



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

Departamento de  
Exámenes Profesionales

"EVALUACION DE LA RESPUESTA HUMORAL HACIA  
ANTIGENOS PROTEICOS MICOBACTERIANOS EN EL  
GANADO BOVINO"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A :

**LETICIA SEBASTIAN MEDINA**

ASESORAS: DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES  
DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

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 Humoral Hacia Antígenos Protéicos

Micobacterianos en el Ganado Bovino.

que presenta la pasante: Leticia Sebastian Medina

con número de cuenta: 9855551-4 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Octubre de 2003

PRESIDENTE Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

VOCAL QFB. René Damián Santos

SECRETARIO Dra. Gabriela Barcenás Morales

PRIMER SUPLENTE QFB. Gabriela Escalante Reynoso

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Ana Laura Vázquez Martínez

Handwritten signatures of the board members

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO  
DE POSGRADO DE INMUNOLOGÍA DE LA FES  
CUAUTITLAN UNAM Y FUE APOYADO POR EL  
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA  
PROYECTO No. G34799-13.

## AGRADECIMIENTOS

*A la mujer más maravillosa del mundo, quien siempre ha estado conmigo por su gran amor apoyo incondicional y por ser mi motivo para seguir adelante: Mi madre.*

*A Maru por su incondicional apoyo, su disposición y su amistad.*

*A Silver quien siempre ha sabido como ayudar.*

*A la Dra. Gabriela Barcenás por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto.*

*A la Dra Camila Arriaga, a Aurora Romero y a la Dra Clara Espitia por su apoyo en mi trabajo.*

## DEDICATORIAS

*Este trabajo esta dedicado especialmente a mis padres,  
mis hermanos y a mis sobrinos.*

*A mis profesores que han dejado plasmado sus  
conocimientos en mi persona: Maguie, Idalia, Norma, etc.*

*A Maru y Dra. Gaby.*

*A Silver y Estelita*

*A mis amigos de la carrera:  
Lupita F. Nadia, La U. de B. y los chicos Generación 24  
con quienes pase momentos muy agradables en el transcurso  
de mis estudios.*

## ÍNDICE

I.	LISTA DE ABREVIATURAS	I
II.	ÍNDICE DE TABLAS	II
III.	ÍNDICE DE FIGURAS	III
IV.	ÍNDICE DE CUADROS	IV
V.	RESUMEN	V
1.0	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Generalidades	1
1.2	Características morfológicas de <i>Mycobacterium</i>	2
1.3	Factores de virulencia	2
1.4	Patogenicidad	4
1.5	Epidemiología	7
1.5.1	Resistencia ambiental de <i>Mycobacterium bovis</i>	7
1.5.2	Hospederos	7
1.5.3	Vías de infección modos de transmisión y vías de eliminación	7
1.6	Respuesta inmune del hospedero	8
1.7	Proteínas antigénicas	11
1.7.1	rPT-16	12
1.7.2	Proteína de 38 kDa	13
1.7.3	Complejo 45/47	14
1.7.4	Tiorredoxina	15

1.7.5 ESAT-6	16
1.7.6 Filtrados de cultivo	17
1.7.6.1 AN-5	18
1.7.6.2 RV-11	18
1.7.7 Derivados Protéicos Purificados	18
1.8 Diagnóstico	20
1.8.1 Diagnóstico bacteriológico	20
1.8.2 Prueba de la tuberculina	21
1.8.3 Prueba de interferón gamma	22
1.8.4 Técnicas de biología molecular	22
<b>2.0 JUSTIFICACIÓN</b>	23
<b>3.0 HIPÓTESIS</b>	24
<b>4.0 OBJETIVOS</b>	24
4.1 OBJETIVO GENERAL	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
<b>5.0 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	25
5.1.0 Reactivos biológicos	25
5.1.1 Proteínas	25
5.1.2 Filtrados de cultivo	25
5.1.3 Derivados Protéicos Purificados	25
5.1.4 Conjugados	25
5.1.5 Sueros	26

5.2.0 Reactivos	30
5.2.1 Sustratos	30
5.2.2 Otros reactivos	30
5.3.0 Equipo	30
5.4.0 Metodología	31
5.4.1 Obtención del suero	31
5.4.2 Activación de las membranas	31
5.4.3 Fijación de diferentes concentraciones de antígeno	31
5.4.4 Estandarización de la técnica de IFMA	32
<b>6.0 RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>7.0 DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
<b>8.0 CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>9.0 APÉNDICE</b>	<b>54</b>
<b>10.0 REFERENCIAS</b>	<b>56</b>

## I. Lista de abreviaturas

- PPD = Derivado proteico purificado.  
CIE = Contra-inmuno-electroforesis.  
SDS = Duodecil sulfato de sodio.  
BCG = Bacilo Calmette Guérin.  
Trx = Tiorredoxina.  
TR = Tiorredoxin reductasa.  
rPT16 = Proteína recombinante de 16kDa.  
NY = Nylon.  
NC = Nitrocelulosa.  
kDa = Kilodalton.  
IgG = Inmunoglobulina G.  
min = Minutos  
C = Grados centígrados.  
rpm = Revoluciones por minuto.  
 $\mu$ L = Microlitro.  
mg = miligramo.  
PBS = Buffer de fosfatos  
ASB = Albúmina sérica bovina.  
 $\mu$ g = Microgramos.  
mL = Mililitros.  
SB = Solución bloqueadora.  
PBS-T= Buffer de fosfatos con tween.  
IFMA = Inmunoensayo de Fijación de Múltiples antígenos.  
MAPIA= Multi Antigen Print Immunoassay.

## II. Índice de tablas.

1. Información general de los bovinos PPD positivos.....	27
2. Información general de los bovinos PPD negativos.....	28
3. Información general de los bovinos PPD dudosos.....	29
4. Reconocimiento antigénico de sueros bovinos PPD positivos.	40
5. Reconocimiento antigénico de sueros PPD negativos.	41
6. Reconocimiento antigénico de sueros PPD dudoso	42

### **III. Índice de figuras**

- 1. Reconocimiento hacia los antígenos micobacterianos por los sueros bovinos, usados en la técnica de IFMA (Panel A). 37**
- 2. Reconocimiento hacia los antígenos micobacterianos por los sueros bovinos usados en la técnica de IFMA (Panel B). 38**
- 3. Porcentaje del número de sueros que presentaron un reconocimiento positivo o negativo a antígenos micobacterianos en grupos de bovinos positivos, negativos y dudosos a la prueba de tuberculina. 44**
- 4. Valores de los porcentajes de reconocimiento a cada uno de los diferentes antígenos micobacterianos que presentaron los sueros de bovinos correspondientes a los grupos de animales positivos, negativos y dudosos a la prueba de tuberculina. 45**

#### IV. ÍNDICE DE CUADROS

- |  |    |
|--|----|
| 1. Vías de transmisión de <i>Mycobacterium bovis</i>                 | 8  |
| 2. Pruebas bioquímicas de <i>M. bovis</i> y <i>M. tuberculosis</i> . | 20 |

## V. RESUMEN

Actualmente la tuberculosis bovina es uno de los problemas de más relevancia a nivel mundial debido a las grandes pérdidas económicas ocasionadas, y al alto riesgo de salud pública, ya que existe el contagio al humano por zoonosis.

Una de las herramientas empleadas para el diagnóstico de esta enfermedad han sido las técnicas serológicas, ya que resultan ser económicas y rápidas. Se han hecho estudios donde se comprueba que el uso de un sólo antígeno tiene menor especificidad y sensibilidad, por lo que se ha empleado últimamente una combinación de diversos antígenos micobacterianos para la detección de anticuerpos hacia cada uno de estos. En el presente trabajo el objetivo principal planteado fue analizar y comparar la producción de anticuerpos séricos bovinos hacia antígenos protéicos micobacterianos presentada por ganado infectado y sano.

Para la realización del presente proyecto se colectaron 95 sueros de ganado bovino raza Holstein friesian, de los cuales 22 resultaron positivos a la prueba de tuberculina (PPD+), 37 negativos (PPD-) y 36 fueron dudosos a la prueba (PPD+/-). Estos sueros se emplearon para evaluarla técnica de inmunoensayo de fijación de múltiples antígenos (IFMA) utilizando diez antígenos micobacterianos cinco de ellos recombinates: rPT-16, P-38, 45/47, Tiorredoxina y ESAT-6; y los extractos: AN-5, Rv-11, PPD bovis PPD tuberculosis y PPD aviar. Los resultados obtenidos mostraron que el 72.7% de los animales PPD+, el 13.8 % de los bovinos PPD+/- y el 35.14 % de los bovinos PPD- reconocieron al menos un antígeno. Los bovinos PPD+ reconocieron los antígenos en los siguientes porcentajes: rPT16 (22.7%), RV-11(72.7%), AN-5 (45.5%), PPDtub (59%), PPDbov (22.7%) y PPDav (13.6%). Los valores correspondientes a los bovinos PPD- fueron: rPT16 y 45/47 (5.4%), p-38 (2.7%), RV-11 (21.6%), AN-5 (16.2%), PPDtub (21.6%), y PPDbov (10.8%). Los bovinos PPD+/- solamente reconocieron a RV-11, PPDtub, AN-5 y PPDbov en un intervalo de 13.8%, 8.3%, 5.5% y 2.8%. En base a los resultados obtenidos podemos decir que el reconocimiento hacia cada uno de los antígenos es muy heterogéneo en cada uno de los grupos de animales. RV-11, AN-5, PPD tub, PPD bovis y rPT-16, son antígenos prometedores para el diagnóstico.

# Evaluación de la Respuesta Humoral Hacia Antígenos Protéicos Micobacterianos en el Ganado Bovino

## 1.0 INTRODUCCIÓN

### 1.1.0 GENERALIDADES

A comienzos del siglo XIX, la tuberculosis bovina no había sido aún diferenciada de otras enfermedades, y el uso del vocablo tubérculo era empleado para referirse a la enfermedad con la lesión, y fue establecido por Bayle en 1810 en su obra "Recherches sur la Phthisie Pulmonaire". En 1817, Durpuy, introdujo el concepto en patología veterinaria atribuyendo el origen de estos tubérculos a las alteraciones parasitarias de las diversas especies animales y designando a los cisticercos como productores de estas enfermedades. En 1819, Laëneec, editó la unidad de las diversas formas de tisis pulmonar, asignándole como característica el tubérculo; en 1826 edita la segunda edición de su Tratado, en la que señala este proceso desde un pequeño tubérculo hasta el desarrollo de la caverna tuberculosa, afirmando la unicidad de la tuberculosis a través de lesiones diferentes en apariencia. Esta doctrina evolucionó al mundo científico de la época y de aquí arrancan las primeras ideas acerca de la unidad de la tuberculosis bovina (Molero, J., 1989).

Actualmente la tuberculosis ha sido considerada como la enfermedad infecciosa que más muertes ocasiona a nivel mundial, esto condujo a que la Organización Mundial de la Salud declarará a la tuberculosis, en 1993, una emergencia mundial. En países en vías de desarrollo, la tuberculosis es responsable de poco más de la cuarta parte de las defunciones prevenibles en adultos y en países industrializados se ha observado un incremento en los niveles de defunciones ocasionadas por ésta enfermedad (Torres J., 1995).

*Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) es el agente causal de la tuberculosis bovina, la cual se encuentra distribuida a nivel mundial. *M. bovis* pertenece a la subespecie del complejo de *M. tuberculosis*, el que comprende de otras especies como: *M.*

*tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. La tuberculosis ocasiona un gran impacto económico a la industria bovina; así mismo, se ha observado la transmisión de esta a partir de bovinos infectados a individuos sanos, provocando con esto un problema de salud pública (Charles O. and James H., 1995).

En 1882, Roberto Koch logró identificar y cultivar al agente causal de la tuberculosis: una bacteria en forma de bastón, a la cual denominó bacilo tuberculoso (Barnes, 2000). En la actualidad se han descrito alrededor de 100 especies de éste género, las cuales se designan en dos divisiones principales: de crecimiento rápido y de crecimiento lento. El género *Mycobacterium* incluye varios patógenos importantes tanto para los humanos como para los animales (Shinnick and Good, 1994).

#### **1.2.0 Características morfológicas del *Mycobacterium***

El género *Mycobacterium* comprende un grupo único de bacterias caracterizadas por una pared que contiene lípidos y ácido N-glucolilneuramínico. Las micobacterias son inmóviles y no esporuladas, débilmente Gram positivos, aerobios o microaerófilicos, en forma de bastón o ligeramente curvo, algunas micobacterias presentan forma de cocobacilos, filamentosas o ramificadas. Estas bacterias se han caracterizado por ser bacterias ácido alcohol resistentes. Los ácidos micólicos permiten retener los colorantes básicos como la fucsina fenicada y resistir la decoloración con ácidos débiles (Cañez, 1995).

*M. bovis* es bacilar, mide desde 0.2-0.6 a 1.0-10  $\mu\text{m}$ , es un bacilo relativamente corto al observarlo en frotis de tejidos y moderadamente más largo y delgado formando cadenas en preparaciones a partir de medios de cultivo (Cañez, 1995).

#### **1.3.0 Factores de virulencia**

*M. bovis* posee una gran variedad de factores de patogenicidad que le confieren un alto grado de virulencia; entre ellos se encuentra la pared celular, lípidos, ácidos micólicos, entre otros.

La pared celular de las micobacterias es una estructura que además de contener una membrana celular, esta constituida por un alto contenido de lípidos (alrededor del 60% del peso de la pared), una capa de péptido glucano y una gruesa capa de ácidos micólicos. Los diversos lípidos y glicolípidos asociados no covalentemente con la envoltura celular, en forma de trealosa le confieren una hidrofobicidad en la superficie exterior del microorganismo (Daffe and Draper, 1998). El alto contenido de lípidos de la pared celular de las micobacterias, son responsables de propiedades como hidrofobicidad en medio líquido, lento crecimiento y resistencia a ácidos, desinfectantes y desecación. Uno de los componentes lipídicos de la pared externa de las micobacterias son los sulfátidos (constituídos por trealosas esterificadas, un grupo sulfato y cuatro grupos ácidos grasos), los cuales se ha observado en recientes estudios que bloquean el buen funcionamiento del IFN- $\gamma$  (Interferón gama) y la producción de superóxidos (Brozna J.P. et al, 1991).

El factor cordón, es otro constituyente importante en la patogénesis del género *Mycobacterium*, el cual le confiere al microorganismo la habilidad de persistir en el pulmón, aunque este mecanismo aún no ha sido dilucidado del todo. También le confiere propiedades leucotóxicas que inhiben el quimiotactismo leucocitario, inducen la respuesta granulomatosa, desintegra el retículo endoplásmico rugoso y provoca daño mitocondrial en la célula hospedadora, determinando trastornos en la respiración celular (Cañez, 1995).

El lipoarabinomano (LAM), uno de los principales compuestos de los lipopolisacáridos de la pared celular, es también un potente desregulador de una variedad de funciones relacionadas con la respuesta inmune contra la micobacteria. Se ha observado que el LAM inhibe la activación del IFN- $\gamma$ , ya que existen evidencias de que el LAM inhibe la presentación del antígeno por macrófagos, por lo que no se da el reconocimiento por linfocitos T (Cañez, 1995).

La micobacteria también está compuesta de ácidos grasos como: saturados, insaturados, micólicos, cera D, micósidos, acilaminoácidos, tiocerol, fosfolípidos y sulfátidos de los cuales destacan el fosfatidil glicerol o cardiolipina y el fosfatidil inositol manósido el cual impide la digestión de las micobacterias dentro del macrófago.

Contiene además polisacáridos y los más estudiados de estos son los que tienen capacidad antigénica, como el D-arabino-D-galactano, D-arabino-D-manano y D-glucano (Cañez, 1995).

