno con cierta relevancia inmunológica, la cual tal vez podría aumentar si es purificado, y aún más si para un estudio posterior se lograra obtener un anticuerpo monoclonal contra dicha molécula.

La estandarización de una técnica involucra la variabilidad de una gran cantidad de factores, y dicha variabilidad sólo con la constante experimentación es posible reducirla al mínimo hasta lograr obtener resultados consistentes haciendo la prueba reproducible, lo cual es una condición obligada para considerar a cualquier estudio como válido.

Los valores de sensibilidad y especificidad de la técnica de IET, obtenidos en la investigación, no resultaron satisfactorios para poder considerarla como una prueba diagnóstica única, sino como prueba complementaria con las ya bien establecidas (cultivo, BAAR), en la búsqueda de casos, y al igual ocurrió con la técnica de ELISA, sin embargo juntas podrían ser de utilidad en algunos casos extrapulmonares o paucibacilares, donde mayores limitaciones demuestran las técnicas bacteriológicas.

reacción inespecífica o cruzada con antígenos de otras micobacterias e incluso de otros géneros. Además la respuesta inmunológica en esta enfermedad está determinada principalmente por la acción de células y no de anticuerpos y esto hace a la demostración de la presencia del agente etiológico lo más confiable para el diagnóstico confirmatorio, aunque esto implique una mayor demora en los resultados.

Aún con todo lo anterior, no se descarta a la IET para ser utilizada como prueba de tamizaje como es utilizada la prueba de ELISA, o en conjunto apoyar en forma importante en casos de difícil decisión.

## CONCLUSIONES

Existen una gran variedad de moléculas antigénicas en el bacilo tuberculoso involucradas en la respuesta de anticuerpos por el individuo afectado, y ninguna de ellas tiene una especificidad absoluta para *M. tuberculosis*.

El empleo de geles con una alta concentración de acrilamida (18 %) y con glicerol permitió una buena separación de los componentes de bajo peso molecular en un extracto soluble de *M. tuberculosis*, y de entre ellos identificar por IET a la molécula de 4 kDa como un antígeno con cierta relevancia inmunológica, la cual tal vez podría aumentar si es purificado, y aún más si para un estudio posterior se lograra obtener un anticuerpo monoclonal contra dicha molécula.

La estandarización de una técnica involucra la variabilidad de una gran cantidad de factores, y dicha variabilidad sólo con la constante experimentación es posible reducirla al mínimo hasta lograr obtener resultados consistentes haciendo la prueba reproducible, lo cual es una condición obligada para considerar a cualquier estudio como válido.

Los valores de sensibilidad y especificidad de la técnica de IET, obtenidos en la investigación, no resultaron satisfactorios para poder considerarla como una prueba diagnóstica única, sino como prueba complementaria con las ya bien establecidas (cultivo, BAAR), en la búsqueda de casos, y al igual ocurrió con la técnica de ELISA, sin embargo juntas podrían ser de utilidad en algunos casos extrapulmonares o paucibacilares, donde mayores limitaciones demuestran las técnicas bacteriológicas.



## PERSPECTIVAS

La purificación de la molécula de 4 kDa podría tal vez hacerla útil para el diagnóstico, ya sea por la técnica de IET o por otra técnica serológica como el ELISA.

También sería conveniente para otros estudios el comparar una IET de extracto soluble de *M. tuberculosis* o si es posible de la molécula de 4 kDa purificada, con una IET de extracto soluble de *M. bovis* BCG, usando sueros de pacientes y de controles vacunados con BCG, porque debido al amplio uso de esta vacuna se hace necesario discriminar entre respuesta a antígenos de la vacuna y aquella inducida específicamente hacia la infección activa, la cual en este caso estaría siendo evaluada por respuesta hacia el antígeno de interés de 4 kDa.

Por otro lado, los grandes avances que se están logrando en el campo de la biología molecular tal vez puedan resolver a futuro muchos de los problemas presentes con los estudios convencionales para poder establecer un diagnóstico oportuno y confiable de esta enfermedad, que ha resurgido con gran fuerza, afectando principalmente a países en desarrollo como México, en donde encuentra las condiciones propicias por la acentuada falta de condiciones de higiene y educación en zonas de población densa.

