



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



"EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS A
ANTÍGENOS PROTÉICOS MYCOBACTERIANOS EN
HUMANOS"

Departamento de
Exámenes Profesionales

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
GUADALUPE ANAID FERNÁNDEZ RAMÍREZ

ASESORAS:
DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES
DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO.

2004



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.



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 Mijare,
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 de anticuerpos a antígenos proteicos mycobacterianos en humanos.

que presenta la pasante: Guadalupe Anaíd Fernández Ramírez
con número de cuenta: 9537255-4 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 19 de Septiembre de 2003

PRESIDENTE	<u>Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Martha Patricia Campos Peón</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Gabriela Barcenas Morales</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Amparo Londoño Orozco</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Norma L. Delgado Buenrostro</u>	

ESTE TRABAJO LO DEDICO A . . .

MIS PADRES que han sido mi ejemplo, mi guía y pilares en mi formación como persona y profesionalista. Gracias por el inmenso amor que me han dado.

A MIS ABUELITOS, por todo el apoyo y cariño que siempre me han brindado.

A ALONSO, mi querido amigo. Por tu invaluable amistad, por tu ternura y apoyo incondicionales y por los magníficos banquetes culturales que hemos compartido: ¡Vielen dank mein lieben freund!

A MARU Y GABY, por haberme dado la oportunidad de ser parte del "equipo" y aprender tanto de ellas, por los buenos consejos y, lo más importante, por su sincera amistad.

A las chicas de la Generación 25: LETY, MARLENE, TERE, MARLEN, MARGARITA y a EDGAR. Por los gratos momentos que compartimos.

Agradezco a la UNAM que ha nutrido mi espíritu de conocimiento y en donde he conocido a tanta gente que quiero y admiro.

Un agradecimiento especial a la Dra. Gaby por haberme abierto las puertas de su laboratorio y por la confianza que en mí depositó.

ÍNDICE GENERAL

Lista de abreviaturas	III
Índice de Tablas y Figuras	V
Resumen	VI
1. Introducción	1
1.1. Mycobacterium	2
1.2. Patogénesis	3
1.3. Factores de virulencia	6
1.3.1. Pared celular	6
1.4. Proteínas	7
1.4.1. Proteína de 16 kDa	8
1.4.2. Proteína de 38 kDa	9
1.4.3. Complejo 45/46 kDa	10
1.4.4. Tiorredoxina	10
1.4.5. ESAT-6	11
1.5. Filtrados de cultivo	12
1.5.1. Filtrado de cultivo AN-5	12
1.5.2. Filtrado de cultivo RV-11	12
1.5.3. Derivados Protéicos Purificados	13
1.6. Diagnóstico	14
1.7. Tratamiento	17
1.8. Prevención	20
1.9. Respuesta inmune del hospedero	21
2. Justificación	27

3. Hipótesis	29
4. Objetivos	29
4.1. Objetivo general	29
4.2. Objetivos específicos	30
5. Material y métodos	30
5.1 Materiales	30
5.2 Métodos	32
5.2.1. Activación de las membranas	32
5.2.2. Determinación de la concentración óptima de los antígenos a utilizar	32
5.2.3. Determinación del título de los conjugados	33
5.2.4. Elección del sustrato y del revelador	34
5.2.5. Fijación de los antígenos a probar	34
5.2.6. Técnica de IFMA	34
6. Resultados	35
7. Discusión	44
8. Conclusiones	48
APÉNDICE	50
REFERENCIAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Apa	complejo 45/47 kDa
ASB	albúmina sérica bovina
BCG	bacilo Clamette Guérin
cm	centímetros
CICs	complejos inmunes circulantes
ELISA	inmunoensayo ligado a una enzima
ICAMs	moléculas de adhesión intracelular
IFMA	inmunoensayo de fijación de múltiples antígenos
LAM	lipoarabinomanana
LCR	líquido cefalorraquídeo
LMP	proteínas de bajo peso molecular
MAPIA	inmunoensayo de impresión de antígenos múltiples
min	minutos
mm	milímetros
NC	nitrocelulosa
NO	óxido nítrico
NOS2	óxido nítrico sintetasa
NY	nylon
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PG	peptidoglucano
RNI	intermediarios reactivos de nitrógeno
ROI	intermediarios reactivos de oxígeno
rP-16	proteína recombinante de 16 kDa
SE	solución bloqueadora
seg	segundos
TACO	tryptophan aspartate containing coat
TE	tuberculosis

TCH	hidrazida del ácido tiofén - 2 - carboxílico
TDM	dimicolato de trealosa
TR	tiorredoxin reductasa
Trx	tiorredoxina

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Relación de Sueros Humanos	36
Figura 1. Reconocimiento antigénico de sueros de individuos tuberculosos, sospechosos y no tuberculosos mediante la técnica de IFMA	39
Tabla 2. Reconocimiento antigénico hacia diferentes proteínas, filtrados y extractos micobacterianos presentado por sueros de individuos tuberculosos	40
Tabla 3. Reconocimiento antigénico hacia diferentes proteínas, filtrados y extractos micobacterianos presentado por sueros de individuos sospechosos	41
Tabla 4. Reconocimiento antigénico hacia diferentes proteínas, filtrados y extractos micobacterianos presentado por sueros de individuos sanos	41
Gráfica 1. Porcentaje de sueros que presentaron un reconocimiento positivo a uno o más antígenos micobacterianos en grupos de individuos tuberculosos, sospechosos, sanos y con afecciones diferentes a TE	42
Gráfica 2. Porcentajes de reconocimiento a cada uno de los diferentes antígenos micobacterianos que presentaron los sueros de individuos tuberculosos, sospechosos, sanos y con afecciones diferentes a TE	43

RESUMEN

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas son de gran utilidad ya que son sencillas y no requieren del aislamiento del agente patógeno, especialmente de aquellos de difícil crecimiento como los del género *Mycobacterium*. *Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal de 2 a 3 millones de muertes al año alrededor del mundo, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico que nos permitan distinguir entre individuos con tuberculosis activa, infectados, asintomáticos y sanos. Por ende, el principal objetivo de este trabajo fue analizar y comparar la respuesta humoral contra una serie de antígenos micobacterianos en individuos con las características mencionadas anteriormente, empleando la técnica de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos (IFMA).

Se emplearon los antígenos proteicos rP-16, 38 kDa, 45/47 kDa, tiorredoxina y ESAT-6; los filtrados de cultivo RV-11 y AN-5, y los derivados protéicos purificados de cepas de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium*. Se colectaron 99 muestras séricas de las cuales 22 correspondieron a individuos sanos, 42 a individuos con diferentes tipos de tuberculosis, 30 a individuos sospechosos de padecer la enfermedad y 5 a individuos con otras afecciones. Los antígenos fijados en membranas de nitrocelulosa se enfrentaron con los sueros problema y, posteriormente, con un conjugado anti-IgG humano peroxidado. Finalmente, las membranas fueron reveladas con α -cloronaftol como sustrato y H_2O_2 .