Entre otros componentes importantes en la patogenicidad de las micobacterias se encuentran enzimas como: catalasa, ureasa, fosfatasa ácida y esterasa (Cañez, 1995).

#### **1.4.0 Patogenicidad**

La tuberculosis se transmite por aerosoles generados por la tos de individuos infectados, el bacilo inhalado es alojado en pulmón donde se replica dentro de los macrófagos alveolares. La infección primaria involucra la replicación del microorganismo en el sitio pulmonar inicial de la infección, la propagación a nódulos linfáticos locales dentro del pulmón y la diseminación eventual de la infección a sitios más distantes del organismo. La infección primaria es asintomática (Manabe and Bishai, 2000).

La bacteria dentro del macrófago en el hospedero, debe resistir la respuesta inmune o modificar a ésta para permitir el control de su replicación sin su eliminación completa, así como de persistir en un estado inactivo, conservando el potencial para una posible reactivación.

Se ha observado que el bacilo evade la respuesta inmune y entre algunos de los mecanismos propuestos se encuentran:

- Prevención del estallido oxidativo en las células fagocíticas.
- Inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma.
- Resistencia a enzimas lisosomales (lisozima).
- Secreción de inhibidores de agentes bactericidas, como el peróxido ó radicales de oxígeno.
- Exudación de lípidos para bloquear el acceso de agentes bactericidas a sus blancos.
- Escape del fagosoma al citoplasma.

- Por otro lado las micobacterias secretan catalasa, la cual forma agua a partir del peróxido de hidrógeno eliminando así el sustrato para que la mieloperoxidasa forme compuestos altamente tóxicos como el hipoclorito.

La liberación del LAM interfiere con la capacidad de respuesta de los macrófagos a estímulos del IFN- $\gamma$ . Finalmente las micobacterias por sí mismas pueden destruir a la célula fagocítica (Davies, 1990).

El desarrollo de la tuberculosis depende del estado inmunitario del animal y de la existencia o no de un contacto previo entre el animal y la micobacteria. Los bovinos se infectan con mayor frecuencia por vía aerosol, se cree que el 90% de los casos tienen como vía de entrada la respiratoria, pues el bacilo se dispersa en la atmósfera proviniendo de secreciones pulmonares de animales enfermos (Cañez, 1995).

*M. bovis* puede producir infección y enfermedad en diferentes tejidos del organismo, pero ésta comienza con un foco pulmonar inicial. Se cree que hay predilección por tejido pulmonar ya que existe una relación directa del requerimiento de oxígeno para su crecimiento; además que la multiplicación del microorganismo es más rápida que en otros tejidos.

En una primoinfección, la micobacteria es fagocitada por macrófagos alveolares, los cuales liberan enzimas como: lipasas, fosfolipasas, proteasas y lisozimas para lizar al microorganismo, aunque no lo logren. Como respuesta, el factor cordón de la micobacteria se ha observado que conduce a la destrucción de las mitocondrias con la subsecuente alteración de la respiración y la fosforilación oxidativa de la célula (Cañez, 1995).

Otro factor de virulencia involucrado en la alteración respiratoria se debe a la presencia de sulfátidos; de acuerdo con estudios iniciales se cree que la presencia de éstos se relaciona con el fracaso de la unión del lisosoma y fagosoma, por lo tanto las micobacterias no entran en contacto con las enzimas hidrolíticas consiguiendo su supervivencia en el macrófago. Así mismo, en estudios más recientes se ha observado

que la presencia de sulfatidos también bloquea el buen funcionamiento del IFN- $\gamma$  y la producción de superóxidos (Brozna J. et al; 1991).

Cuando existe un número significativo de bacilos, se ha observado en una primera instancia de la infección un proceso exudativo celular inflamatorio, destrucción celular y necrosis reducida; la lesión primaria consiste en una pequeña zona de material necrótico, rodeado por una capa de macrófagos. Las micobacterias fagocitadas en los alvéolos son drenadas hasta los nódulos linfáticos mediastínicos y torácicos, donde se desarrollará la adenopatía satélite. Esta lesión adoptará las mismas características que las desarrolladas en el pulmón. La extensión y la presencia de los macrófagos en los canalículos, entre las células del sistema reticulo endotelial del ganglio favorece la captación y asentamiento de la micobacteria. Una vez transcurrido el período de infección (de 10 a 15 días), se produce un fenómeno de hipersensibilidad tipo IV, en el cual los macrófagos que en un principio no eran capaces de destruir a los bacilos, experimentan transformaciones tanto funcionales como morfológicas evolucionando hasta células epiteloideas y células gigantes, las cuales serán capaces de producir una intensa acción fagocítica e hidrolítica (Cañez, 1995).

Los linfocitos, responsables de esta inmunidad, al liberar linfocinas, atraen, inmovilizan y activan a las células mononucleares en los lugares donde se encuentran las micobacterias o sus productos; entre esta linfocinas se encuentran el Factor Quimiotáctico de Macrófagos (MCF), Factor Inhibidor de Migración (MIF), Factor Mitógeno (MF), los cuales determinan la infiltración, activación y división celular, respectivamente. El resultado de este proceso es la formación del granuloma, que cuando está completamente desarrollado consta de una zona necrótica central con o sin precipitación mineral, rodeada por células epiteloideas alternadas con células gigantes. En determinadas circunstancias la zona necrótica central puede evolucionar hasta llegar a necrosis caseosa. Posteriormente se ha observado que existe la formación de sincitios celulares y como consecuencia de la reacción inflamatoria se produce un tejido de granulación que presenta un tejido fibroso periférico y presencia de linfocitos adyacentes a los vasos sanguíneos (Cañez, 1995)

## **1.5.0 Epidemiología**

### **1.5.1 Resistencia ambiental de *Mycobacterium bovis*.**

*M. bovis* es un microorganismo moderadamente resistente al calor, a la desecación y a muchos desinfectantes. En suelos ácidos puede aumentar la supervivencia del bacilo, es destruído por la luz solar directa a menos que se encuentre en un ambiente húmedo-sombreado pudiendo permanecer unas semanas viable. En aguas estancadas el microorganismo puede encontrarse en el sedimento a temperaturas mayores de 20° C, también puede sobrevivir en cemento y heces permaneciendo viable hasta 40 días a la sombra. En leche no pasteurizada y sus derivados permanece hasta por seis meses, así como también en los pastos en zonas templadas (Cañez, 1995).

### **1.5.2 Hospederos**

*M. bovis* tiene uno de los más amplios rangos de hospederos de todos los patógenos conocidos. Se ha demostrado infección en primates, incluyendo al humano y otros carnívoros, tanto domésticos como silvestres. En condiciones naturales *M. bovis* causa enfermedad principalmente en el ganado vacuno (reservorio por excelencia del bacilo y especie más susceptible a la enfermedad), el hombre, el cerdo y ocasionalmente el caballo, perro, gato y pequeños rumiantes pueden alojar el bacilo; estos últimos son considerados hospederos secundarios. En Gran Bretaña el tejón *Meles meles* ha sido determinado como reservorio del bacilo tuberculoso (Cañez, 1995).

### **1.5.3 Vías de infección, modos de transmisión y vías de eliminación**

El contagio natural entre los bovinos se realiza en forma directa e indirecta. Las vías más comunes de infección entre el ganado son la respiratoria y la alimentaria; y entre las menos frecuentes están las vías cutánea, congénita y genital. En el cuadro 1 se resumen las vías de transmisión.

Cuadro 1. Vías de transmisión de *Mycobacterium bovis*.

Vías de eliminación	Vehículos de transmisión	Directo	Indirecto
Respiratoria	Aire espirado, Esputo Mucosidad nasal	Inhalación	Polvo
Digestiva	Heces	Lamido	Ingestión de alimentos, agua, leche
Cutánea	Heridas infectadas, nódulos supurantes	Lamido	Contaminación ambiental por secreciones
Congénita	Vasos umbilicales	Madre-feto	
Venérea	Semen, fluidos vaginales	Coito	
Yatrogénica	Material de inseminación		Material contaminado
Genital	Genitales	Coito, inhalación lamido	Material quirúrgico, semen
Mamaria	Leche	Ingestión	Contaminación ambiental
Urinaria	Orina	Inhalación (aerosoles)	Contaminación ambiental

#### 1.6.0 Respuesta inmune del hospedero

La infección por micobacteria se puede clasificar en tres etapas: establecimiento de la infección y adquisición de la inmunidad mediada por células; una fase latente crónica y en algunos individuos una fase de reactivación que es caracterizada por un crecimiento bacteriano excesivo y con signos clínicos de la enfermedad (Ottenhoff y Mutis, 1995).

La inmunidad a tuberculosis involucra interacciones complejas entre varias poblaciones celulares para el control y detención de la infección, además de prevenir la reactivación. Los mecanismos inmunes mediados por células proporcionan protección y una hipersensibilidad de tipo retardada, mientras que las células T son mediadoras de la inmunidad y los macrófagos son las células que mantienen a la micobacteria dentro de su fagosoma. (Caruso, 1999).

La respuesta inmune contra los patógenos es dependiente principalmente de las citocinas que son las que regulan la población celular del sistema inmune, por lo tanto, la inmunidad a infecciones micobacterianas esta muy vinculada al surgimiento de células T que secretan citocinas como el IFN- $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\alpha$  resultando en la activación de macrófagos y reclutamiento de monocitos circulantes para iniciar la formación del granuloma crónico (Torres, 1995).

Las células T CD4<sup>+</sup> son las principales células involucradas en la respuesta inmune, las cuales producen IFN- $\gamma$  para activar macrófagos, quienes llegan a controlar o eliminar microorganismos intracelulares (Caruso, 1999).

Las células T CD4<sup>+</sup> aparte de producir IFN- $\gamma$ , también producen interleucina 2 (IL-2) e inducen apoptosis o lisis de células infectadas. Esta función también la puede realizar el macrófago; sin embargo, estas células T CD4<sup>+</sup> proporcionan un medio ambiente adecuado para la replicación de la micobacteria (Servina y Flynn, 1999; Kaufmann, 1988).

En cuanto al papel de las células TCD8<sup>+</sup> en la tuberculosis, parecen estar involucradas en la lisis de células infectadas y la producción de citocinas, principalmente el IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  es una de las citocinas clave en el control de la infección por *M. bovis*, es producida tanto por células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> y por células Natural Killer o asesinas naturales (NK), en respuesta a una variedad de estímulos inmunes y/o inflamatorios, esta citocina estimula el desarrollo y la función de células efectoras. La producción de IFN- $\gamma$  es insuficiente para el control de la infección, pero es

requerida para una respuesta protectora contra este patógeno en la regulación de la producción de óxido nítrico por el macrófago (Torres, 1995).

La IL-12 interviene en la respuesta inmune contra este microorganismo, incrementando la secreción de IFN- $\gamma$  y dirigiendo la respuesta de la célula T hacia el fenotipo Th1 (Torres, 1995).

El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) es una citocina que es secretada por macrófagos, células dendríticas y células T. Se ha observado que esta citocina es requerida para el control de la infección aguda; sin embargo, la función principal de esta citocina que ha sido observada es la de coordinar la formación del granuloma, para aislar y mantener a los macrófagos (García et al, 1997; Bean et al., 1999).

La interleucina 18 (IL-18) fue conocida anteriormente como factor inductor de IFN- $\gamma$  (IGIF- $\gamma$ ), ésta citocina es producida principalmente por los macrófagos y contribuye en la generación de células T tipo 1 y estimula la producción de IFN- $\gamma$  por células T y células NK. (Chávez, 1996; Janeway-Travers, 1996).

Cuando el macrófago es activado por linfocitos Th1, se torna muy eficiente en la destrucción de los bacilos alojados en su interior gracias al incremento de los mecanismos intracelulares mediados por radicales reactivos del oxígeno y óxido nítrico. Cabe mencionar que el óxido nítrico se produce a partir de L-arginina por la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa y el co-factor tetrahidrobiopterina, mecanismo desencadenado por las señales del IFN- $\gamma$  de las células Th1 y del TNF- $\alpha$  producido por los macrófagos (Chávez, 1996; Janeway-Travers, 1996).

La respuesta inmune humoral se encuentra mediada por los linfocitos B, que se encargan de la producción de anticuerpos. Muchos de los conocimientos sobre la respuesta inmune humoral hacia a TB se derivan de los estudios serodiagnósticos, en los que se ha encontrado que la producción de anticuerpos es muy variable en cada sujeto de estudio (Carpenter, 1982; Boom, et al, 1991). Se sabe que proteínas de

*Mycobacterium* inducen una fuerte respuesta inmune humoral; una característica importante de este tipo de inmunidad contra la tuberculosis es que el reconocimiento de antígenos es de carácter heterogéneo y varía de sujeto a sujeto, más que el reconocimiento de antígenos particulares (Lyashchenko, 1998). En la búsqueda de antígenos apropiados, se ha observado repetidamente que los ensayos basados en un sólo antígeno nunca alcanzan un desarrollo satisfactorio (Wilkins, 1994).

### **1.7.0 Proteínas antigénicas**

En la búsqueda de compuestos antigénicos del género *Mycobacterium*, se han empleado diversas técnicas, como son: contra-inmuno-electroforesis, (CIE), electroforesis SDS-PAGE, electroforesis bidimensional, el uso de anticuerpos policlonales, etc. La Organización Mundial de la Salud (OMS) implementó un banco de antígenos, por medio del cual distribuye cinco antígenos recombinantes de *Mycobacterium* para investigación; sin embargo, esos compuestos no son los más importantes ni los únicos para el diagnóstico de la enfermedad (Bloom 1994).

Recientemente cerca de 50 proteínas antigénicas de micobacterias fueron listadas y se conocen las secuencias de nucleótidos de aproximadamente veinte de estas (Young et.al, 1992).

Las proteínas de filtrado de cultivo, se obtienen a partir de un cultivo joven de BCG se fraccionan por tres principios cromatográficos (tamaño, carga e hidrofobicidad), el filtrado de estas fracciones se basa en el análisis comparativo de su respuesta serológica o en respuesta a la reacción de hipersensibilidad retardada en dos grupos de cuyes inmunizados experimentalmente con BCG. Por este método dos nuevos antígenos fueron identificados: uno de estos fue la proteína de 45/47 Kda como marcador serológico por replicación de la micobacteria (Romain et.al., 1993).

### 1.7.1 rPT-16

La proteína de 16 kDa es un antígeno del complejo tuberculoso (*M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. microti*). Esta proteína se encuentra en membrana y consiste de 144 aminoácidos con aproximadamente el 30% de secuencia idéntica con algunas proteínas que pertenecen a la familia  $\alpha$ -cristalina de bajo peso molecular de choque térmico (Barcenas, 1998).

Anteriormente se le conocía como proteína de 14 kDa (Engers, 1986) o proteína principal de membrana (Lee et al., 1992); sin embargo, actualmente es conocida como una molécula proteica de 16.3 kDa, es llamada también Hsp 16.3 (Verbon, A., et al., 1992; Lysaschenko 1998) y MPT63 (Lysaschenko 1998).

Este antígeno ha sido detectado en la micobacteria con anticuerpos monoclonales empleando técnicas como inmunofluorescencia y ELISA, lo que implica que se encuentra expuesta fuera de la pared celular (Verstijnen et al., 1989; Schonings et al., 1990). Se sintetiza en la fase exponencial tardía y en la fase estacionaria. La sobreexpresión de la proteína permite que el bacilo sea resistente a la autólisis y favorece la estabilidad de las proteínas requeridas para su viabilidad (Yuan et al., 1996). También se ha observado que la capa externa de la pared celular del microorganismo se engrosa notablemente cuando los cultivos se mantienen en condiciones de anaerobiosis o microaerobiosis; lo que permite establecer el estado de latencia.