## ANEXO 1

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

#### *CULTIVO*

##### *Medio Sauton:*

L-Asparagina	4.0 g
Acido cítrico-H <sub>2</sub> O	2.0 g
Sulfato de magnesio-7 H <sub>2</sub> O	0.5 g
Fósforo dipotásico	0.5 g
Citrato de amonio férrico	0.05 g
Glicerol	60 mL
H <sub>2</sub> O destilada	Aforar a 1000 mL

Disolver todo calentando. Se ajusta el pH a 7.2 y por cada 10 mL del medio se agregan 2 gotas de tween 20. Se distribuye en matraces y se esteriliza en autoclave.

#### *ELECTROFORESIS*

##### *Solución de acrilamida para el gel separador (37.7% T 0.5% C<sub>bis</sub>)*

Acrilamida	37.5 g
Bisacrilamida	0.1875 g
Agua destilada	100 mL

##### *Solución de acrilamida para el gel concentrador (39.4% T 4.8% C<sub>bis</sub>)*

Acrilamida	37.5 g
Bisacrilamida	1.875 g
Agua destilada	100 mL

##### *Solución amortiguadora para el gel separador (Tris 3.0 M, pH 9.3)*

Tris-base	16.1 g
Tris-HCl	2.7 g
Agua destilada	50 mL

##### *Solución amortiguadora para el gel concentrador (Tris 0.5 M, pH 6.8)*

Tris-base	0.075 g
Tris-HCl	3.85 g
Agua destilada	50 mL

##### *Dodecil sulfato de sodio al 10%*

SDS	100 g
Agua destilada	1 litro

***Persulfato de amonio (psa) al 10%***

Psa	100 mg
Agua destilada	1.0 mL

***Azul de bromofenol (0.5% w/v en etanol al 10%)***

Azul de bromofenol	50 mg
Etanol al 10%	10 mL

***Glicerol al 10%***

***Regulador de corrimiento***

Glicina	142.7 g
Tris-base	25.66 g
Tris-HCl	6.14 g
SDS al 10 %	50 mL
Agua destilada	aforar a 5 L

***Regulador de muestra***

Regulador del gel concentrador (4)	1.25 mL
SDS al 10%	1.0 mL
Glicerol	1.5 mL
Ditiotreitol (DTT)	23 mg
Agua destilada	6.05 mL

Combinar un volumen de muestra con un volumen igual de regulador de muestra. Hervir por 90 segundos y agregar 1  $\mu$ L de azul de bromofenol por cada 100  $\mu$ L de volumen total.

***TINCIÓN DE PROTEÍNAS***

***Solución madre para la tinción de proteínas con azul de Coomassie***

Azul de Coomassie R-250	2 g
Agua tridestilada	200 mL

Disolver en agua caliente, filtrar en papel Wathman No.1 y conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

***Colorante de trabajo azul de Coomassie***

Solución madre de azul de Coomassie	31.3 mL
Metanol	125 mL
Acido acético glacial	25 mL
Agua tridestilada	68.7 mL

Mezclar, llevar a 250 mL, y filtrar por papel Wathman No.1, conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

*Solución decolorante de geles teñidos con azul de Coomassie*

Metanol	500 mL
Acido acético glacial	100 mL
Agua tridestilada	400 mL

**ELECTROTRANSFERENCIA**

*Regulador de transferencia*

Tris-base	3.02 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 mL
Agua tridestilada	800 mL

Se ajusta el pH a 8.3 con NaOH 1M, se afora a 1 litro y se conserva en refrigeración.

*PBS 0.01 M pH 7.4*

NaCl	0.06 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	12.8 g
Agua destilada	Aforar a 1L después de ajustar el pH.

*PBS-Tween 0.1%*

PBS 0.01M pH 7.4	1 litro
Tween 20	1 mL

*Solución de bloqueo: PBS-Tween 0-1%-albúmina sérica bovina 1%*

PBS-Tween 0.01%	50 ml
Albúmina sérica bovina	0.5 g

*Colorante rojo de Ponceau S*

Acido tricloroacético	3 g
Agua tridestilada	100 mL
Rojo de Ponceau S	20 mg

*Sueros problema y controles negativos*

Diluidos 1:100 en solución PBS-Tween 0.1%-albúmina sérica bovina 0.1 %

*Conjugado anti-IgG humana en cabra-HRPO (Bio-Rad)*

Diluir 1:500 en PBS-Tween 0.1%-leche 5%

*Tetracloruro de diamino bencidina (DAB)*

5 mg de DAB
10 mL de Tris 0.05 M pH 7.4
3 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## ANEXO 2

### DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR LA TÉCNICA DE LOWRY

#### SOLUCIONES :

- 1.- Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 2 % en NaOH 0.1 N
- 2.- Tartrato de sodio al 2 %.
- 3.- Sulfato de cobre al 1 %.