El 54.8 % de los pacientes con tuberculosis reconocieron por lo menos un antígeno: de los cuales, el 100% reconoció RV-11, 91.3 % PPD tuberculosis, 86.9 % AN-5 y PPD bovis, y 56.5 % rP-16. De los individuos sospechosos, el 23.3 % reconoció por lo menos uno de ellos: 100 % reconoció RV-11, 85.7 % AN-5 y PPD tuberculosis, 71.42 % PPD bovis y 57.14 % rP-16. Solamente el suero de un paciente sano reconoció el filtrado de cultivo RV-11 y el PPD tuberculosis. Del grupo de individuos con afecciones diferentes a tuberculosis ninguno reconoció antígeno alguno.

Los PPD's tuberculosis y bovis, RV-11, AN-5 y el antígeno proteico rP-16 se pueden considerar antígenos prometedores para el diagnóstico de la tuberculosis mediante la técnica de IFMA. Por otra parte, esta técnica nos permite trabajar con mayor cantidad de antígenos y distintas concentraciones a la vez.

"EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS A ANTÍGENOS PROTÉICOS MICOBACTERIANOS EN HUMANOS"

1. INTRODUCCIÓN

Mycobacterium tuberculosis es el agente causal de la tuberculosis y se considera como el patógeno humano más exitoso ya que históricamente, la tuberculosis ha sido una de las principales causas de muerte de la especie humana. Actualmente, existen 8 millones de nuevos casos y de 2 a 3 millones de muertes anualmente por tuberculosis, siendo ésta la segunda causa de muerte relacionada con enfermedades infectocontagiosas a nivel mundial; por otra parte, se estima que un total de 225 millones de nuevos casos y 79 millones de muertes ocurrirán entre 1998 y 2030 (Murray y Salamon, 1998).

La tuberculosis (TB) es una infección crónica producida fundamentalmente por *M. tuberculosis* y, en muy raras ocasiones en la actualidad, por *M. bovis*. Se contagia casi siempre por inhalación, en pocas ocasiones por ingestión y de forma excepcional por inoculación cutánea. La infección primaria (primo-infección) suele ser asintomática, aunque en un porcentaje reducido de casos cursa con síntomas clínicos (tuberculosis primaria).

En México la TB continúa siendo endémica (Tapia et al., 1995); de acuerdo con los informes de la Dirección General de Epidemiología, la tasa de incidencia aumentó entre los años de 1986 a 1996, de 9.0 casos por 100,000 habitantes a 11.75 casos por 100,000 habitantes. Se ha estimado que la tasa de morbilidad promedio anual es de 50 casos por 100,000 y que en la última década se han presentado por lo menos 27,000 casos adicionales (Valdespino et al., 1994; Baez-Saldaña et al., 2003).

La TB es una de las enfermedades asociadas al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) más importantes, las alteraciones inmunológicas que acompañan a este síndrome facilitan las formas de tuberculosis de reactivación y la progresión rápida de infección a enfermedad.

1.1. *Mycobacterium*

En 1882, Roberto Koch logró identificar y cultivar al agente causal de la TB: una bacteria en forma de bastón, a la cual llamó bacilo tuberculoso, *Mycobacterium tuberculosis* (Barnes, 2000). El género *Mycobacterium* comprende un grupo único de bacterias caracterizadas por una pared rica en lípidos que contiene ácido N-glucolilneuramínico. Las micobacterias son microorganismos no móviles, no esporulados, débilmente Gram-positivos, aerobios o microaerofílicos, en forma de bastón o ligeramente curvo; algunas micobacterias presentan forma de cocobacilos, filamentosas o ramificadas. Actualmente existen alrededor de 100 especies propuestas dentro de éste género, las cuales usualmente se agrupan en dos divisiones principales: de crecimiento rápido y de crecimiento lento. El género *Mycobacterium* incluye varias especies importantes tanto para los humanos como para los animales (Shinnick y Good, 1994).

Se sabe que la mayoría de las especies de este género se encuentran en el ambiente viviendo como saprófitos ya sea en la tierra o en el agua en varias regiones del mundo. Sin embargo, poco se conoce acerca de los requerimientos metabólicos de estas bacterias en su nicho ecológico. Otras especies son patógenos obligados, es decir, son incapaces de multiplicarse fuera del hospedero; dentro de estas especies se incluyen *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. africanum*, *M. asiaticum*, *M. farcinogenes*, *M. leprae*, *M. microti*, *M. paratuberculosis* y *M. simiae*; algunas de ellas son capaces de infectar varias especies animales (Good y Shinnick, 1998).

M. tuberculosis es un bacilo de 1 - 4 μm por 0.3 - 0.6 μm , inmóvil y no esporulado. Como las restantes especies del género *Mycobacterium* posee una pared celular muy rica en lípidos (40% de su peso en seco total), lo cual reduce notablemente su permeabilidad y dificulta su tinción. Ésta puede requerir el calentamiento de la célula hasta casi los 100°C para permitir que el colorante penetre en ella. Una vez conseguida la tinción, la decoloración puede resultar igualmente difícil,

incluso utilizando una solución ácido-alcohólica. Este es el fundamento de la tinción de Ziehl-Neelsen y de otras variantes de tinción con fluorocromos (auramina) (Good y Shinnick, 1998).

Es un microorganismo aerobio estricto, cuyo desarrollo es óptimo a 35 – 37°C. con fines de aislamiento se emplean sobre todo medios sólidos a base de huevo coagulado, como el de Lowenstein-Jensen y los semisintéticos con agar de Middlebrook y Cohn. Una atmósfera enriquecida con CO₂ estimula su desarrollo. Su velocidad de crecimiento es mucho más lenta que la de otras bacterias (su tiempo de división es de unas 18 horas) tardando varias semanas en dar colonias visibles en medios convencionales. Éstas son bastante características, de color crema, rugosas y de superficie seca. Las colonias aisladas se identifican por la producción de niacina, por la reducción de nitratos, por poseer una catalasa termolábil y ser resistentes a bajas concentraciones de hidrazida del ácido tiónín-2-carboxílico (TCH). Su lentitud de desarrollo en medios convencionales ha favorecido la introducción en los laboratorios clínicos de sistemas de detección rápida del crecimiento (sistema BACTEC). En éstos se utiliza un medio líquido semisintético (7H12 de Middlebrook) que contiene ácido palmítico marcado con ¹⁴C. El crecimiento de *M. tuberculosis* se comprueba al detectar, mediante un aparato adecuado, la aparición de CO₂ radiactivo en el frasco de cultivo (Ausina Ruiz, 1992).