Existen varios investigadores que han empleado esta proteína para identificar micobacterias pertenecientes al complejo de *M. tuberculosis* (Verstijnen et al., 1989; Lee et al., 1992). Se ha observado una disminución en el título de anticuerpos contra la proteína de 16 kDa en individuos con enfermedad crónica y un aumento de los mismos en individuos con reincidencia bacteriológica, por lo que han empleado a esta proteína como un indicador (Bothamley, 1992), así mismo ha sido sugerida como un posible inmunógeno asociado a la fase temprana de la infección por *M. tuberculosis* (Barcenas-Morales, 1998).

### 1.7.2 Proteína de 38 kDa (P-38)

En un trabajo realizado por Young y cols. en 1992, reportan que la P-38 es una proteína secretada por *M. tuberculosis* que recibe también el nombre de PhoS así como nombres alternativos: CIE Ag78, Pab, US Japan Ag 5. Se han empleado anticuerpos monoclonales contra ésta proteína como: TB71, TB72, HYT28, HBT12, CD38.D1, F67.19 y HAT2 para su identificación. También han sido observadas como características inmunológicas de esta proteína: una respuesta humoral en pacientes positivos a tuberculosis, y una proliferación de células T *in vitro*, en respuesta a la vacuna de BCG después de su aplicación. Las funciones que tiene incluyen el enlace de proteínas; el potencial transporte de fosfato; señal de consenso entre péptidos y lipoproteínas; asociación de carbohidratos con proteínas purificadas.

El peso molecular de la P-38 corresponde a 38 kDa, está asociada a la pared celular. Tiene un 30% de homología en la secuencia de aminoácidos con la proteína periplásmica de *E. coli*. Se ha observado que esta proteína se encuentra en niveles elevados cuando la micobacteria se encuentra restringida de iones fosfato en medio de cultivo; fortaleciendo con esto la teoría de que está involucrada en el metabolismo del fosfato (Andersen et.al; 1990; Espitia et.al; 1992). También se ha observado que se trata de una lipoproteína y se encuentra en la capa lipídica media de la pared celular (Young and Garbe, 1991b). El dato obtenido por técnicas de inmunodetección de P-38 fue confirmado también por por microscopía electrónica, reportando la localización de esta proteína en la superficie de *M. tuberculosis* (Espitia et.al., 1992).

La información inmunoquímica e inmunológica acerca de la proteína de 38 KDa es extensa y la historia íntegra de ésta proteína ha sido revisada por Harboe and Wiker (1992). En 1981 la primer publicación describe los resultados de la producción de anticuerpos monoclonales reactivos a micobacteria (Coates et al., 1981). Dos de estos anticuerpos monoclonales, TB71 y TB72, fueron reportados por la capacidad presentada de discernir entre una infección por *M. tuberculosis*, BCG y otras especies de micobacterias empleando la técnica de radio-inmunoensayo. Sin embargo, inicialmente se asumió que esta proteína no estaba presente en BCG, lo que resulta contradictorio según Andersen (1986) y Wiker (1990); quienes demostraron que esta proteína está presente en BCG aunque en bajas cantidades.

La P-38 estimula los linfocitos T de ratones inmunizados, cuyes y humanos (Young, et al. , 1986; Worsaae, et al., 1987; Kadival, et al., 1987; HaslØv, et al., 1990; Vordereimer et al., 1991, 1992b), y se ha observado que algunos pacientes tuberculosos no expresan un epítipo particular a la proteína (Vordereimer et al., 1992a).

### **1.7.3 Complejo 45/47 Apa, MPT32, Rv1860, SRL 45/47ó MobD**

El complejo antigénico de 45/47 (Apa) se encuentra codificado en el gen *Apa* o *mod D*, constituyendo del 5 al 10% de las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* en filtrados de cultivo de BCG (Carbone, 1997; Laqueyreie, 1995).

Acerca de Apa, se ha observado su habilidad para interactuar principalmente con linfocitos T y/o anticuerpos inducidos mediante la previa inmunización con la bacteria atenuada. Se ha determinado que la presencia de manosa en la proteína Apa es esencial para que sea antigénica. Estas moléculas glicosiladas podrían ser las más importantes para la inmunización y/o vacunación debido a que son el blanco de las células dendríticas (Banchereau, 1998).

En una extensión del concepto de la existencia de receptores no específicos para patógenos, Stahl y Ezekowitz (1998) han propuesto la existencia de receptores de manosa en macrófagos y en células dendríticas, los cuales son capaces de reconocer estructuras moleculares compartidas por grandes grupos de patógenos. Esto se relaciona con la disminución en la inmunogenicidad de las moléculas de Apa no glicosiladas.

El complejo 45/47 ha sido obtenido a partir de filtrados de cultivo de BCG y de *M. tuberculosis* por su habilidad de elevar anticuerpos en cuyes inmunizados experimentalmente con *M. tuberculosis*; mientras que niveles de anticuerpos presentes en cuyes inmunizados con el microorganismo muerto son muy bajos o nulos. Se ha demostrado un punto valioso al inmunizar cuyes con la micobacteria viva, estos animales desarrollan anticuerpos hacia la proteína 45/47 de *M. bovis* BCG, pero no con

la bacteria muerta y si se detectan anticuerpos hacia este antígeno puede estar asociado con la infección y sirven para hacer un diagnóstico (Romain 1993).

#### **1.7.4 TIORREDOXINA, MPT46 ó Rv 2874**

Previamente se describió en *M. tuberculosis* una proteína designada como MPT46 que se encuentra presente en filtrados de cultivo, esta proteína es llamada ahora Tiorredoxina de *M. tuberculosis*. MPT46 es reconocida por anticuerpos hacia Tiorredoxina (Trx) de *E. coli* y también reconocida por anticuerpos generados por *M. leprae*. Se ha demostrado que la actividad enzimática de MPT46 con la de la Trx de otras especies es idéntica y es semejante en su habilidad para reducir insulina, por lo tanto MPT46 es funcionalmente la Trx activa (Wieles, 1995).

Sí realmente la Trx es una proteína de secreción esta puede fácilmente esforzar la actividad para generar radicales libres en el macrófago. Dentro de *Mycobacterium* la Trx puede provocar daño a las proteínas por el estrés oxidativo (Wieles, 1995).

En un estudio fue aislado y secuenciado un gen localizado entre los genes *mpt83* y *mpt70*. Este gen muestra 100% de homología con el gen *Rv2874* reportado en la base de datos del genoma de *M. tuberculosis*. También se le hizo a esta proteína un análisis en la computadora donde se muestra que es una proteína de membrana, y que presenta una secuencia aminoacídica similar al de proteínas encargadas de la biogénesis del citocromo C, como *DipZ* de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Haemophilus influenzae* (Crooke, 1995).

Gran parte del ciclo de vida de *M. tuberculosis* se realiza en un ambiente fuertemente oxidativo dentro del macrófago, por esta razón la bacteria requiere de un efectivo sistema antioxidante (Schorey, 1997). Uno de los componentes del sistema antioxidante es la catalasa-peroxidasa *katG* que es directamente responsable de la oxidación de isoniazida, un fármaco de primera elección para el tratamiento de la tuberculosis, para transformarla en el intermediario correspondiente con actividad antituberculosa (Johnsson, 1994; Zhang, 1992; Shoeb, 1985).

En aislamientos de muestras clínicas se ha observado que algunas micobacterias expresan altos niveles de alquil hidroperoxidasa (ahpC)<sup>2</sup> para compensar la pérdida de katG (Sherman, 1996; Sreevatsan, 1997). Las enzimas tiorredoxina (Trx) y tiorredoxin reductasa (TR) fueron estudiadas inicialmente porque se observó que tenían una actividad reductora equivalente a ahpC en *Saccharomyces cerevisiae* y algunos investigadores pensaron que las mismas enzimas podrían tener un papel similar en *M. tuberculosis* (Chae, 1994). Más tarde, en un trabajo realizado por Zhang y col., se encontró que Trx y TR no son reductores equivalentes de ahpC; sin embargo, poseen habilidad intrínseca para reducir peróxidos y otros aceptores de electrones, lo que puede ser una actividad relevante para que la bacteria sobreviva en un medio oxidativo (Zhang 1992).

#### 1.7.5 ESAT-6

Es un antígeno específico del complejo *M. tuberculosis* que actúa sobre las células T como un fuerte inductor de la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en pacientes tuberculosos (Ulrichs et al., 2000).

Este antígeno (de secreción temprana) de 6 kDa o ESAT-6 es rápidamente reconocido por las células T CD4<sup>+</sup> secretoras de IFN- $\gamma$  durante la infección con *M. tuberculosis*. Mediante el monitoreo de células mononucleadas en sangre periférica se sabe que ESAT-6 recombinante (rESAT-6) es reconocida por células T después de la infección natural (Mustafa, 2000).

Las proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* pueden ser potentes antígenos para las células CD4<sup>+</sup> Th1. Una de estas proteínas secretadas es ESAT-6; se trata de una proteína que se encuentra presente en *M. tuberculosis* y en cepas virulentas de *M. bovis* pero no en las cepas BCG de *M. bovis*, así mismo esta proteína no se ha detectado en *M. leprae*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum* y ni en *M. xenopi* (Geluk et al, 2002). ESAT-6 y sus péptidos derivados son

reconocidos de manera muy eficiente y específica por individuos expuestos a *M. tuberculosis* (Arend, 2000; Philipp, 1996; Ravn, 1999; Ulrichs, 2000).

En un estudio publicado por John Pollock, en 1997, menciona que los filtrados de cultivo *M. bovis* y *M. tuberculosis* contienen antígenos que son reconocidos por células T en varias fases de la infección. Entre los antígenos más reconocidos se encuentra ESAT-6; proteína de bajo peso molecular y se ha detectado que se produce en la fase temprana de la infección con *M. bovis* al hacer la prueba de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Mientras que otros antígenos de diferente peso molecular son reconocidos en grado similar pero en fases avanzadas.

ESAT-6 ha sido utilizada como un posible antígeno que permita diferenciar entre ganado infectado con *M. bovis* y ganado sensibilizado con otras cepas ambientales del género *Mycobacterium* que no presentan a esta proteína (Pollock 1995).

#### **1.7.6 Filtrados de cultivo**

Los filtrados de cultivo tienen la habilidad de estimular células T *in vivo* e *in vitro*, mientras no exista reconocimiento de los anticuerpos hacia los antígenos de la micobacteria muerta se sugiere que puede ser muy interesante usarlos como inmunógenos potencialmente protectivos (Collins 1988).

Sin embargo, no está claro como algunos de los antígenos de estos filtrados de cultivo están involucrados en la interacción de la hipersensibilidad celular del hospedador infectado. Algunos estudios sugieren que los antígenos proteicos presentes en las micobacterias pueden servir como potentes inmunógenos al introducirlos de una manera adecuada en un individuo (Young 1985). Los antígenos presentes en el filtrado de cultivo pueden ser identificados por anticuerpos monoclonales específicos como TB68 y TB71, y también se ha demostrado que estimula las células T en la respuesta inmune (Emmrich 1986). La micobacteria viva presumiblemente libera antígenos tales que pueden inducir hipersensibilidad a la tuberculina y que se adquiere resistencia contra la tuberculosis, aunque la micobacteria muerta puede poseer los mismos antígenos, estos inducen predominantemente la respuesta inmune humoral debido a la

liberación de polisacárido de la pared celular que es un antígeno digerido por los macrófagos (Collins, 1983; Mackaness 1974).

Las proteínas de los filtrados de cultivo inducen una respuesta tardía en ratones vacunados con BCG lo cual es muy semejante con la prueba de tuberculina estándar. Aunque estos antígenos de los filtrados de cultivo no son reconocidos por un panel de anticuerpos monoclonales específicos desarrollados contra antígenos de *M. tuberculosis*, hay un contraste con los reportes encontrados para la Proteína de 38 KDa, la cual induce una respuesta de hipersensibilidad retardada en cuyes y es reconocida por los anticuerpos monoclonales TB71 y TB72 (Collins 1988).

#### **1.7.6.1 AN-5**

Es un filtrado de cultivo de la cepa de referencia AN5 de *M. bovis*. En este filtrado se encuentran muchas proteínas tanto antigénicas como inmunogénicas y que son reconocidas por los anticuerpos de origen bovino y humano. También se encuentra un glucolípidio llamado 2,3-di-O-acyl trehalosa (DAT) que es muy similar al DAT de *M. tuberculosis*, que es antigénico y altamente específico (Papa, 1993).

#### **1.7.6.2 Rv-11**

Es un filtrado de cultivo de una cepa virulenta de *M. tuberculosis* nombrada H37Rv. Algunas proteínas han sido aisladas de esta cepa, como la proteína de 38 kDa. Las proteínas del filtrado de cultivo inducen una respuesta de hipersensibilidad retardada muy buena en individuos vacunados con BCG, comparándolo con individuos que se les realizó la prueba de PPD. La respuesta proliferativa hacia los antígenos de los filtrados de cultivo es equivalente a aquellos que se han hecho con PPD y extractos sonicados de *M. tuberculosis*. (Collins 1988).

#### **1.7.7 Derivados Proteicos Purificados**

Diez años después del descubrimiento de *M. tuberculosis*, Koch reportó componentes a partir de medio cultivo de *M. tuberculosis* (Koch, 1891); él preparó un producto conocido como tuberculina. Lo extrajo de un medio de cultivo de ocho

semanas de crecimiento y lo utilizó como vacuna contra la tuberculosis. Esta teoría fue abandonada posteriormente por el mismo Koch, ya que también hizo una importante observación; el producto era capaz de dar una reacción con una inyección subcutánea en 24 a 48 horas en animales y humanos. Esto sugirió que el producto llamado tuberculina podía ser utilizado para el diagnóstico de la infección por tuberculosis (Koch,1891,1897).

Empleando varios métodos de purificación, entre ellos el método de precipitación con sulfato de amonio, F. Seibert y B. Munday (1932) mostraron la fracción proteica contenida en el compuesto de la tuberculina a partir del medio de cultivo. El material purificado fue denominado como Purified Protein Derivatives "PPD", término y producto que actualmente sigue siendo empleado en diagnóstico de la tuberculosis como una herramienta epidemiológica. La estandarización de métodos para la obtención y purificación de proteínas van variando, pero esencialmente los productos son proteínas de *Mycobacterium*, que son recolectadas por precipitación con sulfato de amonio ó con ácido tricloroacético, después se inactivan con calor, se filtran y se concentran.

Actualmente se ha obtenido PPD a partir de otras especies de *Mycobacterium*, y se ha observado que presentan reacción cruzada entre ellas, ya que las purificados exhiben más de un 50% de homología en su secuencia de aminoácidos (Bloom, R.,1994). El PPD bovino es elaborado a partir de cultivo con *M. bovis* de la cepa AN-5 y el PPD aviar es elaborado a partir de *M. avium* de la cepa D4. El número de unidades internacionales (UI) de tuberculina varía de 2,000 a 10,000, según los países a mayor dosis de UI de tuberculina, la prueba se hace más sensible pero menos específica (Cañez, 1995).

## 1.8.0 DIAGNÓSTICO

Los programas de erradicación de la tuberculosis bovina comenzaron desde hace más de 50 años a nivel mundial y a partir de 1971 como una campaña permanente en México (López y Hernández, 1997); a pesar de esto, en algunas regiones de nuestro país se han detectado prevalencias mayores al 25% de tuberculosis bovina (Valdespino et al., 1995). El control efectivo y la erradicación de la tuberculosis dependen de la identificación y de remoción de la fuente potencial de la infección; sin embargo, la gran mayoría de los controles de erradicación se basan en la prueba de diagnóstico convencional (tuberculina), la cual posee muy baja sensibilidad y presenta tanto falsos positivos como falsos negativos. La falta de otra técnica de diagnóstico confiable en bovinos hace imposible el hecho de que esta prueba se pueda descartar.