Solución A (estable 1 día): 50 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % en NaOH 0.1 N.  
 0.5 mL de tartrato de sodio al 2 %.  
 0.6 mL de sulfato de cobre al 1 %.

Solución B : Reactivo de Folin Ciocalteu 1 :1 en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

Solución C : Solución estándar de proteínas : albúmina sérica bovina (BSA) 0.2 mg/mL = 20 mg/100 mL.

#### PROCEDIMIENTO :

Preparar una curva de calibración con las siguientes concentraciones : 5, 10, 20, 40, 80, 100 y 200  $\mu\text{g}$  de BSA/ mL y las diluciones problema como se indica en el siguiente cuadro:

TUBO	0	1	2	3	4	5	6	7	8*	9*
$\mu\text{L}$ de proteína	--	25	50	100	200	400	500	1000	--	--
$\mu\text{g}$ de proteína	--	5	10	20	40	80	100	200	--	--
mL de $\text{H}_2\text{O}$ destilada	1.0	0.975	0.950	0.9	0.8	0.6	0.5	--	--	--
mL problema	--	--	--	--	--	--	--	--	1.0	1.0
mL solución A	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente										
mL solución B	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
mezclar e incubar de 30 minutos a 2 horas a temperatura ambiente										

Leer a  $\lambda = 500 \text{ nm}$

\* Preparar diluciones 1/50 y 1/100 en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

## ANEXO 3

### TINCIONES PARA GELES DE POLIACRILAMIDA

#### *AZUL DE COOMASSIE*

Colocar en un recipiente limpio aproximadamente 200 mL del colorante de trabajo de azul de Coomassie y el gel chico. Si se quiere de una tinción rápida, cubrir el recipiente e incubar 1 hora a 37°C, si no es así, incubar a temperatura ambiente 4 horas y en agitación continua. Vaciar el colorante y agregar la solución decolorante cambiando las veces necesarias hasta observar la nitidez de las bandas. El colorante de trabajo puede usarse hasta 5 veces al igual que la solución decolorante pues ésta se filtra en carbón activado y se vuelve a utilizar.

#### *SUDÁN NEGRO B*

Preparar una solución saturada de Sudán negro B en etanol al 60 % (v/v) a 37°C. Enfríar la solución a temperatura ambiente y filtrar.

Inmediatamente antes de usarse, se filtra otra vez y se agrega 0.1 mL de hidróxido de sodio al 25 % (p/v) por cada 50 mL de colorante. Se tiñe por 24 horas; se lava con etanol al 50 % (30 minutos).

#### *PAS (ACIDO PERYODICO -BASE DE SCHIFF-)*

##### *Preparación del reactivo de Schiff:*

Se disuelve 1.5 g de fucsina básica en 500 mL de agua destilada hirviendo. Se filtra a 55°C y se enfría a 40°C. Se agregan 25 mL de HCl 2N y 3.75 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, metabisulfito de sodio. Se agita para obtener una solución rápidamente. Se deja sedimentar tapado en el refrigerador por 6 horas. Se le agrega 1.2 g de carbón. Se mezcla vigorosamente por 50 segundos y se filtra rápidamente, el tiempo de filtrado no debe exceder de 3 min. Se tapa y se almacena en el refrigerador.

##### Otros reactivos:

1.- Acido peryódico	1.0 g
Acetato de sodio anhidro	0.82 g
Agua destilada	100 mL
2.- Acido acético glacial	0.54 mL
Acetato de sodio anhidro	0.89 g
Hidrocioruro de hidroxilamina	10.0 g
Agua destilada	100 mL

3.- Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> al 10 % (p/v)	5 mL
Acido clorhídrico 2N	5 mL
Agua destilada	90 mL

La solución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> debe prepararse justo antes de usarse.

**Procedimiento:** sumergir la laminilla previamente secada en la solución de ácido acético por 15 minutos. Lavar en agua corriente por 15 minutos. Sumergir en la solución de ácido peryódico por 10 minutos. Sumergir en el reactivo de Schiff con un volumen igual de agua destilada por 3 minutos. Lavar 3 veces por 2 minutos en Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

### **PLATA**

Fijar el gel por 30 minutos en la siguiente solución: 100 mL de agua + 100 mL de metanol + 100 mL de formaldehído. Lavar con agua corriente toda la noche.