1.2. Patogénesis

La TB es una enfermedad transmitida por vía aerosol, generado por la tos de una persona infectada con *M. tuberculosis*, el bacilo inhalado es conducido por la corriente aérea hasta los lóbulos inferiores, que son los que proporcionalmente tienen más ventilación, y se replica dentro de macrófagos alveolares. La infección primaria es asintomática e involucra las siguientes etapas:

- Replicación del microorganismo en el sitio pulmonar inicial de la infección.
- Propagación hacia los nódulos linfáticos locales.
- Diseminación eventual de la infección a sitios más distantes en el organismo.

Esta primo-infección (lesiones pulmonares y diseminación) suele ser asintomática y se desarrolla en 3-10 semanas. Durante este período el organismo desarrolla las dos características de la infección tuberculosa: una hipersensibilización a las proteínas del bacilo (viraje de la prueba de la tuberculina, que se hace positiva) y una respuesta inmunitaria mediada por células, la cual detiene la diseminación de la infección y los bacilos implantados en un órgano mueren o permanecen en estado de latencia en el interior de los macrófagos (Smith y Moss, 1994).

Aunque la respuesta inmune en el humano contra *M. tuberculosis* es altamente efectiva en el control de la infección primaria, el microorganismo casi nunca es erradicado por su habilidad para mantenerse en latencia, entendiéndose por latencia el período durante el cual la persona infectada no presenta tuberculosis clínicamente, pero los bacilos son capaces de una reactivación en etapas más tardías. En sentido estricto, todas las formas clínicas de la tuberculosis son posteriores a la primo-infección (Manabe y Bishai, 2000).

La reactivación de la TB comúnmente ocurre en pulmón; sin embargo, puede estar involucrado cualquier otro órgano. La enfermedad es un padecimiento crónico debilitante caracterizado por fiebre, pérdida de peso y en el caso de reactivación pulmonar se manifiesta tos, la cual es un síntoma de la inflamación pulmonar crónica y el mecanismo por el cual el microorganismo se logra diseminar a nuevos hospederos (Glickman y Jacobs, 2001).

La inmunidad protectora contra bacterias intracelulares tales como las micobacterias depende de una respuesta inmune mediada por células. Por lo tanto, *M. tuberculosis* debe desarrollar varias estrategias patogénicas para primero poder replicarse dentro de los macrófagos del hospedero y después poder resistir la respuesta inmune o modificarla para permitir el control de la replicación bacteriana sin su eliminación completa. Además, *M. tuberculosis* debe de persistir dentro de su hospedero en un estado relativamente inactivo, conservando el potencial para una reactivación.

Algunos de los mecanismos propuestos para la explicación de cómo el bacilo tuberculoso evita su destrucción por los macrófagos son:

- Prevención del estallido oxidativo en las células fagocíticas.

- Inhibición de la fusión del fagosoma-lisosoma.
- Resistencia a enzimas lisosomales, tales como la lisozima.
- Secreción de inhibidores de agentes bactericidas tales como el peróxido o radicales de oxígeno.
- Exudación de lípidos para bloquear el acceso de agentes bactericidas a sus blancos.
- Escape del fagosoma al citoplasma.

Un mecanismo de *M. tuberculosis* para evitar ser destruida es evadir la formación del fagolisosoma, esto lo logra al liberar los productos sulfatados derivados de la trealosa-2-sulfato. Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que *M. tuberculosis* genera abundantes cantidades de amoniaco en cultivos debido a la acción de las enzimas ureasa y glutamina sintetasa; se cree que el cloruro de amonio puede ser capaz de afectar la migración de los lisosomas. Se ha observado que en presencia de cloruro de amonio las proteínas TACO (tryptophan aspartate-containing coat) se ven afectadas y, por lo tanto, también se altera la estructura del citoesqueleto. Estas proteínas TACO, se encuentran asociadas al citoesqueleto de actina de las células linfoides, mieloides y en los microtúbulos de los macrófagos no infectados (Flynn y Chan, 2001).

Solamente un bajo porcentaje de individuos infectados llegan a desarrollar la enfermedad, y esto puede ser debido al reflejo de las diferencias en la virulencia del bacilo que produce la infección o las diferencias en el grado de susceptibilidad del hospedador, o a ambos factores. El riesgo de desarrollar una enfermedad tuberculosa clínica depende también de algunos factores genéticos y de la historia previa de exposición al bacilo que haya tenido la población o grupo étnico al que pertenece el individuo infectado (resistencia natural a la enfermedad). Hay otros factores de riesgo mejor definidos, entre los que cabe destacar: desnutrición, enfermedades debilitantes, insuficiencia renal crónica, neoplasias, gastrectomía, diabetes, tratamientos prolongados con glucocorticoides u otros fármacos inmunodepresores, es decir, todas las situaciones que determinan una depresión transitoria o permanente de la inmunidad mediada por células. La inmunodepresión causada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) facilita el desarrollo de la tuberculosis por diferentes mecanismos: reactivaciones endógenas a partir de bacilos persistentes, progresión de infecciones recientes con desarrollo de formas clínicas de tuberculosis más agudas y atípicas, con frecuentes diseminaciones hematógenas (Flynn y Chan, 2001).

1.3. Factores de virulencia

1.3.1. Pared celular

La pared celular de la micobacteria es una estructura muy compleja, consta de una membrana celular y una capa de péptidoglucono (PG) la cual determina la forma de la célula y es similar a los PGs presentes en las bacterias gram positivas.

Una característica que define al género *Mycobacterium* es la presencia de una gruesa capa asimétrica de ácidos micólicos de carácter hidrofóbico. Cada una de las especies de este género parece sintetizar un patrón de ácidos micólicos particular, lo cual ha sido explotado para la clasificación de las especies de este género. Asociados covalentemente a esta envoltura celular externa se encuentra un amplio orden de distintos peptidoglicolípidos, glicolípidos y lípidos de cadena mediana y corta (por ejemplo, mycocerosatos y acilglicerolos) que también son responsables de que la superficie externa del microorganismo sea hidrofóbica. Estos lípidos de cadena mediana y corta reciben el nombre de mycosidos; poseen una estructura y función similares a las de los antígenos O presentes en las bacterias gram negativas, lo que les confiere su actividad biológica (Daffe y Draper, 1998; Good y Shinnick, 1998).

Una variedad de lípidos y glicolípidos están asociados de manera no covalente con la envoltura celular, en forma de dimicolato de trealosa (TDM). TDM se asocia con toxicidad sistémica, formación del granuloma e inducción de la producción de citocinas. Algunos lípidos de *M. tuberculosis* tienen residuos de trealosa; estos sulfolípidos tienen un papel muy importante en la sobrevivencia del bacilo en el medio intracelular ya que inhiben la formación del fagosoma. Se han descrito algunas trealosas aciladas exclusivamente en cepas virulentas de *M. tuberculosis*, lo que sugiere que estos compuestos actúan como factores de virulencia (Good y Shinnick, 1998).