### 1.8.1 Diagnóstico bacteriológico

El diagnóstico bacteriológico es el más preciso de todos, se puede realizar por examen directo (frotis) o por cultivo. El material a usarse debe ser tomado de los ganglios o trozos de órganos afectados, también se puede aislar la micobacteria de exudados nasales. El microorganismo se aísla en medios enriquecidos como el Löwestein-Jensen al que se le adiciona piruvato para la recuperación de *M. bovis*. Otro medio que se usa para el aislamiento es el Stonebrink (Schettino, 2000). Las pruebas de identificación por las que se establece la especie de la micobacteria aislada son las que se indican en el cuadro 2:

**Cuadro 2.** Pruebas bioquímicas de *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

Bacteria	Catalasa	arilsulfatasa	ureasa	pirazinamidasa	Crecimiento en hidracina de ac de tiofeno 2 carboxílico	Crecimiento en NaCl 5%	Crecimiento en Mac Conkey
<i>M. bovis</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>M. tuberculosis</i>	-	-	+	+	+	-	-

Como se puede ver las pruebas por las que se distingue *M. bovis* de *M. tuberculosis* son las pruebas de la pirazinamidasa e hidracina de ácido de tiofeno 2-carboxílico (Koneman, 2001).

### **1.8.2 Prueba de la tuberculina.**

Se llama tuberculina a los extractos proteicos de *M. tuberculosis*, *M. bovis* o *M. avium*, utilizados como antígenos en las pruebas cutáneas empleadas para identificar a los individuos que padecen tuberculosis.

La tuberculina se aplica por vía intradérmica, transcurridas varias horas se produce una vasodilatación, eritema e inflamación; la inflamación tiene como característica especial su dureza. La población celular que infiltra el tejido son macrófagos y linfocitos, aunque en las primeras horas pueden aparecer neutrófilos; la reacción alcanza su mayor intensidad de 24 a 72 horas después de la inyección. La reacción a la tuberculina es específica y se debe a células T sensibles al antígeno. La acumulación de macrófagos se debe a la liberación de factores quimiotácticos para macrófagos, quedando luego impedida su migración a partir del foco por la presencia de factores inhibidores de la migración (Cañez, 1995).

La prueba de tuberculina en el ganado bovino se realiza inoculando de 0.5 a 1 ml de PPD preparada con *M. bovis* y/o *M. avium*, la cual se inyecta en el pliegue anal y se examina el foco de infección al cabo de 72 horas. La reacción a la tuberculina es específica desde el punto de vista inmunitario y es mediada por linfocitos T. Se cree que esta reacción se lleva en dos etapas; en la primera etapa existe la teoría de que los linfocitos T circulantes encuentran al antígeno inyectado, responden haciendo que las células vecinas se degranulen y liberen factores vasoactivos como la serotonina. El aumento de la permeabilidad y la apertura de los espacios entre las células endoteliales de los capilares permiten que más linfocitos T emigren por la sangre al interior de los tejidos. En la segunda etapa de la reacción, esos linfocitos T que emigraron encuentran a los antígenos que les presentan las células de Langhans, y posteriormente se dividen, diferencian y liberan linfocinas. No está claro que linfocinas actúan, sin embargo se cree que los macrófagos se acumulan en el lugar debido a la liberación de factores quimiotácticos y su emigración se ve inhibida por acción de factores inhibidores de la migración (Cañez, 1995).

Los cambios vasculares probablemente se deben a la liberación de mediadores de la inflamación aún no claramente definidos y de enzimas lisosomales de los macrófagos. Los macrófagos interfieren y por último eliminan al antígeno inyectado lo cual permite que las condiciones regresen a la normalidad (Cañez, 1995).

### **1.8.3 Prueba de interferón gamma**

La prueba de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) evalúa la inmunidad celular en respuesta a un antígeno específico bajo un sistema de cultivo con sangre completa. La sangre del bovino tiene linfocitos que reconocen antígenos micobacterianos presentes en el PPD y como resultado inducen la secreción del IFN- $\gamma$ , que puede ser detectado con un ensayo inmunoenzimático empleando anticuerpos monoclonales (Díaz, 2002).

### **1.8.4 Técnicas de biología molecular**

Por otra parte, algunos investigadores han implementado la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para el diagnóstico; sin embargo, esta técnica también llega a presentar reacción cruzada con otras micobacterias lo que conlleva a resultados erróneos. No obstante, es una herramienta de mucha utilidad para el diagnóstico de infecciones bacterianas intracelulares y de difícil crecimiento (Niel et al., 1992; Talbot et al., 1997).

El método conocido como spoligotyping, consiste en la amplificación por PCR de una región repetitiva presente sólo en miembros del complejo *M. tuberculosis*. Los productos de la amplificación se hibridan con oligonucleótidos sintéticos fijados a una membrana de nylon, y que corresponden a las regiones espaciadoras de la región repetitiva. Este método se ha empleado en la tipificación de micobacterias aisladas de cultivos y en la detección de DNA de micobacterias de exudado nasal en bovinos (Díaz, 2002).

## 2.0 JUSTIFICACIÓN

La detección de anticuerpos es una de las herramientas más comúnmente utilizadas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas (Rose, 1998). Las técnicas serológicas son simples, rápidas, relativamente económicas y no requieren del aislamiento o del cultivo del agente patógeno. En las infecciones causadas por ciertos patógenos, por ejemplo en el género *Mycobacterium*, se genera un repertorio heterogéneo de anticuerpos por lo que en el diagnóstico de esta enfermedad se recomienda emplear mezclas de múltiples antígenos para cubrir, en toda su extensión, la respuesta mediada por anticuerpos (Lyashchenko et al., 1998).

Por consiguiente, es importante continuar en la búsqueda de un método de diagnóstico confiable para identificar animales tuberculosos. Se han reportado varios casos de muerte del ganado, e incluso la transmisión de la infección a humanos; por lo que se debe de combatir esta enfermedad y tratar de hacer un pronóstico temprano para detectar animales que pueden estar infectados y funcionar como portadores del microorganismo. Los métodos serológicos por ejemplo ELISA para detectar anticuerpos contra las micobacterias son relativamente simples, rápidos, menos costosos y no requieren de aislamiento o del cultivo del agente patógeno; pero hasta la fecha tienen poca sensibilidad y especificidad (Lyashchenko, 2000).

Es por eso que en el presente trabajo se pretende utilizar el método serológico de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos (IFMA) empleando como soporte membranas de Nylon (NY), para lograr una identificación rápida, sencilla y económica de animales infectados. Esta técnica permitirá trabajar con un número considerable de diferentes antígenos, utilizando volúmenes y concentraciones pequeñas de cada uno de ellos; así mismo se emplea un volumen mínimo de las muestras de suero y reactivos utilizados.

### **3.0 HIPOTESIS**

La producción de anticuerpos en bovinos tuberculosos y en bovinos PPD dudosos revelará un reconocimiento heterogéneo hacia antígenos protéicos micobacterianos particulares, y por lo tanto presentará un patrón antigénico serológicamente diferente al de animales sanos .

### **4.0 OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General**

Analizar y comparar la producción de anticuerpos séricos hacia diferentes antígenos micobacterianos presentados por animales PPD positivos, animales sanos (PPD negativos) y animales PPD dudosos a *Mycobacterium bovis* mediante la técnica de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos (IFMA) empleando membranas como medio de soporte.

#### **4.2 Objetivos particulares**

- ◆ Determinar el medio de soporte adecuado para la fijación de antígenos micobacterianos y para obtener un claro reconocimiento antigénico por las muestras séricas bovinas, empleando membranas de nitrocelulosa y de nylon.
  
- ◆ Determinar la(s) concentración(es) óptima(s) de los antígenos analizados.
  
- ◆ Analizar el patrón de reconocimiento antigénico hacia proteínas micobacterianas, presentado por los distintos grupos de animales a estudiar en el presente trabajo.

## **5.0 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1.0 Reactivos biológicos:**

#### **5.1.1 Proteínas**

- ESAT-6 proporcionada por el Dr. Eduardo Sada del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
- P-38, 45/47 Kda y Tiorredoxina proporcionados por la Dra. Clara Espitia Pinzón del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.
- rPT-16 fue proporcionada por la Dra. Gabriela Barcenás Morales, Posgrado FES Cuautitlán, UNAM.

#### **5.1.2 Filtrados de cultivo**

AN-5, RV-11 y Rv-12 fueron proporcionados por la Dra. Clara Espitia Pinzón, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

#### **5.1.3 Derivados Proteicos Purificados**

- PPD bovis y PPD aviar (PRONABIVE), fueron proporcionados por la pM.C. Aurora Romero Tejeda. Laboratorio de Inmunología del INIFAP.
- PPD tuberculosis proporcionado por la Dra. Iris Estrada de la Escuela Nacional de ciencias Biológicas del IPN.

#### **5.1.4 Conjugados**

- Conjugado Anti-IgG bovino-peroxidasa, molécula completa obtenido en conejo (SIGMA:A-8917).
- Conjugado Anti-IgG bovino-fosfatasa alcalina molécula completa, obtenido en conejo (SIGMA: A-0668).

### 5.1.5 Sueros

Se trabajó con un total de 95 sueros de origen bovino, los cuales se obtuvieron de animales reactivos positivos, negativos y dudosos a la primera prueba de tuberculina. Estos sueros se colectaron de animales que se encontraban en el Rancho Almaráz de la FES-Cuautitlán, UNAM Campo 4, ubicada en la carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Km 25, Cuautitlán, Estado de México.

La información general que se obtuvo de los bovinos se muestra en las tablas 1, 2 y 3, donde se especifica la edad, el sexo, los resultados de la primera prueba de tuberculina (la cual se les realizó a todos los animales antes del muestreo sanguíneo); los resultados de la segunda y tercera prueba de tuberculina (que se realizó posteriormente a la toma de muestras sanguíneas y sólo para algunos bovinos); así como los animales que se sacrificaron y que presentaron lesiones pulmonares. Esta información fue proporcionada por la MVZ Aurora Romero.

**Tabla 1.** Información general de los bovinos PPD positivos de los cuales se obtuvieron las muestras séricas analizadas en el presente trabajo, los animales se clasificaron como PPD positivos en base a los resultados de la primera prueba de tuberculina realizada antes del muestreo sanguíneo.

SUERO	1° PPD	2° PPD	3° PPD	LESIÓN	EDAD (meses)	SEXO
08	P	P	P	+	87	H
37	P	P	P	+	60	H
40	P	ND	ND	-	64	H
56	P	ND	ND	-	57	H
127	P	P	ND	-	74	H
172	P	ND	ND	-	74	H
203	P	P	P	+	50	H
206	P	P	P	+	51	H
212	P	P	ND	+	48	H
213	P	P	P	+	40	H
220	P	P	P	+	44	H
241	P	D	P	ND	39	H
249	P	P	P	+	39	H
254	P	P	ND	+	50	H
286	P	N	P	ND	35	H
289	P	P	P	ND	34	H
307	P	P	P	ND	33	H
316	P	P	N	+	32	H
319	P	P	P	ND	47	H
351	P	P	ND	-	33	H
362	P	N	ND	-	28	H
510	P	ND	ND	ND	6	H

P = POSITIVO  
 D = DUDOSO  
 N = NEGATIVO  
 + = PRESENCIA DE LESIONES  
 - = SIN PRESENCIA DE LESIONES  
 H = HEMBRA  
 M = MACHO  
 ND = PRUEBA NO DETERMINADA

**Tabla 2.** Información general de los bovinos PPD negativos de los cuales se obtuvieron las muestras séricas analizadas en el presente trabajo, los animales se clasificaron como PPD negativos en base a los resultados de la primera prueba de tuberculina realizada antes del muestreo sanguíneo.

SUERO	1º PPD	2º PPD	3º PPD	LESIONES	EDAD	SEXO
21	N	N	N	ND	85	H
55	N	D	D	ND	58	H
58	N	N	N	ND	56	H
61	N	P	N	-	54	H
208	N	N	N	+	51	H
209	N	ND	ND	ND	50	H
215	N	D	N	ND	48	H
216	N	N	N	ND	48	H
218	N	P	N	ND	45	H
233	N	N	N	ND	41	H
285	N	P	ND	ND	41	H
296	N	N	N	ND	34	H
300	N	N	N	ND	34	H
305	N	N	D	ND	33	H
320	N	ND	ND	-	31	H
322	N	ND	ND	-	32	H
328	N	P	P	-	32	H
340	N	P	N	ND	28	H
354	N	P	P	-	27	H
363	N	ND	ND	ND	22	M
375	N	ND	ND	ND	19	M
377	N	N	N	ND	18	H
378	N	ND	ND	ND	18	M
381	N	ND	ND	ND	15	M
382	N	ND	ND	ND	16	M
383	N	ND	ND	ND	16	H
384	N	ND	ND	ND	16	M
387	N	ND	ND	ND	15	M
395	N	ND	ND	-	11	H
508	N	ND	ND	ND	18	M
509	N	ND	ND	ND	6	H
511	N	D	N	ND	22	H
513	N	ND	ND	ND	19	M
516	N	ND	ND	ND	21	H
517	N	ND	ND	ND	21	H
520	N	ND	ND	ND	23	M
528	N	ND	ND	ND	10	M

P = POSITIVO  
 D = DUDOSO  
 N = NEGATIVO  
 + = PRESENCIA DE LESIONES  
 - = SIN PRESENCIA DE LESIONES  
 H = HEMBRA  
 M = MACHO  
 ND = PRUEBA NO DETERMINADA

**Tabla 3.** Información general de los bovinos PPD dudosos de los cuales se obtuvieron las muestras séricas analizadas en el presente trabajo, los animales se clasificaron como PPD dudosos en base a los resultados de la primera prueba de tuberculina realizada antes del muestreo sanguíneo.

SUERO	1° PPD	2° PPD	3° PPD	LESIONES	EDAD	SEXO
59	D	N	N	+	60	H
224	D	D	N	ND	43	H
235	D	P	N	ND	39	H
236	D	N	N	ND	39	H
277	D	P	P	-	36	H
290	D	N	P	ND	34	H
293	D	N	N	ND	34	H
314	D	N	D	ND	32	H
315	D	P	P	-	30	H
336	D	D	D	ND	30	H
348	D	ND	ND	ND	29	H
350	D	ND	ND	ND	28	H
352	D	D	P	ND	25	H
358	D	ND	ND	-	24	H
365	D	P	N	ND	22	H
366	D	ND	ND	-	22	H
376	D	ND	ND	ND	18	H
385	D	D	N	ND	16	H
386	D	N	P	ND	16	H
390	D	N	D	ND	15	H
391	D	ND	ND	ND	13	M
392	D	N	N	ND	13	H
399	D	ND	ND	ND	12	H
400	D	ND	ND	-	23	M
501	D	D	D	ND	24	H
502	D	D	N	ND	23	H
503	D	D	P	ND	7	H
504	D	ND	ND	ND	19	M
505	D	D	N	ND	23	H
507	D	ND	ND	ND	7	H
512	D	D	N	ND	22	H
514	D	D	N	ND	21	H
515	D	D	N	ND	20	H
518	D	D	N	ND	21	H
519	D	N	N	ND	47	H
521	D	ND	ND	ND	23	H

P = POSITIVO  
 D = DUDOSO  
 N = NEGATIVO  
 + = PRESENCIA DE LESIONES  
 - = SIN PRESENCIA DE LESIONES  
 H = HEMBRA  
 M = MACHO  
 ND = PRUEBA NO DETERMINADA

## **5.2 Reactivos**

### **5.2.1 Sustratos**

- Alfa-cloro-naftol (SIGMA: C-8890)
- 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato sal de nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) (ZYMED: 002209).
- Peróxido de hidrógeno al 30% (Fermont:56001).
- Peróxido de hidrógeno al 50% (Fermont: 56021).