Incubar 30 minutos con DTT/agua (5 µg/mL).

Incubar 30 minutos con nitrato de plata 0.1 %, lavar con agua destilada 4 veces.

Revelar con 200 mL de carbonato de sodio 3 % + 50 µL de formaldehído (la solución debe prepararse justo antes de su uso). Incubar en la obscuridad y vigilar hasta que aparezcan las bandas.

Detener la reacción con ácido cítrico 2.3M (4.83 g/10 mL) que debe prepararse al momento de su uso.

## ANEXO 4

### CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS.

Para determinar estos parámetros se hace un cuadro de correlación:

	<i>Enfermedad presente</i>	<i>Enfermedad ausente</i>	<i>Total</i>
<i>Prueba positiva</i>	a	b	a+b
<i>Prueba negativa</i>	c	d	c+d
<i>Total</i>	a+c	b+d	a+b+c+d

donde:

a= verdaderos positivos  
 b= falsos positivos  
 c= falsos negativos  
 d= verdaderos negativos  
 a+c= total de personas enfermas o prevalencia de la enfermedad  
 b+d= total de personas no enfermas  
 a+b+c+d= población total.

1. **Sensibilidad:** es la capacidad de la prueba de identificar correctamente en una población, los individuos que presentan la enfermedad estudiada, es decir, los “*verdaderos positivos*”. Se expresa dando la proporción de los sujetos correctamente clasificados como positivos (a) en relación al conjunto de enfermos (a+c).

$$s = a / (a + c) \times 100$$

2. **Especificidad:** es la capacidad de identificar correctamente aquéllos que no presentan la enfermedad estudiada, es decir, los “*verdaderos negativos*”. Se expresa dando la proporción de los “*verdaderos negativos*” (d) en relación al conjunto de no enfermos (b+d).

$$sp = d / (b + d) \times 100$$

3. **Valor predictivo de positividad (VPP):** probabilidad de identificar los enfermos en un grupo de sujetos considerados como positivos.

$$VPP = a / (a + b) \times 100$$

4. **Valor predictivo de negatividad (VPN):** probabilidad de que la enfermedad no exista en un grupo de sujetos considerado como negativos.

$$VPN = d / (c + d) \times 100$$



## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> GARCÍA García ML y Valdespino Gómez JL. *Tuberculosis*. En: Valdespino Gómez JL, editor. (1994). *Enfermedades tropicales en México. Diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica*. INDRE, SSA, México; 215-226.
- <sup>2</sup> ELLNER JJ. (1997). *Review: the immune response in human tuberculosis -implications for tuberculosis control-*. J Infect Dis; 176: 1351-1359.
- <sup>3</sup> GONZÁLEZ Saldaña N. (1987). *Infectología clínica pediátrica*. Trillas. 3a. ed. México; 105-145.
- <sup>4</sup> Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (1998). *Epidemiología*; 15: 7, 15.
- <sup>5</sup> PACHECO C, Vázquez Rinza V, Badillo N. (1994). *Vacuna del bacilo de Calmette y Guern*. En: *Vacunas, Ciencia y Salud*. INDRE, SSA, México.
- <sup>6</sup> MURRAY P. (1992). *Microbiología Médica*. Mosby Year Book Company, España.
- <sup>7</sup> CABELLO RR (1993). *Microbiología y parasitología humana*. Ed. Panamericana, 1a. ed.; 323-328.
- <sup>8</sup> FARGA V. (1992). *Tuberculosis*. Ed. Mediterráneo, 2a. ed. Chile,.
- <sup>9</sup> McNAUGHTON M, Stollerman GH. (1993). *Disseminated tuberculosis: a presumptive diagnosis*. Hosp Pract; 15: 63-78.
- <sup>10</sup> BOTHAMLEY, GH. (1995). *Serological diagnosis of tuberculosis*. Eur Resp J Suppl; 8: 676s-688s.
- <sup>11</sup> *Pediatría*. Parte B, libro 5.
- <sup>12</sup> RICHELDI L, Bamini S, Saltini C. (1995). *Molecular diagnosis of tuberculosis*. Eur Resp J Suppl; 20: 689s-700s.
- <sup>13</sup> IVANYI J. *Serological tests for the diagnosis of tuberculosis and leprosy*. In: VAHERI *et al.*, eds. (1991). *Rapid methods and automation in microbiology and immunology*. Springer-Verlag, New York, USA; 267-283.
- <sup>14</sup> NOORDHOEK GT (1994). *Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories*. J Clin Microbiol; 32: 277-284.
- <sup>15</sup> DANNENBERG Jr. AM. (1991). *Delayed type hypersensitivity and cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis*. Immunol Today; 12: 228-233.
- <sup>16</sup> KOVACS EJ. (1991). *Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue*. Immunol Today; 12: 17-23.
- <sup>17</sup> BAUTISTA Matías N. (1993). *Factores de susceptibilidad genética y genes de respuesta inmunitaria ligados al MHC en la tuberculosis*. Tesis de licenciatura, UNAM.