La capa más interna (membrana plasmática) lleva insertas proteínas, manosidos de fosfatidil inositol y lipoarabinomananas (LAM). Las LAMs se encuentran ancladas a la membrana plasmática a partir de la cual se extienden a través de toda la pared celular. Una molécula de LAM contiene diacilglicerol, ácidos palmítico y tuberculosteárico, fosfatidil inositol y residuos de manosa y

arabinosa. Dentro de las actividades biológicas de LAM se incluyen: fuerte serorreactividad debida a los residuos terminales de arabinosa, inhibición de la activación de los macrófagos vía interferón gamma, inducción de la producción de citocinas por los macrófagos, inactivación de los intermediarios reactivos de oxígeno y supresión de la proliferación de las células T (Good y Shinnick, 1998).

Las glicoproteínas se localizan generalmente sobre la superficie celular o están expuestas al medio extracelular, en ambos casos, tienen un papel muy importante en la interacción de la célula con el medio y con otras células. Se ha demostrado que las glicoproteínas de algunos patógenos participan en el desarrollo de la infección y funcionan ya sea como factores de virulencia o como antígenos inmunodominantes, lo que las hace potencialmente útiles tanto para el diagnóstico de la tuberculosis así como para la vacunación (Good y Shinnick, 1998).

Algunos investigadores han propuesto la existencia de receptores en los macrófagos y células dendríticas capaces de reconocer estructuras moleculares compartidas por grandes grupos de patógenos, entre ellos las micobacterias. Dentro de estas estructuras se incluyen los residuos de manosa, la cual se encuentra presente en una amplia variedad de proteínas en varios patógenos; esto se relaciona con la disminución en la inmunogenicidad de las moléculas de Apa no glicosiladas (Romain et al., 1999).

Muchos de los componentes arriba mencionados presentan una actividad biológica potente en células eucarióticas en sistemas *in vitro* indicando la posibilidad de que ellos pueden ser importantes en la patogénesis (Good y Shinnick, 1998).

1.4. Proteínas

En la búsqueda de los antígenos del género *Mycobacterium*, recientemente han sido dilucidadas cerca de 50 proteínas antigénicas las cuales se han empleado en algunas técnicas de diagnóstico de la enfermedad (Andersen y Brennan, 1994).

Debido a las dificultades que representa la purificación de algunas proteínas a partir de las micobacterias para algunos investigadores han optado por la obtención de estas utilizando técnicas de DNA recombinante (Good y Shinnick, 1998).

1.4.1. Proteína de 16 kDa (P-16)

Anteriormente se le conocía como proteína de 14 kDa o proteína principal de membrana, actualmente se le conoce también como Hsp 16.3. Esta proteína pertenece a la familia de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (LMPs) (Bárceñas-Morales, 1998).

La proteína de 16 kDa se localiza en la envoltura celular, en estructuras fibrosas tipo péptidoglicano y en racimos intracelulares y periféricos; esta proteína se ha utilizado para identificar micobacterias pertenecientes al complejo de *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. bovis*) (Bárceñas-Morales, 1998). La proteína de 16 kDa es sintetizada en la fase exponencial tardía y en la fase estacionaria; su sobreexpresión le confiere al bacilo resistencia a la autólisis y favorece la estabilidad de las proteínas requeridas para su viabilidad (Yuan et al., 1996). Por lo tanto, la capa externa de la pared celular se engrosa notablemente cuando los cultivos se mantienen en condiciones de anaerobiosis o microaerobiosis; lo que permite establecer el estado de latencia *in vitro*.

Se han detectado anticuerpos contra el antígeno de 16 kDa en sueros de personas sanas tras la exposición ocupacional a TB, en familiares de pacientes con TB, en niños con linfadenitis mediastinal y en fluido cerebrospinal de pacientes con meningitis tuberculosa (Graham et al., 1992).

La disminución en el título de anticuerpos contra 16 kDa se emplea como un indicador de enfermedad crónica, mientras que un aumento de éste significa reincidencia bacteriológica (Bothamley, 1992). Por lo tanto, P-16 podría ser considerado como un inmunógeno asociado a la fase temprana de la infección por *M. tuberculosis* (Bárceñas-Morales, 1998).

1.4.2. Proteína de 38 kDa (P-38, PstS)

En un trabajo realizado por Young y col. en 1992, la proteína de 38 kDa fue reconocida como una proteína secretada por *M. tuberculosis* a la que se le designó con el nombre de PhoS y de forma alternativa CIE Ag78, Pab, US Japan Ag 5 y PstS-1 (Espitia et al., 1989a; Harboe y Wiker, 1992). Los anticuerpos monoclonales que se han producido contra esta proteína han sido diversos; entre ellos se encuentran: TB71, TB72, HYT28, HBT12, CD38.D1, F67.19 y HAT2.

El peso molecular de este antígeno es de 38 kDa; su secuencia de aminoácidos es muy similar (30% de homología) a PstS o PhoS, razón por la cual en un inicio recibió el nombre de PhoS, y al igual que en *E. coli* se une al fosfato y se ve aumentada durante la deficiencia del ion (Andersen y Brennan, 1994).

Young y Garbe (1991) demostraron que la P-38 es modificada postranscripcionalmente por acilación lo que indica que se trata de una lipoproteína que se encuentra en la capa lipídica media de la pared celular; su localización ha sido confirmada por microscopía electrónica (Espitia et al., 1992).

PstS interviene en la regulación de fosfatos y actúa como una proteína de señalización; se ha observado que los niveles de P-38 se elevan cuando la micobacteria requiere de fosfato, lo que ha evidenciado que dicha proteína está involucrada en el metabolismo del fosfato (Espitia et al., 1992).

La P-38 es uno de los antígenos inmunodominantes más importantes de *M. tuberculosis* y fue una de las primeras proteínas que se demostró que estaba involucrada en el metabolismo del fosfato. En su forma nativa o de manera recombinante, es reconocida por suero de pacientes infectados con *M. tuberculosis* (Andersen y Brennan, 1994).

La información inmunoquímica e inmunológica de la proteína de 38 kDa es bastante extensa y la historia íntegra de la proteína ha sido revisada ampliamente por Harboe y Wiker (1992). En 1981 apareció la primer publicación que describe los resultados de la producción de anticuerpos monoclonales reactivos contra esta proteína de la micobacteria. Dos de estos anticuerpos

monoclonales, TB71 y TB72, se caracterizan por ser capaces de discernir entre una infección por *M. tuberculosis*, BCG y otras especies de micobacterias en radioinmunoensayos. Inicialmente se asumió que esta proteína no estaba presente en BCG, sin embargo, Andersen, et al. (1986) y Wiker, et al. (1990), demostraron que esta proteína está presente en BCG aunque en pequeñas cantidades.