### **5.2.2 Otros reactivos**

Los demás reactivos empleados para la preparación de sustrato y solución bloqueadora; fueron de diversas marcas, como Merck, Baker, Sigma de grado reactivo.

### **5.3.0 Equipo**

- Cámara de fijación Miniblotter 45 (Immunetics)
- Centrifuga (Heraeus, modelo Biofuge Primo R)
- Placas de incubación
- Bomba de vacío (Siemens)
- Soporte de Nitrocelulosa (Millipore Immobilion-P: HAHY 00010)
- Soporte de Nylon (Millipore Immobilion-P: IPVH 00010)

## **5.4.0 Metodología**

### **5.4.1 Obtención de suero**

Los animales se sangraron de la vena yugular, obteniéndose 5 mL de sangre y las muestras se incubaron durante 30 min a 37 C. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. Los sueros se distribuyeron en alícuotas y se conservaron a -20 C.

### **5.4.2 Activación de las membranas**

Se emplearon membranas de nylon (Millipore Immobilion-P: IPVH 00010) de 45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y con dimensiones de 15 cm x 15 cm, estas membranas se sumergieron en metanol a temperatura ambiente para activarlas. Las membranas de nitrocelulosa (Millipore Immobilion-P: HAHY 00010) del mismo tamaño de poro y dimensiones se sumergieron en buffer de fosfatos (PBS) por el mismo tiempo, posteriormente ambas fueron enjuagadas en PBS.

### **5.4.3 Fijación de diferentes concentraciones de antígeno**

Se utilizó el antígeno Rv-12 que consiste en un extracto micobacteriano correspondiente a la cepa RV-12 cepa de *M. tuberculosis* el cual se preparó a tres diferentes concentraciones: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Estas soluciones fueron fijados a una membrana de Nylon (15 x 15 cm), utilizando la cámara de fijación. Se depositaron 133  $\mu\text{L}$  de cada solución de antígeno por carril, teniendo la precaución de no formar burbujas de aire. Se incubaron en agitación durante 30 minutos y posteriormente se retiraron las soluciones de los antígenos por carril con ayuda de una micropipeta o con bomba de vacío, finalmente las membranas se enjuagaron con PBS, y de cada membrana se cortaron tiras de aproximadamente 0.3 mm de ancho, el corte de éstas se realizó en forma vertical a la orientación en que fueron fijados los diferentes antígenos trabajados, para conservarlas a 4 C hasta el momento de su uso.

Para confirmar la fijación del antígeno a las membranas se realizaron las siguientes tinciones con una tira de cada uno de los extremos de dichas membranas:

- Para la membrana de Nylon se utilizó la solución tefidora de Azul de Coomasie R-250 al 0.125% (ver apéndice). Se incubó de 5 a 10 min, transcurrido este tiempo se lavó con agua destilada y posteriormente con la solución desteñidora (ver apéndice) hasta observar la aparición de las bandas. Por último se lavó con agua destilada para remover los residuos de la solución desteñidora.
- Para la membrana de nitrocelulosa se utilizó Negro de amido al 0.1 %

#### 5.4.4 Estandarización de la Técnica de IFMA

Una vez determinadas y seleccionadas las concentraciones de los antígenos, se fijaron a la membrana de nylon y de nitrocelulosa para la estandarización de otros parámetros, para ello se trabajaron diferentes condiciones:

##### ***Procedimiento A***

1. Se cortaron tiras tanto de nylon como nitrocelulosa.
2. Se agregó la solución de bloqueo<sub>1</sub> de ASB, (ver apéndice) en cada tira, con un volumen necesario para cubrir las tiras.
3. Se incubaron por 90 minutos en agitación, posteriormente se realizaron de 5 a 6 lavados con PBS-Tween (PBS-T) usando bomba de vacío para eliminar el PBS-T y se dejaron secar a temperatura ambiente por 5 minutos aproximadamente.
4. Se adicionaron las muestras de sueros bovinos diluidos 1:100 en SB<sub>1</sub> a cada tira.
5. Se incubaron durante una hora en agitación a temperatura ambiente.
6. Posteriormente se lavaron las tiras con PBS-T de 5 a 6 veces
7. Se adicionó el conjugado IgG anti-bovino peroxidado (molécula completa) obtenido en conejo (Sigma Immuno Chemicals), se utilizó una dilución 1:2000 en SB<sub>1</sub>.
8. Se incubaron nuevamente de 45 a 60 minutos en agitación y se lavaron 5 veces con PBS-T, el sexto lavado se realizó con PBS y se dejó secar.

9. Finalmente se agregó la solución de revelado alfa-cloro-naftol (ver apéndice) se utilizó peróxido de hidrógeno al 30 y 50%. Cubriendo totalmente la tira hasta observar la aparición de bandas color violeta principalmente en el control positivo; posteriormente se detuvo la reacción de revelado lavando las tiras con agua destilada o PBS.

Cito a continuación solamente las modificaciones realizadas a las descritas en el procedimiento A :

#### ***Procedimiento B***

Las tiras de nylon no se bloquearon.

- La solución diluyente para el antígeno y el conjugado fue la SB<sub>2</sub> (ver apéndice).
- Se llevaron a cabo todos los pasos posteriores al bloqueo (punto No.4) descritos en el procedimiento A.

#### ***Procedimiento C***

- Se usaron tiras de nylon las cuales fueron bloqueadas con ASB al 1% por 90 min, se lavó 5 veces con PBS-T.
- Los sueros problema se diluyeron (1:100) en la SB<sub>1</sub> y se dejaron incubando con agitación a temperatura ambiente por 60 min.
- Se usó IgG-fosfatasa alcalina anti-bovino, como conjugado (SIGMA: A-0668) a una dilución de 1:2000.
- Finalmente las tiras fueron reveladas el sustrato para fosfatasa alcalina BCIP/NBT, (ZYMED 002209).

#### ***Procedimiento D***

- Se usaron tiras de nitrocelulosa las cuales fueron bloqueadas con SB<sub>3</sub> (ver apéndice), y se realizaron los mismos pasos de la condición A.)

En cada proceso o condición se corrieron los respectivos controles:

- Control negativo sueros negativos a la prueba de PPD y aislamiento negativo.
- Control positivo sueros positivos a PPD y aislamiento positivo en cultivo.

Los antígenos utilizados fueron las siguientes proteínas recombinantes: ESAT-6, Thioredoxina, P38, 45/47 y rPT16. Así mismo se utilizaron los filtrados de cultivo AN-5 y RV-11, y los derivados proteicos purificados: PPD bovino, PPD tuberculosis y PPD aviar.

Utilizando sueros control positivo y negativo se determinó que las concentraciones más adecuadas de los antígenos fueron: 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$  para las proteínas recombinantes y 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  para los extractos. Estos antígenos fueron fijados a una membrana de nylon de 15 X15 cm. Como ya se describió en el párrafo 5.4.3.

Para la realización de la técnica de IFMA se emplearon membranas de nylon sin bloquear, ya que de esta manera se obtuvieron mejores resultados. Las condiciones de trabajo que fueron elegidas, ya que mostraron mejores resultados fueron las descritas en el procedimiento B, con algunas modificaciones que a continuación se describen:

#### ***Procedimiento B modificado***

- Se incubaron las tiras de sin bloquear con cada uno de los sueros bovinos usando una dilución 1:70 en SB<sub>2</sub>.
- Se dejaron incubando a 4 C durante toda la noche.
- Se lavaron con PBS-T y se dejaron secar las tiras para proseguir con la incubación del conjugado anti-IgG bovino peroxidado (SIGMA:A-8917) a una dilución de 1:1000 en SB<sub>2</sub> y se dejó incubar por 3 horas en agitación, a temperatura ambiente; repitiendo los lavados una vez transcurrido el tiempo.
- Se detectó la actividad de la peroxidasa con la solución reveladora de  $\alpha$ -cloronaftol y peróxido al 50% de la cual se agregó a cada tira el volumen suficiente para cubrirla. Finalmente se dejaron con el revelador 15 minutos hasta la aparición de bandas
- La reacción se detuvo adicionando PBS.
- Las tiras se conservaron protegidas de la luz para su posterior análisis.

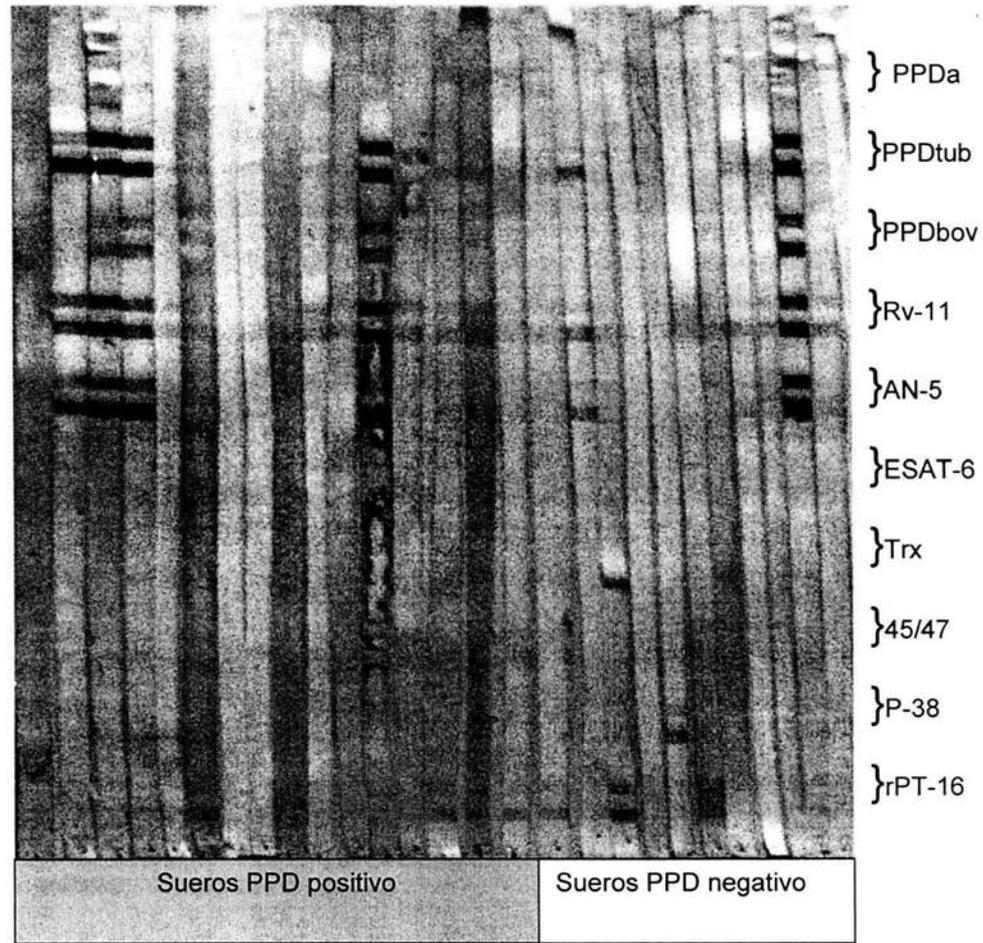
Mediante la técnica de Dot ELISA se determinó que el conjugado más apropiado para realizar la técnica de IFMA era el conjugado peroxidado anti-IgG bovino obtenido en conejo (SIGMA:A-8917) diluido 1:1000 en la solución bloqueadora de PBS-T con leche descremada al 5%. Finalmente para la técnica de IFMA se empleó la solución reveladora de  $\alpha$ -cloronaftol (SIGMA: C8890) con peróxido de hidrógeno al 50% (Fermont: 56021).

## 6.0 Resultados

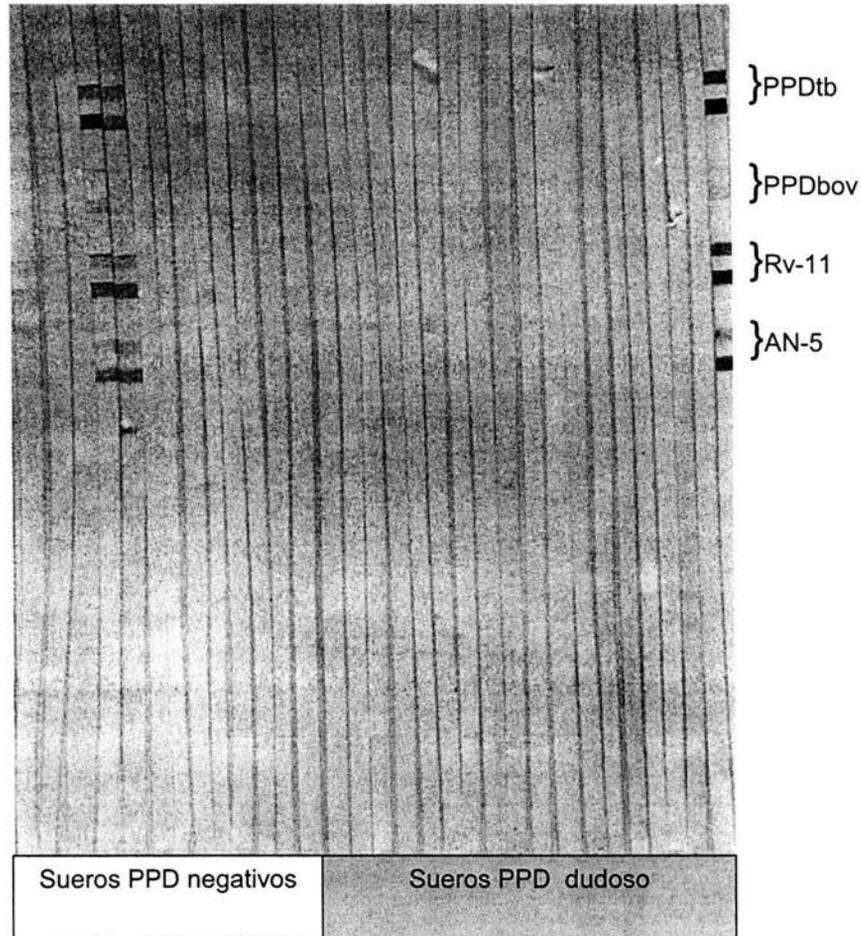
Para la presentación de resultados posteriores los animales se clasificaron, como se mencionó anteriormente, en tres grupos (PPD positivo, PPD negativo y PPD dudoso) en base a los resultados obtenidos de la primera prueba de tuberculina que se les realizó a los bovinos antes de la toma de muestras sanguíneas utilizadas en el presente trabajo.

En las Figuras 1 y 2 se presentan algunas de las tiras obtenidas en la técnica de IFMA, en la que se puede apreciar sueros que dan un reconocimiento positivo o negativo a los diferentes antígenos utilizados (proteínas, filtrados de cultivo y derivados protéicos purificados micobacterianos) y en las dos concentraciones empleadas de los mismos. Se puede apreciar que algunos de los sueros reconocen las dos concentraciones. La concentración baja es la que se observa en la parte superior de la figura y la concentración mayor esta en la parte inferior de la llave que señala al antígeno. En la Figura 1 se presenta el panel A en el que se trabajaron sueros PPD+ y algunos PPD-. En la Figura 2 se muestra el panel B de algunos sueros PPD- y PPD+/-.