- <sup>18</sup> KAUFMANN SH. (1993). *Immunity to intracellular bacteria*. Annu Rev Immunol; 11: 129-163.
- <sup>19</sup> DANNENBERG Jr. AM, Tomaszefski Jr. JF *Pathogenesis of pulmonary tuberculosis*. In: Fishman. (1988). *Pulmonary diseases and disorders*. McGraw-Hill. Third edition. Vol 1: 2447-2471.
- <sup>20</sup> DANIEL TM, Ellner JJ. *Immunology of tuberculosis*. In: Reichman LB, Hershfield ES, eds. (1993). *Tuberculosis. A comprehensive international approach*. Marcel Dekker Inc; 75-101.
- <sup>21</sup> FLYNN JL. (1993). *An essential role for interferon- $\gamma$  in resistance to Mycobacterium tuberculosis*. J Exp Med; 178: 2249-2254.
- <sup>22</sup> CHEN JX, Mailiozzo RS, Bloom BR. (1992). *Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages*. J Exp Med; 1111-1122.
- <sup>23</sup> LEWINSON DM, Alderson MR, Briden AL. (1998). *Characterization of human CD8<sup>+</sup> T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis-infected antigen-presenting cells*. J Exp Med; 187: 1633-1640.
- <sup>24</sup> ORME IM. (1993). *T cell response to Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis; 167: 1481-1497.
- <sup>25</sup> PORCELLI SA, Segelke BW, Sugita M, Wilson IA, Brenner M. (1998). *The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules*. Immunol Today; 19: 362-368.
- <sup>26</sup> MAHER JK, Kronenberg M. (1997). *The role of CD1 molecules in immune responses to infection*. Curr Opin Immunol; 9: 456-461.
- <sup>27</sup> ERNST WA, Maher JK, Cho S, Niazi KR. (1998). *Molecular interaction of CD1b with lipoglycan antigens*. Immunity; 8: 331-340.
- <sup>28</sup> SUGITA M, Moody DB, Jackman RM. (1998). *CD1 -a new paradigm for antigen presentation and T cell activation*. Clin Immunol Immunopathol; 87: 8-14.
- <sup>29</sup> ZENG ZH, Castaño AR, Segelke BW. (1997). *Crystal structure of mouse CD1 an MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove*. Science; 277: 339-345.
- <sup>30</sup> BARNES PF, Madlin ML, Ellner JJ. *T cell responses and cytokines in tuberculosis pathogenesis, protection and control*. In: Bloom BR, ed. (1994). *Tuberculosis*. American Society for Microbiology; 417-435.
- <sup>31</sup> HIRSCH CS, Yoneda T, Averill L, Ellner JJ, Toossi Z. (1994). *Enhancement of intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis in human monocytes by transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )*. J Infect Dis; 170: 1229-1237.
- <sup>32</sup> EHLERS S. (1994). *Progress in TB research: Robert Koch's dilemma revisited*. Immunol Today; 15: 1-4.
- <sup>33</sup> GHEORGHIU M. (1990). *The role of BCG vaccine in tuberculosis control*. Indian J Pediatr; 57: 651-655.