1.4.3. Complejo 45/47 kDa (Apa, MPT32)

El complejo antigénico de 45/47 kDa (Apa) se encuentra codificado en el gen *apa* o *mod D* (Carbone y Gleeson, 1997) y constituyen del 5 al 10% de las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* en filtrados de cultivo de BCG. Se ha reportado que *M. tuberculosis* glicosila y acila algunas proteínas, así que la porción proteica de 47 kDa tiene un peso molecular de 28,780 Da. La banda observada de 45 kDa en geles SDS-PAGE fue relacionada con moléculas copurificadas de 47 kDa; por lo que es ambiguo el nombre de complejo 45/47 kDa (Romain et al., 1999).

1.4.4. Tiorredoxina (Trx o MTP46)

Gran parte del ciclo de vida de *M. tuberculosis* se lleva a cabo en un ambiente fuertemente oxidativo, como lo es dentro del macrófago, por esta razón la bacteria requiere de un efectivo sistema antioxidante. Uno de los componentes del sistema antioxidante es la catalasa-peroxidasa *katG* que se encuentra en niveles elevados en pacientes con tuberculosis; sin embargo, en aislamientos de muestras clínicas la disminución de esta enzima se ve compensada con el aumento en la expresión de la alquil hidroperoxidasa (*ahpC*) (Zhang et al., 1999).

Las enzimas tiorredoxina (Trx) y tiorredoxin reductasa (TR) fueron estudiadas en un inicio ya que se pensaba que tenían actividad reductora equivalente a la de la enzima *ahpC* de *Saccharomyces cerevisiae* por lo que se sugirió que estas mismas enzimas podrían jugar un papel similar en *M. tuberculosis*. Posteriormente, en un trabajo realizado por Zhang y cols., encontraron que Trx y TR no poseen actividad reductora equivalente a la de *ahpC*; sin embargo, demostraron que poseen habilidad intrínseca para reducir peróxidos y otros aceptores de electrones, lo que

puede ser una actividad relevante para que la bacteria sobreviva dentro del macrófago. Para la reducción del H_2O_2 se requiere tanto de Trx como de TR y son mucho más eficientes bajo condiciones anaeróbicas que aeróbicas (Zhang, 1999).

1.4.5. ESAT-6

Es posible diferenciar las cepas virulentas del complejo de *M. tuberculosis* de aquellas que no lo son por la expresión de un limitado número de antígenos. Una de estas proteínas secretadas es ESAT-6; se trata de una proteína de 10 kDa que se encuentra presente en *M. tuberculosis* y en cepas virulentas de *M. bovis* mas no es así en BCG de *M. bovis*. Esta proteína no se ha podido detectar en *M. leprae*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum* y *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 et al., 2000; Ravn et al., 1999; Ulrichs et al., 2000).

El gen para ESAT-6 (Rv3875) se encuentra en una región del genoma de *M. tuberculosis* designada como RD1 (Geluk et al., 2002).

El reconocimiento de diversos antígenos en diferentes estadios de la enfermedad ha sido sujeto de muchos estudios empleando modelos murinos infectados con tuberculosis. En estos estudios se ha observado que los antígenos contenidos en los filtrados de cultivos son excelentes blancos para las células T a lo largo de la infección. Al fraccionar estos filtrados de cultivo se pudieron identificar antígenos como ESAT-6 y Ag85 antígenos inmunodominantes reconocidos por los linfocitos T involucrados en la respuesta inmune contra tuberculosis (Pollock y Andersen, 1997).

Una investigación acerca de la respuesta de las células T y los antígenos micobacterianos reconocidos a lo largo de la enfermedad reveló que el patrón de reconocimiento antigénico cambiaba conforme al progreso de la infección. ESAT-6, una molécula de bajo peso molecular secretada por la bacteria resultó ser un fuerte estimulador de la producción de $IFN-\gamma$ durante la fase temprana de la

infección. Otros estudios mostraron que la fracción de antígenos de bajo peso molecular enriquecida con ESAT-6 funcionaba como un fuerte inductor de la proliferación de linfocitos T productores de IFN- γ tanto en cobayos en la primera fase de la infección como en humanos con tuberculosis activa. El fuerte reconocimiento de ESAT-6 en ambos casos marcó la pauta para que esta proteína se considerara como un antígeno adecuado para el diseño de vacunas y de reactivos para diagnóstico (Pollock y Andersen, 1997).

1.5. Filtrados de cultivo

1.5.1. Filtrados de cultivo AN-5

Se ha observado que muchos antígenos protéicos presentes en los extractos de *M. bovis* o *M. tuberculosis* son reconocidos por anticuerpos monoclonales desarrollados contra *M. tuberculosis* y *M. leprae* muertas. Sin embargo, no es muy clara la forma en la que estos antígenos se encuentran involucrados en el desarrollo de la inmunidad celular; estos antígenos también llamados sensitinas se liberan durante la fase de crecimiento activo de la micobacteria tanto *in vivo* como *in vitro* (Collins et al., 1998).

El filtrado de cultivo de la cepa de *Mycobacterium bovis* AN-5 (la cual es virulenta) se obtiene a partir de un cultivo en PBY de 4 a 6 semanas. La cosecha se hace con SSF y el producto se hace pasar por filtros cuyos poros son de 0.8 μm de diámetro y posteriormente por filtros con poros de 0.4 μm . Después, las proteínas se precipitan utilizando sulfato de amonio.

1.5.2. Filtrado de cultivo RV-11

Las proteínas en los filtrados de cultivo de *M. tuberculosis* son fuertes inductores de la respuesta inmune tanto humoral como celular. Se sabe que muchos de estos antígenos o sensitinas son producidas en cultivos viejos de *M. tuberculosis* pero que se encuentran muy contaminadas con polisacáridos y varios productos de la autólisis pero cuando las cepas virulentas de *M. tuberculosis*

se cosechan durante la fase logarítmica (media) de su crecimiento, la cantidad de contaminantes es mínima o casi nula aunque la cantidad de proteínas también es menor. La actividad inmunológica de estas proteínas de filtrado de cultivo, *in vivo* e *in vitro*, indica que pueden ser reconocidas por las mismas células T responsables de la reacción de Mantoux mas no por anticuerpos monoclonales dirigidos contra micobacterias muertas (Collins et al., 1998).

El filtrado de cultivo de la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H₃₇Rv se obtiene a partir de un cultivo en PBY de 4 a 6 semanas. La cosecha se hace con SSF y el producto se hace pasar por filtros cuyos poros son de 0.8 µm de diámetro y posteriormente por filtros con poros de 0.4 µm. Después, las proteínas se precipitan utilizando sulfato de amonio.

De las más de 100 proteínas en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* obtenidas *in vitro* (Sonnenberg, 1997) solamente 26 proteínas son reconocidas por anticuerpos de pacientes tuberculosos, lo que sugiere que no todas las proteínas secretadas *in vitro* de los filtrados de cultivo se expresen en cantidades significativas *in vivo* durante la enfermedad (Samanich et al., 1998).