**Fig. 1** Reconocimiento hacia los antígenos micobacterianos por los sueros bovinos usados en la técnica de IFMA (PANEL A).



**Fig. 2** Reconocimiento hacia los antígenos micobacterianos por los sueros bovinos usados en la técnica de IFMA (PANEL B).



En las Tablas 4, 5 y 6 se reportan los resultados obtenidos del reconocimiento hacia los diferentes antígenos micobacterianos por los sueros bovinos pertenecientes a los tres grupos de animales trabajados: PPD positivo, PPD negativo y PPD dudoso, respectivamente. Los resultados en dichas tablas se reportan en grado de la intensidad de color que presentó cada una de las bandas de reconocimiento que se muestran en la Figuras 1 y 2, y que se definieron de la siguiente manera: 1 = Bajo, correspondió a una banda con una intensidad de color tenue; 2 y 3 = Medio, a una banda con una intensidad de color media y finalmente, 4 y 5 = Alto, donde la intensidad del color de la banda resultó ser más fuerte que la del caso anterior. Los sueros que no se enlistan en estas tablas no reconocieron ninguno de los antígenos analizados en el presente trabajo.

Cabe mencionar que a pesar de que se trabajaron dos diferentes concentraciones de cada uno de los antígenos, el futuro reporte y análisis de resultados se realizó considerando solo las concentraciones más altas (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para las proteínas purificadas y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para los filtrados y extractos).

**Tabla 4. Reconocimiento antigénico de sueros bovinos PPD positivos**

Suero	rPT-16		P-38		45/47		Trx		ESAT-6		AN-5		Rv-11		PPDb		PPDt		PPDa	
	10µg	20µg	10µg	20µg	10µg	20µg	10µg	20µg	10µg	20µg	100µg	200µg								
8	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	1	2	1	2	-	-	
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	1	2	1	1	2	3	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	3	-	-	2	3	-	-
127	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	1	1	1	2	-	-
206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	1	2	-	-	1	2	-	-
212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	-	-	1	2	-	-
220	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	1	2	-	-	-
241	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	3	-	-	2	3	-	-
249	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4	1	3	2	2	3	3	1	1
286	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	1	1	-	-
289	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	3	4	2	2	4	5	1	1
307	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
316	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
351	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-
362	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1
510	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-

**GRADO DE INTENSIDAD**

1= BAJO

2 y 3 = MEDIO

4 y 5 = ALTO

- = SIN RECONOCIMIENTO

**Tabla 5.** Reconocimiento antigénico de sueros PPD negativos

Suero	rPT-16		P-38		45/47		Trx		ESAT-6		AN-5		Rv-11		PPDb		PPDt		PPDa	
	10µg	20µg	10µg	20µg	10µg	20µg	10µg	20µg	10µg	20µg	100µg	200µg								
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	3	3	1	1	3	3	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5	4	5	2	3	5	5	-	-
58	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	1	2	-	-	1	2	-	-
208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	1	1	2	2	-	-
215	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	-	-	1	2	-	-
216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	-	-
285	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
305	1	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
322	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	3	3	1	2	3	4	-	-
354	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
375	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
520	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-

**GRADO DE INTENSIDAD**

1= BAJO

2 y 3 = MEDIO

4 y 5 = ALTO

- = SIN RECONOCIMIENTO

**Tabla 6.** Reconocimiento antigénico de sueros PPD sospechosos

Suero	rPT-16		P-38		45/47		Trx		ESAT-6		AN-5		Rv-11		PPDb		PPDt		PPDa	
	10µg	20µg	10µg	20µg	10µg	20µg	10µg	20µg	10µg	20µg	100µg	200µg								
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4	2	3	-	1	4	5	-	-
224	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	1	1	-	-
277	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
314	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-
385	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-

**GRADO DE INTENSIDAD**

1= BAJO

2 y 3 = MEDIO

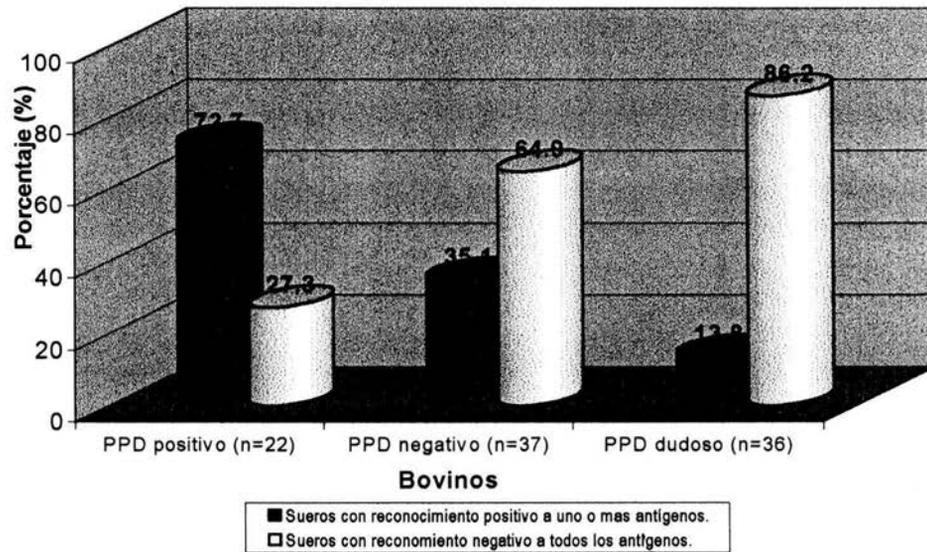
4 y 5 = ALTO

- = SIN RECONOCIMIENTO

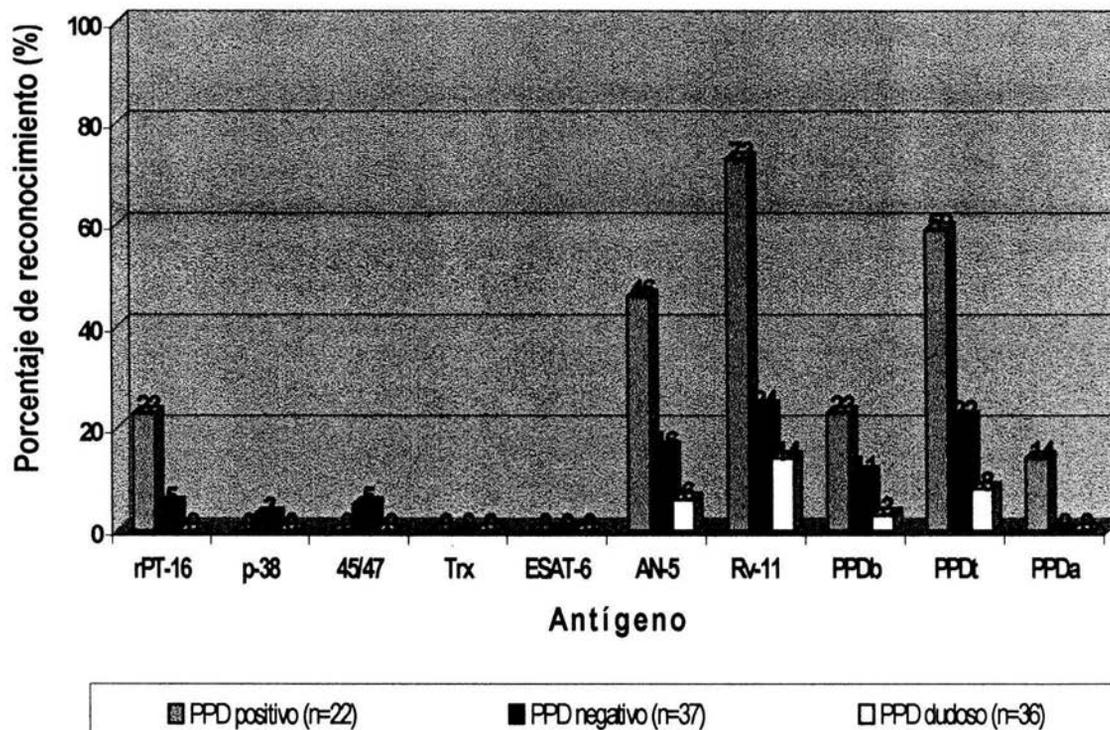
En la Figura 3, se presentan los valores de los porcentajes correspondientes a cada grupo de bovinos (PPD positivo, PPD negativo y PPD dudoso) que reconocieron por lo menos a uno de los diferentes antígenos micobacterianos trabajados en el presente estudio, así mismo se muestran los porcentajes de los sueros que resultaron negativos a todos los antígenos. El 72.7% de los sueros de bovinos PPD+ reconocieron al menos un antígeno y el 27.3% de los sueros de este mismo grupo no reconocieron ninguno de los antígenos. En el grupo de los bovinos PPD- se obtuvo un porcentaje de reactividad a por lo menos uno de los antígenos del 35.1% y 64.9% de no reactividad; en el grupo de los bovinos PPD+/- el reconocimiento fue más bajo que en los dos grupos anteriores, el 13.8% reconocieron al menos un antígeno y el 86.2% no reaccionaron con ninguno de ellos.

La Figura 4, muestra los valores de los porcentajes de reconocimiento a cada uno de los diferentes antígenos micobacterianos que presentaron los sueros de bovinos correspondientes a los grupos de animales positivos, negativos y dudosos a la prueba de tuberculina. Los bovinos PPD+ reconocieron los antígenos en los siguientes porcentajes: rPT16 (22.7%), RV-11(72.7%), AN-5 (45.5%), PPDtub (59%), PPDbov (22.7%) y PPDav (13.6%). Los valores correspondientes a los bovinos PPD- fueron: rPT16 y 45/47 (5.4%), p-38 (2.7%), RV-11 (21.6%), AN-5 (16.2%), PPDtub (21.6%), y PPDbov (10.8%). Los bovinos PPD+/- solamente reconocieron a RV-11, PPDtub, AN-5 y PPDbov en un intervalo de 13.8%, 8.3%, 5.5% y 2.8%.

**Figura 3.** Porcentajes del número de sueros que presentaron un reconocimiento positivo o negativo a antígenos micobacterianos en grupos de bovinos positivos, negativos y dudosos a la prueba de tuberculina.



**Figura 4.** Valores de los porcentajes de reconocimiento a cada uno de los diferentes antígenos micobacterianos que presentaron los sueros de bovinos correspondientes a los grupos de animales positivos, negativos y dudosos a la prueba de tuberculina.



## 7.0 DISCUSION

Existe la teoría de que la tuberculosis probablemente ocurra como una enfermedad entre animales por un período determinado antes de infectar al humano, esto fue observado con *Mycobacterium bovis* por Daniels y cols (Bloom, 1994). El humano presenta un alto riesgo a la exposición del aerosol producido por el bovino tuberculoso o a la ingesta de leche infectada. *M. bovis* puede ser transmitido entre animales, de animal a humanos, entre humanos y de humanos regresar a animales (Davies, 1998). La expresión de los signos de infección con *Mycobacterium* es variado y depende de una gran variedad de factores (edad, estado inmune, virulencia del microorganismo, predilección o tropismo por un tejido específico, entre otros).

Durante la historia ha existido la tendencia general de elucidar la interacción de los componentes individuales de la micobacteria con el sistema inmune de humanos o animales. Por ende, desde el descubrimiento de la tuberculosis se han realizado esfuerzos por tratar de establecer técnicas de diagnóstico de la misma, y así mismo, de alguna manera analizar la interacción de los compuestos antigénicos de la bacteria con el desarrollo de la respuesta inmune del hospedador (Bloom, 1994). Actualmente en nuestro país una prueba de tuberculina positiva es la evidencia utilizada más comúnmente en la práctica para la detección de la infección latente con el microorganismo; esta prueba puede proveer información útil para el diagnóstico, sin embargo presenta muchos errores. Esto, se ha observado que animales con tuberculosis crónica latente da una reacción mínima a la prueba de tuberculina, mientras que animales sanos han reaccionado al PPD mamífero (Cañez, 1995).

La sensibilidad y la especificidad de la prueba de la tuberculina puede verse afectada entre otros factores por: causas fisiológicas, lesiones de la piel, reacciones contra proteínas presentes en otras especies de micobacterias del medio ambiente, etc. El inconveniente de la prueba de tuberculina se confirma por la alta proporción de los animales que presentan una prueba positiva, pero en la necropsia no presentan ninguna lesión reconocible de tuberculosis (Cañez, 1995).

En el presente trabajo, algunos de los animales que no respondieron a la prueba intradérmica, pertenecientes al grupo de bovinos PPD negativo, si llegaron a presentar

un reconocimiento serológico positivo hacia algunos de los antígenos micobacterianos utilizados mediante la técnica de IFMA. En estudios previos se ha observado que existen bovinos en los cuales no responde su inmunidad celular pero sí la inmunidad humoral; es decir que puede no ser detectada la infección por micobacterias con una prueba que evalúe la inmunidad celular como lo es la tuberculina o la prueba de IFN- $\gamma$  y si responder a una prueba serológica, en este caso la inmunidad celular puede estar deprimida, pero también se puede dar el caso de que se puedan detectar con una prueba de inmunidad celular y no con una prueba serológica (Ritacco, 1991). Resultados también observados en este estudio, bovinos PPD positivos que no presentaron un reconocimiento por anticuerpos hacia algunos de los antígenos micobacterianos analizados.

Una de las principales metas de la investigación en el campo del análisis bacteriológico de las micobacterias es el desarrollar nuevas técnicas o métodos de diagnóstico que faciliten el diagnóstico y/o tratamiento de la tuberculosis; así mismo el desarrollo de nuevas técnicas que permitan distinguir animales con tuberculosis activa de animales no infectados y/o portadores.

En el diagnóstico de la tuberculosis, se han llegado a emplear técnicas con mezclas de antígenos micobacterianos, debido a que se ha observado una cobertura más efectiva a la diversidad de la respuesta inmune del individuo hacia la micobacteria (Lyashchenko, 1998). Tomando como antecedente este hecho, en el presente trabajo se analizó una serie de antígenos micobacterianos (desde derivados proteicos purificados, filtrados de cultivo hasta proteínas puras y recombinantes) para tratar de establecer un patrón de reconocimiento antigénico que nos permitiese distinguir animales tuberculosos de los no tuberculosos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran un leve reconocimiento hacia las proteínas micobacterianas utilizadas; donde la más reactiva fue la rPT-16, principalmente con los sueros de los bovinos PPD positivo, mientras que ESAT-6 y Teorredoxina no fueron reconocidas. Sin embargo, existen reportes donde utilizando la técnica de Multi Antigen Print Immuno Assay (MAPIA) han observado que la proteína de

16 kDa presenta una baja reactividad, mientras que ESAT-6 es una de las más reactivas con una especificidad considerable (Lyashchenko, 2000).

Por otra parte, la proteína de 16 kDa se ha usado para la identificación de micobacterias que forman el complejo de *M. tuberculosis*. Y se ha demostrado por la técnica de inmunotransferencia (western blot) usando ocho anticuerpos monoclonales hacia este antígeno en donde se observó que sólo reacciona con las especies micobacterianas que pertenecen al complejo de *M. tuberculosis* (Verbon y cols, 1992a 1992b). La proteína de 16kDa contiene probablemente varias regiones específicas para el complejo *M. Tuberculosis*-célula B, que han sido identificadas usando anticuerpos monoclonales murinos (Verbon y Cols., 1992a; 1992b). Por lo anterior se puede señalar que los bovinos que reconocieron (7 sueros) este antígeno si se encontraban realmente infectados.