- <sup>34</sup> JOLY V, Hance AJ, Yem P. (1993). *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Curr Opin Infect Dis*; 6: 171-178.
- <sup>35</sup> CHAMBERS MA. (1997). Differential responses to challenge with live and dead *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin. *J Immunol*; 158: 1742-1748.
- <sup>36</sup> DANIEL TM, McDonough JA, Huebner RE. (1991). Absence of IgM or IgG antibody response to *Mycobacterium tuberculosis* 30000 Da antigen after primary tuberculous infection. *J Infect Dis*; 164: 821.
- <sup>37</sup> SOUSA AO, Henry S, Maroja FM. (1998). IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol*; 111: 48-55.
- <sup>38</sup> STENGER S, Niazi KR, Modlin RL. (1998). Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*; 161: 3582-3588.
- <sup>39</sup> ESPITIA CI. (1992). Los antígenos inmunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis* son glicoproteínas. Jubileo del Instituto de Investigaciones biomédicas UNAM; 359-368.
- <sup>40</sup> ESPITIA CI, Mancilla R. (1989). Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigen. *Clin Exp Immunol*; 77: 378-383.
- <sup>41</sup> ESPITIA CI. (1989). A 38-kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immunol*; 77: 378-383.
- <sup>42</sup> SADA DE, Ferguson LE, Daniel TM. (1990). An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000-Da native antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*; 162: 928-931.
- <sup>43</sup> BASSEY EO, Catty D, Kumararatne DS, Radkundalia C. (1996). Candidate antigens for improved serodiagnosis of tuberculosis. *Tuber Lung Dis*; 77: 136-145.
- <sup>44</sup> ANDERSEN P. (1991). Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun*; 59: 1905-1910.
- <sup>45</sup> LOWRY OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193: 265-275.
- <sup>46</sup> GIULIAN G, Graham J. (1997). In: *Hoefler Scientific Instruments*. Catalog; 126-128.
- <sup>47</sup> CLAUSEN J. (1975). *Técnicas histoquímicas para la identificación y estimación de macromoléculas*. Ed. El Manual Moderno; 110-113.
- <sup>48</sup> MORRISEY JH. (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*; 117: 307-310.
- <sup>49</sup> TOWBIN H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*; 76: 4350-4354.

- <sup>50</sup> NAVARRO Fierro R. (1988). *Introducción a la bioestadística. Análisis de variables binarias*. McGraw-Hill.
- <sup>51</sup> DAWSON Saunders B, Trapp RG. (1993). *Bioestadística médica*. Ed. El Manual Moderno, 1a. ed. México, 267-272.
- <sup>52</sup> SCHLUGER NW, Rom WN. (1994). *Current approaches to the diagnosis of active pulmonary tuberculosis*. Am J Resp Crit Care Med; 149: 264-267.
- <sup>53</sup> MANDELL GL, Douglas RG., Bennett JE. (1990). *Principles and practice of infectious diseases* Churchill Livingston. 3rd. ed. New York; 1877-1906.
- <sup>54</sup> GARCÍA ML, Giono S, Pacheco CR, Escobar Gutiérrez A, Valdespino JL. (1994). *Infecciones respiratorias agudas y crónicas*. INDRE, SSA. México; 211-230.
- <sup>55</sup> SEPÚLVEDA Rodríguez RT. (1994). *Caracterización de antígenos de Mycobacterium tuberculosis a partir de aislamientos clínicos de pacientes con tuberculosis pulmonar activa*. Tesis de maestría, IPN.
- <sup>56</sup> SORENSEN AL, Nagai S, Hoven G, Andersen P, Andersen AB. (1995). *Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun; 63: 1710-1717.
- <sup>57</sup> PÉREZ Fernández L, García Latorre E, Sosa C, López de Arcila C. (1994). *Utilidad de la técnica de inmunoensayo enzimático ELISA en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar en el niño*. Acta Pediatr Méx; 15: 55-63.
- <sup>58</sup> HAVLIR DV, Wallis RS, Boom H, Daniel TM, Chervenak K, Ellner JJ. (1991). *Human immune responses to Mycobacterium tuberculosis antigens*. Infect Immun; 59: 665-670.
- <sup>59</sup> ESCOBAR Gutiérrez A, Amezcua Chavarria MA, Pastén Sánchez S, Ramírez Casanova E, Cázares JV, Granados G, Loo Méndez E, Cicero R. (1995). *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) with mycobacterial crude antigens for the sero-epidemiological diagnosis of active tuberculosis*. Int J Lepr; 64: 417-427.
- <sup>60</sup> GONZÁLEZ Mateos S. (1996). *Evaluación de 2 técnicas inmunoenzimáticas para el diagnóstico temprano de la meningitis tuberculosa en muestras de líquido cefalorraquídeo*. Tesis de licenciatura, UNAM.
- <sup>61</sup> KRONENBERG, M. (1994). *Antigens recognized by  $\gamma\delta$  T cells*. Curr Opin Immunol; 6: 64-71.