1.5.3. Derivados Protéicos Purificados

En menos de 10 años tras el descubrimiento de *M. tuberculosis*, Koch reportó sus intentos de purificar los componentes que la micobacteria liberaba al medio de cultivo. Koch inactivó con calor el concentrado de productos liberados en un medio con glicerol de un cultivo de *M. tuberculosis* de ocho semanas. A este producto se le conoce como Tuberculina y en un principio se creyó que era útil en el tratamiento de la tuberculosis. Esta teoría sería abandonada más tarde, pero Koch hizo también una importante observación: la tuberculina era capaz de producir una reacción característica entre las 24 a 48 horas posteriores a su aplicación en animales y personas tuberculosas, y sugirió el uso de la tuberculina como un método de diagnóstico de la tuberculosis (Andersen y Brennan, 1994).

Posteriormente, un producto más puro fue obtenido por F. Seibert y B. Munday, quienes demostraron que el principio activo de la tuberculina se encuentra en la fracción protéica precipitable

con sulfato de amonio. Este material fue nombrado "derivado protéico purificado de tuberculina (PPD)". (Andersen y Brennan, 1994)

El PPD es una importante herramienta para el estudio epidemiológico así como para el diagnóstico de la tuberculosis. Los métodos de producción del PPD varían, pero esencialmente el producto consiste en proteínas liberadas en el medio de cultivo por cultivos estacionarios de *M. tuberculosis* y que son recuperadas por precipitación con sulfato de amonio o ácido tricloroacético tras su inactivación con calor, filtración y concentración del producto. La compleja constitución del producto y la falta de conocimientos a nivel molecular, así como sobre la forma en la que actúan los componentes con mayor actividad biológica, han hecho difícil la estandarización del producto (Andersen y Brennan, 1994).

Se han obtenido PPDs de otras especies de *Mycobacterium* y han observado reacción cruzada ya que las proteínas pueden exhibir más de un 50 % de homología en su secuencia de aminoácidos (Andersen y Brennan, 1994).

1.6. Diagnóstico

La infección con *M. tuberculosis* se localiza generalmente en los pulmones y se produce muchas veces sin dar signos o síntomas de enfermedad o en forma tan ligera que pasa inadvertida. Se manifiesta como un síndrome infeccioso inespecífico, en general acompañado de fiebre, anorexia, adelgazamiento y sudación. En ocasiones, la existencia de tos, disnea ligera o signos físicos de afectación pulmonar hacen sospechar el diagnóstico de neumonitis inespecífica (Ausina Ruiz, 1992).

Una de las primeras pruebas a las que se recurre para el diagnóstico de la tuberculosis es la reacción de Mantoux o prueba de la tuberculina, la cual consiste en inocular por vía intradérmica el extracto PPD para provocar una reacción de hipersensibilidad retardada; cuando esta prueba resulta positiva se manifiesta por una reacción de inmunidad celular, que produce una zona de induración en el sitio de la inyección que ha de comprobarse a las 48 horas; efecto que no se observa cuando

el resultado es negativo. En los individuos vacunados con BCG, el límite de positividad se ha establecido en 15 mm pero se consideran también signos de infección por el bacilo de Koch la presencia de vesiculación o necrosis en la zona inflamada o bien que su tamaño supere los 15 mm. En los individuos infectados por el VIH, cualquier grado de induración tiene valor diagnóstico. Sin embargo, se ha observado que esta prueba da tanto falsos positivos como falsos negativos. Por otra parte, se ha observado que en individuos vacunados previamente con BCG la interpretación de la prueba se complica pues dan falsos positivos debido a que los pacientes ya han sido sensibilizados con varias proteínas que se encuentran tanto en BCG como en el PPD. Un caso contrario al anterior se reporta en individuos que presentan anergia, en ellos la prueba de PPD resulta como un falso negativo aún cuando están infectados con la micobacteria (Toossi y Ellner, 1996; Landowski et al., 2001).

Otra prueba que se realiza a la par es la baciloscopia, en la cual se emplean los primeros esputos de la mañana pues éstos contienen la mayor carga bacilar. En los pacientes que presentan tos no productiva se emplean nebulizadores con solución salina hipertónica para inducir el esputo, si esto no funciona existen otras alternativas como el aspirado del contenido gástrico a través de una sonda nasogástrica o la broncoscopia para obtener muestras de tejido bronquial. Posteriormente se hace la digestión del esputo para poder hacer en la muestra una tinción de Ziehl-Nielsen, tinción con calor para bacterias ácido resistentes; sin embargo, el problema con ésta técnica radica en el hecho de que la carga bacilar por mililitro debe ser de por lo menos 5000 bacilos para que el resultado sea positivo, y aún así el cultivo a partir de la muestra podría ser negativo. También pueden utilizarse colorantes fluorescentes como la auramina o hacer una tinción en frío, tinción de Kinyoun. Por otra parte, también se ha observado que en individuos con primo-infección esta prueba resulta negativa; sin embargo, si a estos mismos pacientes en un lapso de aproximadamente 6 meses se les realiza nuevamente este estudio, la prueba da un resultado positivo. Además, la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en un examen microscópico sólo proporciona un dato diagnóstico de presunción, ya que la ácido-alcohol resistencia no es específica de *M. tuberculosis*. Como la eliminación del bacilo, incluso en lesiones exudativas, es discontinua, se recomienda estudiar un mínimo de 3 muestras seriadas de esputo u orina. (Ausina Ruiz, 1992; Good, 1998).

Como prueba confirmatoria para la baciloscopia, y de todas las demás pruebas que se emplean, se lleva a cabo el cultivo de la bacteria. Los productos para cultivo pueden dividirse en dos grupos:

- a) Los que provienen de zonas estériles, como el líquido cefalorraquídeo (LCR) o una biopsia (ganglionar, hepática, etc.), que pueden sembrarse directamente en los medios de cultivo.
- b) Los que proceden o atraviesan zonas con flora comensal, como el esputo o la orina, en los que previamente hay que descontaminar la muestra de esta flora acompañante. La descontaminación puede llevarse a cabo sometiendo las muestras clínicas a tratamientos con diferentes sustancias como el hidróxido de sodio al 2% o el fosfato trisódico, asociados a fluidificantes (agentes mucolíticos) que cuando se mezclan durante periodos concretos de tiempo con el material clínico, destruyen la flora contaminante sin afectar en exceso la viabilidad de las micobacterias (Ausina Ruiz, 1992; Good y Shinnick, 1998).