En el presente trabajo la proteína de 38 kDa (P-38) sólo fue reconocida por un suero de un bovino PPD negativo, que no reconoce a ningún otro antígeno. Así mismo, diferentes estudios han mostrado que los anticuerpos hacia P-38 se presentan en sujetos con enfermedad avanzada y/o crónica mientras que el PPD se mantiene negativo; esto se ha explicado por el hecho de que el individuo que padece la enfermedad desarrolla los tubérculos o granulomas y la proteína de 38 kDa queda expuesta extracelularmente en las cavidades que se forman (Samanich, 2000).

Cabe mencionar en una forma general, que existen estudios realizados con los antígenos mencionados anteriormente y se ha encontrado la posibilidad de que los anticuerpos de los individuos infectados ya hayan formado complejos inmunes, por lo que no pueden ser detectados mediante pruebas serológicas. También se ha encontrado que las proteínas micobacterianas nativas poseen epítomos para las células B, que evocan respuesta de los anticuerpos durante la infección natural y están ausentes en versiones recombinantes por lo que no se reconocen en la misma proporción los antígenos, esto se ha observado más en las proteínas de 12, 16 y 38 kDa (Samanich, 2000).

El complejo 45/47 fue reconocido únicamente por dos sueros de bovinos negativos a la prueba de tuberculina. Recientes estudios han mostrado que la desglicosilación de la proteína 45/47 durante su purificación puede reducir su capacidad para estimular una respuesta inmune celular *in vivo* e *in vitro* en cuyes (Samanich, 2000); considerando éste reporte se podría sugerir que posiblemente el reconocimiento serológico bajo, casi nulo, hacia este antígeno presentado por los animales estudiados en el presente trabajo se pueda ver afectado debido a la desglicosilación del mismo.

En un estudio realizado por Samanich y cols. (1998) en humanos con antígenos de los filtrados de cultivo (incluido el complejo 45/47) observaron que del total de proteínas (>100) presentes solamente 26, entre ellas este complejo, fueron reconocidas; sin embargo, en otro trabajo observaron que el reconocimiento de esta proteína es débil, sugiriendo lo poco serorreactiva que resulta ser (Lyashchenko et al., 1998); por lo tanto, el hecho de que esta proteína (45/47 kDa) sea poco serorreactiva puede justificar una de las causas por las cuales los animales involucrados en el presente estudio no la hayan reconocido.

Por otra parte un reporte publicado por Lyashchenko y cols (1998); menciona el uso de las proteínas recombinantes ESAT-6, 16kDa, 38kDa y 45/47kDa las cuales mostraron ser altamente antigénicas a la respuesta inmune humoral hacia la tuberculosis bovina y tener especificidad para el complejo de *M. tuberculosis* durante cierto período de la infección; esto es, ESAT-6 fue reconocida en alta proporción 27 meses después de la infección con *M. bovis*, mientras que 45/47 y rPT-16 fueron reconocidas en baja proporción. Algunos animales después de 34 semanas de la infección reconocen altamente ESAT-6, 45/47 Y 16 kDa, mientras que 38 kDa la reconocen en menor proporción. Bajos niveles de anticuerpos hacia ESAT-6, fueron detectados después de largos periodos de tiempo, y ningún animal reconoció a la proteína de 38 kDa. En el presente trabajo se desconoce el tiempo que tenían los animales con la infección, ya que la infección fue natural y no inducida experimentalmente como en el trabajo publicado por Lyashchenko y cols., lo cual no nos permite hacer una comparación mas completa entre ambos estudios.

La utilización de filtrados de cultivo como antígenos en técnicas para el diagnóstico de la tuberculosis humana ha sido de gran utilidad, por lo que consideramos interesante incluir filtrados de cultivo en este estudio. Aunque no se conoce hacia qué proteína específica es el reconocimiento, ya que existen reportes en los que mencionan que dichos filtrados, en especial el RV-11, contienen más de 100 proteínas y solamente 26 de ellas son reconocidas serológicamente (Samanich y cols., 1998). Se sugiere que los dos filtrados de cultivo (RV-11, proveniente de *M. tuberculosis* y AN-5, de *M. bovis*) empleados en el presente trabajo, contengan proteínas en común y por ende los resultados obtenidos para cada uno de ellos sean similares; sin embargo, los resultados muestran que ambos filtrados fueron reconocidos serológicamente en un porcentaje mucho más alto por el grupo de bovinos PPD positivos que por los otros dos grupos de animales, PPD negativos y PPD dudoso. Los valores de reconocimiento presentados hacia RV-11 siempre fueron ligeramente más alto que el encontrado para AN-5, en los tres grupos de bovinos analizados.

En cuanto a los resultados del reconocimiento de anticuerpos hacia los derivados proteicos purificados utilizados en el presente trabajo, mostraron que de los tres grupos de animales analizados, los sueros de bovinos PPD positivo presentaron un porcentaje de reconocimiento más alto, siendo más marcado hacia el PPD tuberculosis, seguido por PPD bovis y en un bajo porcentaje reconoció a PPD aviar. Dentro de los otros dos grupos de animales, bovinos PPD negativo y PPD dudoso, presentaron un patrón de reconocimiento muy similar pero con valores mucho más bajos y con la excepción de que ningún suero de estos grupos reaccionó con PPD aviar. A pesar de estos resultados existe en la literatura el reporte de que el PPD bovis es más específico en las vacas que el PPD tuberculosis y da menos reacciones cruzadas con PPD avium, lo que lo hace más adecuado para usarlo en bovinos (Cañez, 1995). Así mismo, el bajo reconocimiento hacia PPD avium presentado por el grupo de bovinos PPD positivo nos puede indicar que estos animales estuvieron en contacto con *M. avium* o debido a que en algunas ocasiones se pueden presentar reacciones cruzadas entre especies de micobacterias (Bloom, 1994).

En forma general el presente análisis demuestra que la respuesta inmune humoral hacia diferentes antígenos micobacterianos se caracteriza por un

reconocimiento diverso entre los animales a pesar de que todos son de la misma raza. Esta observación ha sido reportada anteriormente en diversos trabajos; por ejemplo, el estudio de Diabougna en 1997, demuestra que el reconocimiento antigénico durante la infección es altamente heterogéneo, no sólo de un antígeno en común, sino también de un individuo a otro, y sugiere que esta variación en la reactividad es influenciada por la naturaleza química de los antígenos y/o por el proceso de la enfermedad que puede diferir entre las distintas regiones geográficas y el estadio de la infección. Así mismo, otros trabajos reportan que la diversidad en el reconocimiento antigénico humoral resulta probablemente como consecuencia de varios factores, entre ellos la predisposición genética del individuo infectado; sugiriendo que las IgG responden de manera heterogénea debido a que las células T cooperadoras también reconozcan diferentes antígenos; la variación antigénica entre las diferentes cepas virulentas del género *Mycobacterium*, etc. (Boom, 1992; Schoel, 1992; Lyashchenko, 1998).

Por otra parte, considerando los métodos de diagnósticos en bovinos que han sido establecidos hasta el momento se encuentra el aislamiento y la identificación del microorganismo, sin embargo las facilidades para cultivar este microorganismo no son accesibles en cualquier laboratorio, además el aislamiento de la micobacteria generalmente es realizado post-mortem del animal (Chan et al., 2000). Otra prueba que se llega a realizar es la técnica de ELISA (ensayo inmunoenzimático ligado a una enzima) empleada para detectar anticuerpos contra *M. tuberculosis*, es relativamente simple y poco costosa, sin embargo, presenta poca sensibilidad y especificidad, (Bothamley et al., 1992; Chan et al., 1990).

Se ha observado que algunas de las limitantes que presentan los actuales métodos serológicos para el diagnóstico de la tuberculosis es que no son considerados la variación en el reconocimiento antigénico de cada organismo (factores ambientales, etc.) ni la producción de diferentes proteínas micobacterianas en las diferentes etapas de la enfermedad (Gennaro, 2000).

En el diagnóstico de la tuberculosis se ha desarrollado una técnica denominada MAPIA, la cual presenta las ventajas de poder emplear varios antígenos a la vez sin que estos disminuyan su serorreactividad, emplea volúmenes pequeños de muestras

biológicas y de reactivos, entre otras. Sin embargo, presenta la desventaja de necesitar un sistema atomizador semiautomático Linomat IV, que desafortunadamente eleva su costo y hace que la técnica sea inaccesible para algunos laboratorios; así mismo la fijación de antígenos al soporte se realiza mediante la aplicación de carga eléctrica o mediante la mezcla de antígenos entre sí antes de imprimirlos en las membranas. La desventaja de este tipo de preparaciones radica en el hecho de que algunas partículas antigénicas poseen residuos de manosa lo que facilita que haya reacciones cruzadas entre los antígenos incluidos en la mezcla (Lyashchenko, 2000).

Por ende, en el presente trabajo se estandarizó la técnica de IFMA, la cual además del presentar las mismas ventajas que la técnica de MAPIA, ésta no requiere de un sistema atomizador pues la fijación de los antígenos se hace manualmente empleando un miniblitter 45 (Immunetics) y en diferentes sitios de la membrana, lo que permite eliminar la posibilidad de que se presente una reacción cruzada entre ellos y hace posible discernir el reconocimiento antigénico de manera individual. Esto ayuda obtener información e integrar en la prueba proteínas que se reconocen en distintos estadios de la enfermedad, en caso de que se disponga de esta información. Y ya que la detección de anticuerpos se hizo utilizando un cromógeno, cualitativamente la prueba se puede evaluar visualmente y sin ayuda de ningún aparato. Haciendo de IFMA una prueba fácil y rápida de evaluar además, de que los costos en la realización de la prueba disminuyen considerablemente. Así mismo permite considerar su estandarización para el desarrollo de una prueba serológica de campo.

En el presente trabajo queda establecido que la técnica de IFMA puede ser una herramienta de gran valor para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Sin embargo, aunque los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa en el reconocimiento de algunos antígenos presentado por los animales PPD positivos y los otros dos grupos de bovinos, PPD negativo y PPD sospechoso, sería interesante realizar un análisis con un mayor número de muestras así como incluir más antígenos micobacterianos, controles, y sobre todo considerar el seguimiento del periodo de infección de los animales en estudio.

## 8.0 CONCLUSIONES

- 1) Los filtrados de cultivo, RV-11 y AN-5; los derivados proteicos purificados, PPD tuberculosis y PPD bovis; y la proteína recombinante de 16 kDa, son antígenos prometedores para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.
- 2) El reconocimiento hacia cada antígeno es muy heterogéneo en cada uno de los grupos de animales analizados
- 3) La técnica de IFMA permite la combinación de diferentes antígenos que ayuden a incrementar la sensibilidad y especificidad del serodiagnóstico.
- 4) El desarrollo de ésta técnica permite emplear concentraciones muy bajas y volúmenes muy pequeños, tanto de antígenos como de muestras séricas y reactivos.
- 5) La técnica de IFMA nos permite trabajar con una gran variedad de antígenos y/o concentraciones diferentes en una misma tira de membrana.
- 6) Las membranas de nylon presentaron mayor capacidad de adsorción para los antígenos empleados, y las bandas obtenidas después del enfrentamiento con los sueros de origen bovino presentaron mejor resolución que en las membranas de nitrocelulosa.
- 7) Las membranas con los antígenos fijados pueden conservarse en refrigeración durante períodos de tiempo prolongados, sin afectar la capacidad antigénica de los mismos.
- 8) IFMA es una técnica relativamente económica que podría ser desarrollada y utilizada como una prueba de campo para el diagnóstico de tuberculosis bovina.

## 9.0 APÉNDICE

### Solución PBS

NaCl.....	8 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.21 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.34 g
H <sub>2</sub> O dest.....	1000 mL

### Solución PBS-T al 0.05% (pH = 7.2)

PBS.....	1000 mL
Tween 20.....	0.5 mL

### Solución reveladora $\alpha$ -cloronaftol

$\alpha$ -cloronaftol.....	0.3 g
Metanol.....	10.0 mL
PBS.....	50.0 mL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%.....	50.0 $\mu$ L

### Solución bloqueadora 1 (SB<sub>1</sub>)

Albúmina sérica bovina (ASB) al 1%.....	1 g
Tween 20 .....	0.05 mL
PBS.....	100 mL

### Solución bloqueadora 2 (SB<sub>2</sub>)

Leche descremada.....	2 g
Tween 20 .....	0.05 mL
PBS.....	100 mL

### Solución bloqueadora 3 (SB<sub>3</sub>)

Leche descremada.....	5g
Tween 20.....	0.05 mL
PBS.....	100 mL

### Preparación de la Solución Teñidora de Azul de Coomassie:

Solución stock* .....	25 mL
Metanol .....	100 mL
Ácido acético .....	20 mL
Agua destilada .....	55 mL

\* Solución Stock al 1%: azul de Coomassie R-250 1% en agua destilada.

**Preparación de la Solución Desteñidora de Azul de Coomassie:**

Metanol ..... 250 mL  
Ácido acético ..... 50 mL  
Agua destilada ..... 200 mL

**Preparación de la Solución Teñidora de Negro de Amido:**

Negro de Amido ..... 0.1g  
Metanol ..... 45 mL  
Ácido acético ..... 10 mL  
Agua destilada ..... 45 mL

**Preparación de la Solución Desteñidora de Negro de Amido:**

Metanol ..... 45 mL  
Ácido acético ..... 10 mL  
Agua destilada ..... 45 mL

## 10.0 REFERENCIAS

Andersen, Å., Ljunqvist., and Olsen, M., 1990. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *J. Gen. Microbiol.* 136: 447-480.

Arend, S., Andersen, P., K.E. van Meijgaarden, Skjot, R., J.T. van Dissel, and Ottenhoff, T. 2000. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early secreted antigen target 6 kDa protein and culture filtrate protein 10. *J. Infect. Dis.* 181:1850-1854.

Banchereau, J. and Steinman, R., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392: 127-157

Barcenas-Morales, G., 1998. Recessive H2 control of antibody responsiveness to the 16 kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis Doctoral.

Barnes, D. (2000). Historical perspectives on the etiology of tuberculosis. (Review). *Microbes and Infection.* 2:431-440.

Bean, A., Roach, D., Briscoe, H., France, M., Korner, H., Sedgwick, J., Britton, W., 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J. Immunol.* 162:3504-3511.

Bloom, B., 1994. Tuberculosis : Pathogenesis, protection and control. *American Society for Microbiology, Washington D.C.* 637 pag.

Boom, W., Wallis, R., and Chevernak, K., 1991. Human *Mycobacterium tuberculosis*-reactive CD4<sup>+</sup> T-cell clones: heterogeneity in antigen recognition cytokine production, and cytotoxicity for mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* 59:2737-2743

Bothamley, G., 1995. Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur. Respir. J. Suppl.* 20: 676s-688s

Bothamley, G., Rudd, R., Festenstein, F., Ivany, J., 1992 Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Thorax*,47:270-275.

Brozna, J., Huron, M., Radenacher, J., Pabst, K., and Pabst, M. 1991. Monocyte responses to sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis* : Inhibition of priming for enhanced release of superoxide associated with increased secretion of interleukin-1 altered protein phosphorylation. *Infect. Immun.* 59:2542-2548.

Cañez, J., Cardenas, J., et al., 1995. Manual de actualización técnica para la aprobación del médico veterinario en tuberculosis bovina y brucelosis . SAGAR. 99 pág.

Carbone, F. R., and P.A. Gleeson. 1997. Carbohydrates and antigen recognition by T cells. *Glycobiology.* 7:725-730.

Caruso, A., Serbina, N., Triebold, K., Bloom, B., Flynn, J. 1999. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN- $\gamma$ , yet succumb to tuberculosis. *J. Immunol.* 162:5407-5416.

Carpenter, L.P.,(1982),Inmunología y Serología, 2ª ed, La Prensa Médica, Mexicana, México, 518 pág.