Existen fundamentalmente dos técnicas de cultivo: una que utiliza medios de cultivo sólidos adecuados para el desarrollo de las micobacterias, como el clásico Löwenstein Jensen enriquecido con glicerol para favorecer el crecimiento de *M. tuberculosis* o con piruvato si se sospecha de la presencia de *M. bovis*, o los semisintéticos con agar tipo 7H10 de Middlebrook, y otra que emplea medios líquidos como el 7H12 de Middlebrook, en frascos cerrados que incorporan una sustancia, generalmente un ácido graso como el ácido palmítico, marcada con carbono radiactivo (^{14}C). El crecimiento de las micobacterias se comprueba en este último caso al detectar, mediante un aparato adecuado, la aparición de CO_2 radiactivo (sistema BATEC) (Good y Shinnick, 1998).

A los pacientes cuya baciloscopia resulta positiva se les hace una entrevista y la revisión de su historia clínica completa en la búsqueda de datos útiles como son la vacunación previa con BCG, contacto previo con individuos enfermos o si se trata de pacientes con tuberculosis reactivada; además, es necesario hacer la detección de anticuerpos contra VIH. Seguidamente se les practica una radiografía de tórax en busca de granulomas característicos de la enfermedad a nivel pulmonar. Sin embargo, este procedimiento suele ser complicado cuando se trata de mujeres embarazadas pues la radiación afecta el desarrollo del feto (Ausina Ruiz, 1992).

La tuberculosis congénita en neonatos raramente se presenta, sin embargo, cuando se padece esta enfermedad llega a ser de graves consecuencias presentando morbilidad y mortalidad de hasta el 50%. Estos datos reflejan la dificultad para diagnosticar los casos de la enfermedad congénita ya que comúnmente es necesario practicar una biopsia y porque la mayoría de los signos y síntomas no son específicos. Entre los signos y síntomas ocasionados por este padecimiento se pueden mencionar dificultad para respirar, fiebre, hepatosplenomegalia, letargia, linfadenopatía e irritabilidad, distensión abdominal, pérdida auditiva y lesiones en la piel. Este cuadro clínico también puede ser manifestación de otro tipo de enfermedades, reflejando con esto que el diagnóstico de la tuberculosis congénita es aún más difícil. Una radiografía de tórax anormal no es un hallazgo significativo y un resultado positivo en la reacción de Mantoux es muy poco común (Chaulk et al., 1995).

En la búsqueda de antígenos útiles para el diagnóstico de la tuberculosis, en 1993 G. Marchal y cols. fraccionaron las proteínas de un filtrado de cultivo joven de BCG mediante tres principios cromatográficos (tamaño, carga e hidrofobicidad); cada una de esas fracciones las sometieron a un análisis comparativo de la respuesta serológica, a la respuesta de hipersensibilidad retardada en cuyes inmunizados con cepas de BCG atenuadas y muertas. Los resultados que se obtuvieron permitieron la identificación de un complejo de proteínas de 45/47 kDa que se ha empleado como un marcador serológico de micobacterias replicantes (Romain et al., 1993).

1.7. Tratamiento

El riesgo mayor del tratamiento es provocar una resistencia adquirida a los fármacos que se administren por eso es necesario cumplir estrictamente los principios rectores de la quimioterapia antituberculosa, que son los siguientes:

1. Uso simultáneo de diversos fármacos en la fase inicial del tratamiento para impedir la selección de mutantes resistentes.
2. Duración suficiente del tratamiento.

Existen tres tipos de resistencias del bacilo de la tuberculosis. La *resistencia natural* es la que se presenta sin que la cepa bacteriana haya estado expuesta a la acción de un fármaco. Se debe a una mutación cromosómica, cuya aparición se produce al azar y está relacionada con la densidad de la población bacilar inicial; si ésta es muy elevada, pueden existir microorganismos resistentes a dos fármacos de forma simultánea, pero matemáticamente es imposible que existan bacilos resistentes a tres fármacos simultáneamente considerando el número de bacilos que puede albergar el organismo humano.

La *resistencia adquirida o secundaria* se debe a la incorrecta administración de la quimioterapia. Cuando se indica un tratamiento con un solo fármaco o asociaciones de dos fármacos a un paciente que tiene resistencia a uno de ellos, se seleccionan los bacilos resistentes por mutación espontánea y pasan a constituir una nueva población bacilar, ahora resistente a los dos fármacos administrados. Este tipo de resistencia es cromosómico, definitivo e irreversible y, por lo tanto, cualquier fármaco que se haya administrado incorrectamente queda invalidado para siempre. Para evitar la resistencia secundaria, es necesario asegurar siempre el uso de una correcta asociación de fármacos que no se hayan empleado anteriormente o que si se utilizaron, haya sido en asociaciones correctas.

La *resistencia primaria o inicial* se presenta en los pacientes que se han contagiado a partir de enfermos que tenían bacilos con resistencias adquiridas. Recientemente se han descrito epidemias de tuberculosis multirresistentes en pacientes con SIDA.

El enfermo con TB tiene diversas poblaciones de bacilos, intracelulares y extracelulares, con una gran variedad de actividad metabólica y velocidad de multiplicación, que pueden ser eliminadas de forma más o menos selectiva por los fármacos antituberculosos. Existe una primera subpoblación bacilar, muy numerosa, de localización extracelular y en fase de multiplicación activa. Esta población, por su cantidad, determina la gravedad de la enfermedad y el contagio y es la que tiene mayor cantidad de mutantes naturales inicialmente resistentes. Sobre esta población actúan los fármacos bactericidas entre los que se incluyen la isoniazida (INH), la rifampicina (RIF) y la estreptomycin (SM), cuya acción es máxima durante los primeros días del tratamiento.

Una segunda población bacilar se halla, la mayor parte del tiempo, en bacteriostasis en el interior de lesiones caseosas con una tensión de oxígeno muy baja; sólo tiene fases muy cortas de actividad metabólica; sobre esta población actúa con rapidez la RIF y, más lentamente la INH. Una tercera población, sobre todo intracelular y de zonas con inflamación activa, se encuentra sometida a un pH ácido, y sobre ella ejerce su mayor acción la pirazinamida (PZA). Estas dos últimas poblaciones son las que causan fundamentalmente las recidivas cuya eliminación es necesario programar. El etambutol (EMB) es un fármaco bacteriostático para bacilos extracelulares en fase de multiplicación activa y menos para bacterias intracelulares.

Los fármacos de primera elección para el tratamiento de la TB incluyen INH, EMB, PZA, fluoroquinolonas (ciprofloxacino y ofloxacino) y RMP, administrados de 6 a 12 meses. Si la cepa causante de la enfermedad no resulta resistente a los antibióticos entonces se inicia el tratamiento con INH y RMP como primera elección, sin embargo si se trata de una micobacteria multidrogo-resistente se recomienda combinar el uso de EMB con PZA o con fluoroquinolonas.