Chae, H. Z., Chung, S.J., and Rhee, S.G. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 27670-27678.

Chamberlain, N., Brandt, M., Edwin, A., Radolf, J., and Norgard, M., 1989, Major integral membrane protein immunogens of *Treponema pallidum* are proteolipids. *Infect. Immun.* 57: 2872-2877.

Chan, E., Heifets, L., Iseman, M., 2000. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tubercle & Lung Disease.* 80 (3): 131-140.

Charles O. and James H., 1995. *Mycobacterium bovis* infection in animal and humans. Preventive. *Veterinary Medicine.* 26:353-360.

Clarke, S. 2000. The critical role of CD40/CD40l in the CD4-dependent generation of CD8<sup>+</sup> T-cell immunity. *J. Leuk. Biol.* 67: 607-614

Coates, A., Hewitt, J., Allen, W., Ivanyi, J., and Mitchison, D., 1981. Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies. *Lancet*, ii: 167-169.

Collins, F., Lamb, J., Young, D., 1988. Biological activity of protein antigens isolated from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. *Infect and Immun.* 56:1260-1266.

Collins, F., 1983. Kinetics of the delayed type hypersensitivity response in tuberculosis guinea pigs and mice tested with several mycobacterial antigen preparations. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:599-604.

Crooke, H., and Cole, J., 1995. The biogenesis of c-type cytochromes in *Escherichia coli* requires a membrane-bound protein, DipZ, with a protein disulphide isomerase-like domain. *Mol. Microbiol.* 15: 1139-1150.

Daffe, M., Draper, 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microbiol. Physiol.* 39:131-203.

Davies, M., 1990. T cell receptor diversity and selection. *Ann. Rev. Biochem.* 59:475-496.

Davies, P., Clinical Tuberculosis, 1998, 2<sup>nd</sup> edition. London. Chapman & Hall Medical pp. 69-78.

Deres, K., Schild, H., et al., 1989. In vivo priming of virus specific cytotoxic T lymphocytes with sintetic lipopeptide vaccine. *Nature*, 342:561-564.

Diagbouga, S., Fumoux, F., Zoubga, A., Sanou, P., and Marchal, G. (1997). Immunoblot Analysis for serodiagnosis of tuberculosis using a 45/47 kDa Antigen Complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *American Society of Microbiology.* 4:334-338.

Diaz, F., Banda, V., Jaramillo, L., Arriaga, C., Gonzalez, D., Estrada, C. 2002. Identification of *Mycobacterium bovis* infected cattle by immunological and molecular methods. *Vet. Mex.* 34:13-26.

Dubos, R. J., C. H. Pierce, and W. D. Schaefer. 1953. Antituberculous immunity induced in mice by vaccination with living cultures of attenuated tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* 97:207-220.

Emmrich, F. Thole, J. Embden, and Kaufmann, H. 1986. A recombinant 64 Kilodalton protein of *M. bovis* BCG specifically stimulates human T4 clones reactive to mycobacterial antigens. *J. Exp. Med.*, 163:1024-1029.

Espitia C., M. Elinos, R. Hernández-Pando, R. Mancilla. 1992. Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy. *Infect Immun.* 60: 2998-3001.

Garcia, I., Miyazaki, Y., Marchal, G., Lesslauer, W., Vassalli, P. 1997. High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial infections: synergistic action of TNF and IFN-gamma in the differentiation of protective granulomas. *Eur. J. Immunol.* 27:3182-3190.

Geluk, a., K.E. van Meijgaarden, K.L.M.C. Franken, Y. W. Subronto, B. Wieles, S. M. Arend, E. P. Sampaio, T. de Boer, W.R. Faber, B. Naafs, and T. H.M. Ottenhoff. 2002. Identification and Characterization of the ESAT-6 homologue of *Mycobacterium leprae* and T-cell cross-reactivity with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 70: 2544-2548.

Gennaro, M., 2000. Immunologic diagnosis of tuberculosis. *clin Inf Dis.* 30 (suppl 3) : S243-246.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Haslov, K., .B. andersen , L. Ljungqvist, and M.w. Bentzon . 1990. Comparison of the immunological activity of five defined antigens from *Mycobacterium tuberculosis* in seven inbred guinea pig strains. The 38-kDa is immunodominant. *Scand. J. Immunol.* 31:503-514

Hewinson, R.,Michell, S., Rusell, W., et al., 1996. Molecular characterization of MPB 83 : a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPB70. *Scand. J. Immunol.* 43: 490-499.

Johnsson, K., and Schultz, P.G. 1994. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 7425-7426.

Kadival, G.v.,S.D. Chaparas, and d. Hussong. 1987. Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of 38-kDa antigen isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*139:2447-2451.

Kalams, S., and Walker , B., 1998. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 188: 2199-2204.

Kanaï, K. 1966. Experimental studies on host-parasite equilibrium in tuberculous infection, in relation to vaccination and chemotherapy. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 19:181-199.

Koch, R.1891. Weitere Mitteilung über das Tuberkulin. *Dtsch. Med. Wochenschr.*43: 1189-1192.

Koch, R.1897. Über neue Tuberkulinpräparate. *Dtsch. Med. Wochenschr.*14:209-213.

Koneman, E., Allen, S., et al, 2001. Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas a Color, 5ª ed. Panamericana, México, 1432 pág.

Laqueyrie, A., P. Militzer, F. Romain, K. Eiglemeier, S. Cole, and G. Marchal. 1995. Cloning, sequencing and expression of the *apa* gene coding for the *Mycobacterium tuberculosis* 45/47-kilodalton secreted antigen complex. *Infect. Immun.* 63:4003-4010.

Lee, B. Y., Hefta, S.A., and Brennan, P.J. 1992. Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 60: 2066.

López, V.G. y Hernández de Anda J. 1997. Diagnóstico post-mortem en decomisos sugestivos a tuberculosis en ganado bovino sacrificado en rastro de Baja California. *Vet. Mex.* 28:45-47.

Lyashchenko, K., R. Colangeli, M. H., et al., 1998. Heterogeneous Antibody Responses in Tuberculosis. *Infect. and Immun.* 66:3936-3940.

Mackness, G., Lagrange P., Miller T., and Ishabashi T. 1974. The formation of activated T-cells. *Workshop. Conf. Hoechst.* 2:193-209.

Manabe, Y., Bishai, W. 2000. Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistence, patience, and winning by waiting. *Nature Medicine.* 6: 1327-1329.

Molero, J., 1984. La tuberculosis como enfermedad social en los estudios epidemiológicos españoles anteriores a la tierra civil. *Dynamis* 9: 185-224.

Mosman, T., Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell Subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17: 139.

Mustafa, A., Oftung, F., Amoudy, H., Madi, N., Abal, A., Shaban, F., Rosenkrands, I., Andersen, P. 2000. Multiple epitopes from the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen are recognized by Antigen Specific Human T cell lines. *Clinical Infectious Diseases*;30:S201-S205

Neil, S.D., Hanna, J., Mackie, D.P., and Bryson, T.G.D. 1992. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. *The Veterinary Record.* 18:45-47.

Orme, I.M. (1988). Induction of nonspecific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance in mice inoculated with killed mycobacterial vaccines. *Infect. Immun.* 56:3310-3312.

Ottenhoff, T.H.M., Mutis, T. 1995. Role of cytotoxic cells in the protective immunity against and immunopathology of intracellular infections. *Eur. J. clin. Invest.* 25:371-377.

Papa, F., Cruaud, P., Lucquin, M., Thorel, M., Goh, K. and David, H. 1993. Isolation and characterization of serologically reactive lipooligosaccharides from *Mycobacterium tuberculosis*. *Res. Microbiol.* 144: 91-99.

Philipp, W.J., S. Poulet, K. Eiglemeier, L. Pascopella, V. Balasubramanian, B. Heym, S. Bergh, B.R. Bloom, W.R. Jacobs, and S.T. Cole. (1996). An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *M. tuberculosis* H37Rv, and comparison with *M. leprae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3132-3137.

Pollock, J., Douglas, A., Mackie, D., and Neil, S., (1995). Peptide mapping of bovine T-cell epitopes for the 38kDa tuberculosis antigen. *Scand. J. Immunol.* 41: 85-93.

Ravn, P., A. Demissie, T. Eguale, H. Wondwosson, D. Lein, H. Amoudy, A.S. Mustafa, A.K. Jensen, A. Holm, I. Rosekrands, F. Oftung, J. Olobo, C.F. von-Reyn, and P. Andersen. (1999). Human T cell responses to the T-ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 179:637-645.

Ritacco, V. Lopez, B., De Cantor I., Barrera, L., Errico, F., Nadera, A., (1991). Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 50:365-367.

Romain, F., A. Laqueyrie, P. Militzer, P. Pescher, P. Chavarot, M. Lagranderie, G. Auregan, M. Gheorghiu, G. Marchal. (1993). Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria. *Infect. Immun.* 61: 742-750.

Romain, F., C. Horn, P. Pescher, A. Namane, M. Riviere, G. Puzo, O. Barzu, and G. Marchal. (1999). Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit *in vivo* or *in vitro* cellular immune responses. *Infect. Immun.* 67: 5567-5572.

Rose, N.R. (1998). Immunodiagnosis. In: Gorbach, S.F., Bartlett, J.G., Blacklow, N.R. (Eds.), *Infectious Diseases*, second ed.. W.B. Saunders, Philadelphia, p. 145

Samanich, K., Keen, M., Vissa, V., Harder, J., Spencer, J., Belisle, J., Zolla-Pazner, S. and Laal, S.(2000). Serodiagnostic Potential of Culture Filtrate Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin and Diag. Lab Immunol.* 7: 662-668.

Seibert, F. B., and B. Munday. (1932). The chemical compositions of the active principles of tuberculin .XV. A precipitated purified tuberculin protein suitable for the preparation of a standard tuberculin. *Am. Rev. Tuberc.* 25: 724-737

Serbina, N.V., Flynn, J.L. (1999). Early emergence of CD8+ T cells primed for production of Type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*- infected mice. *Infect. Immun.* 67:3980-3988.

Stahl, P.D. and R.A.B. Ezekowitz. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10:50-55.

Sherman, D.R., Mdluli, K., Hickey, M.J., Arain, T.M., Morris, S.L., Barry, C.E., III, and Stover, C.K. (1996). *Science.* 272: 1641-1643.

Shinnick, T.M., Good, R.C.(1994). Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 13:881-901

Shoeb, H.A., Bowman, B.U., Ottolenghi, A.C., and Merola, A.J. (1985). *Antimicrob. Agents. Chemother.* 27: 889-900.

Schoel, B., Gulle, and Kaufmann, S., (1992). Heterogeneity of the repertoire of T cells of tuberculosis patients and healthy contacts to *Mycobacterium tuberculosis* antigens separated by high-resolution techniques. *Infect. Immun.* 60: 1717-1720.

Schoning, R., Verstijnen, C.P., Kuijper, S., and Kolk, A.H. (1990). Enzyme immunoassay for identification of heat-killed mycobacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complexes and derived from early cultures. *J. Clin. Microbiol.* 28:708.

Shorey, J.S., Carroll, M.C., and Brown, E.J. (1997). *Science.* 277, 1091-1093.

Sreevatsan, S., Pan, X., Zhang, Y., Deretic, V., and Museer, J.M. (1997). *Antimicrobe. Agents. Chemother.* 41: 600-606.

Talbot, E.A., Williams, D.L. and Fronthingham, R. (1997). *J. Clinical Microbiol.* 35:566-569.

Torres, J.(1995). Panorama de la tuberculosis. *Bol. Epidemiología.*11: 1-2.

Ulrichs, T., P. anding, S. Porcelli, S. H. E. Kaufmann, and M. E. Munk. (2000). Increased numbers of ESAT-6 and purified protein derivative-specific gamma interferon-producing cells in subclinical and active tuberculosis infection. *Infect. Immun.* 68:6073-6076.

Valdespino, J.L., Velasco, O., Escobar, A. (1994). Diagnóstico tratamiento y distribución geográfica. Ed. Enfermedades tropicales en México. México, D.F. Secretaria de Salud. 215-225.

Verbon, A. (1994). Development of a serological test for tuberculosis. Problems and potential. *Trop. Geogr. Med.* 46: 275-279.

Verbon, A., Hartskeerl, R., Schuitema, A., Kolk, A., Young, D., and Lathingra, R., (1992a), The 14,000-molecular weight antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the alpha -crystalline family of low-molecular-weight heat shock proteins. *Infect. Immun.* 174:1352-1359.

Verbon A., Hartskeerl, R., Moreno, C., and Kolk, A., (1992b). Characterization of B cell epitopes on the 16K antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Exp. Immunol.* 89:395.

Verstijnen, C.P., Schoningh, R., Kujiper, S., Bruins, J., von, K.R., Groothuis, D.G., and Kolk, A.H. (1989). Rapid identification of cultured *Mycobacterium tuberculosis* with a panel of monoclonal antibodies in Western blot and immunofluorescence. *Res. Microbiol.* 140:653.

Vordemeier, H.M., D.P.Harris, E. Román, R. Lathigra, C. Moreno, and J. Ivanyi. (1991). Identification of T cell stimulatory peptides from the 38 kDa protein of *M. tuberculosis*. *J. Immunol.* 147: 1023-1029.

Vordemeier, H.M., D.P.Harris, G. Friscia, E. Román, H.M. Surcel, C. Moreno, G. Pasvol, and J. Ivanyi. (1992a). T cell repertoire in tuberculosis selective energy to an immunodominant epitope of the 38kDa antigen in patients with active disease. *Eur. J. Immunol.* 22: 2631-2637.

Vordemeier, H.M., D.P.Harris, P.K. Mehrotra, E. Román, A. Elsaghier, C. Moreno, and J. Ivanyi. (1992b). *M. tuberculosis*- complex specific T-cell stimulation and DTH reactions induced with a peptide from the 38 kDa protein. *Scand J. Immunol.* 35: 711-718.

Wieles, B., Van Soolingen, D., Holmgren, A., Offringa, R., Ottenhoff, T., and Thole, J. (1995). Unique gene organization of thioredoxin and thioredoxin reductase in *Mycobacterium leprae*. *Mol. Microbiol.* 16: 921-929.

Wiker, H., S. Nagai, R., et al. Heterogeneous expression of the related MPB70 and MPB83 proteins distinguish various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Scand. J. Immunol.* 43: 374-380.

Wilkins, E.G.L. (1994). The serodiagnosis of tuberculosis, p. 367-380. In P.D.O. Davies (ed.), *Clinical tuberculosis*. Chapman and Hall Medical, London, England.

Worsaae, A., L. Ljungqvist, K. HaslØv, I. Heron, and J. Bennedsen. (1987). Allergenic and blastogenic reactivity of three antigens from *m. tuberculosis* in sensitized guinea pigs. *Infect. Immun.* 55: 2922-2927.

Young D., L. Kent, A. Rees, J. Lamb, J. Ivanyi. (1986). Immunological activity of a 38-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 54: 177-83.

Young, D., Kaufmann, S., Hermans, P., and Thole, J. (1992). Mycobacterial protein antigens : a compilation. *Mol. Microbiol.* 6: 133-145.

Young D.B. y Garbe T.R. (1991). Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tubeculosis*. *Res Microbiol.* 142: 55-65.

Young, R., Bloom B., Grosskinsky C., Ivanyi J. and Davis R., (1985). Dissection of *mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Proc. Natl acad. Sci.* 82: 2583-2587.

Yuan,Y., Crane, D.D., and Barry, C.E. (1996). Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J. Bacteriol.* 178: 4484.

Zhang, Y., Heym, D., Allen, B., Young, D., and Cole, S. (1992). *Nature.* 358: 591-593.