INH es un agente bacteriostático y bactericida. Uno de los componentes del sistema antioxidante producidos por la bacteria es la catalasa-peroxidasa katG que es directamente responsable de la oxidación de la INH a la que transforma en su intermediario correspondiente que es el que posee la actividad antituberculosa al inhibir a la enzima mycolato sintetasa (Zhang, 1999). La INH es absorbida fácilmente en los tejidos; sin embargo, su uso en el tratamiento de la tuberculosis conlleva un alto riesgo de producir hepatitis, principalmente en pacientes alcohólicos o con padecimientos hepáticos, y el riesgo de producir neuropatía periférica. Estos efectos son el resultado de la interferencia de la INH sobre el metabolismo de la piridoxina (Miller y Miller, 1996).

RMP es un agente bactericida que se absorbe fácilmente en los tejidos. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la RNA polimerasa dependiente de DNA de la micobacteria. Ya que RMP es potenciador de la actividad del sistema oxidante P-450 es de esperarse que uno de sus efectos colaterales sea la reducción de la vida media de otros fármacos administrados de forma paralela.

EMB es poco tóxica, pudiendo provocar alteraciones de la vista (visión borrosa, cambios en la percepción de los colores y en la agudeza visual). Este fármaco es el más indicado para el

tratamiento de la tuberculosis en mujeres embarazadas ya que hasta el momento no se han reportado anomalías en los fetos debido a su utilización.

PZA se recomienda a individuos en quienes los aislamientos de *M. tuberculosis* han resultado resistentes a los antibióticos de primera elección. La principal vía de eliminación es a través de la orina por lo que se recomienda ajustar la dosis en aquellos pacientes que sufren de insuficiencia renal.

Una droga antituberculosa que se llega a ocupar ocasionalmente es la estreptomina (SM) pero su uso es muy limitado debido a su efecto ototóxico. Al igual que la kanamicina y la capreomicina, su uso está contraindicado durante el embarazo.

El ciprofloxacino y otras quinolonas son agentes bactericidas que inhiben por completo la actividad de las DNAsasas de *Mycobacterium spp.* (Wilson y Grüneberg, 1997).

Los esquemas terapéuticos de primera elección basan su éxito en el hecho de que puedan administrarse simultáneamente los fármacos adecuados.

1.8. Prevención

Hay una serie de medidas preventivas que actúan sobre las fuentes de infección (búsqueda y tratamiento de casos), sobre el reservorio del bacilo (búsqueda y tratamiento de los individuos infectados, búsqueda y tratamiento de los bovinos enfermos), sobre los mecanismos de transmisión (control de las personas que han tenido contactos con enfermos, aislamiento respiratorio de las fuentes de contagio, pasteurización de la leche de vaca destinada al consumo) y sobre la población susceptible (mejora del estado económico-social, educación sanitaria de la población y vacunación con BCG).

La quimioprofilaxis antituberculosa consiste en la administración de medicación específica en individuos sin síntomas ni signos de enfermedad tuberculosa. Pretende prevenir la infección de los

individuos expuestos al contagio (quimioprofilaxis primaria) o evitar la enfermedad de los infectados (quimioprofilaxis secundaria o quimioterapia de la infección).

Seguramente no hay en medicina preventiva ninguna otra medida que sea tan eficaz como la vacunación. Sin embargo, éste no es el caso de la tuberculosis, cuya única vacuna aceptada, que es la BCG continúa siendo discutida pues sus resultados son inconstantes e imprevisibles. Esta vacuna debe su nombre a los científicos franceses Clamette y Guerin que en 1908 aislaron una cepa de *M. bovis* a partir de una vaca con mastitis tuberculosa. Cultivaron esta cepa en un medio de carne-bilis-papa con glicerina y la sembraron cada 3 semanas; finalmente, después de 230 resiembras el bacilo había perdido cualquier evidencia de su virulencia. Como resultado de estas resiembras esta cepa se ha vuelto casi completamente avirulenta pues ha habido múltiples deleciones en su genoma (Orme, 2001).

La vacunación con BCG por vía intradérmica produce una sensibilidad cutánea a la tuberculina y deja una cicatriz característica. Protege frente a la tuberculosis primaria de tipo evolutivo y disminuye la frecuencia de las complicaciones precoces (diseminaciones meníngeas, miliarias, pleuropulmonares y óseas). No afecta a la tuberculosis posprimaria, ni impide que un individuo vacunado se infecte. Además, por el hecho de ser una vacuna con microorganismos vivos atenuados puede producir un mayor número de complicaciones graves cuando se utiliza en individuos con SIDA o inmunodeprimidos en general (Orme, 2001).

1.9. Respuesta inmune del hospedero

La infección por *M. tuberculosis* presenta tres etapas:

- 1) Establecimiento del agente patógeno y adquisición de la inmunidad mediada por células.
- 2) Una fase latente crónica.
- 3) En algunos individuos se observa una fase de reactivación caracterizada por un crecimiento bacteriano excesivo y la expresión de signos y síntomas de la tuberculosis.

Considerando que *M. tuberculosis* vive dentro de las células, principalmente en macrófagos, los mecanismos efectores de células T, más que anticuerpos, son requeridos para el control y eliminación de la bacteria (Ottenhoff, 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; sin embargo, esta respuesta también puede contribuir al daño tisular. Los mecanismos inmunes mediados por células proporcionan protección y originan hipersensibilidad de tipo retardada en la que las células T son los mediadores de esta respuesta y los macrófagos son las células efectoras.

Una vez que los bacilos llegan a los compartimentos alveolares son reconocidos por receptores del complemento y de manosa los cuales se expresan en la superficie de los macrófagos alveolares, originando que los bacilos sean fagocitados. Si la fagocitosis se realiza exitosamente, la infección no se llega a presentar, por el contrario, si la fagocitosis no es efectiva entonces se presenta la infección, la cual puede ser persistente o presentar estado de latencia (Russel, 1995).

La producción de citocinas proinflamatorias, interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) y quimiocinas secretadas por los macrófagos tras haber engullido al bacilo estimulan la diferenciación de los linfocitos T y participan en el proceso inflamatorio. La respuesta inflamatoria hacia este patógeno es necesaria para el control de la infección, sin embargo, puede también contribuir a que la infección se vuelva crónica, así como a la aparición de las lesiones características de la enfermedad (Janeway y Travers, 1997).

El macrófago posterior a endocitar la micobacteria la mantiene dentro de su fagosoma el cual se fusiona con el lisosoma y, de esta manera, el microorganismo se ve sujeto a la degradación por las hidrolasas ácidas intralisosomales las cuales también acidifican el medio, lo que le confiere al fagolisosoma su acción antimicrobiana (Flynn y Chan, 2001).

Los macrófagos al ser activados producen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un intermediario reactivo del oxígeno (ROI) que se genera durante el estallido respiratorio, óxido nítrico (NO) vía óxido nítrico sintetasa (NOS₂) y otros intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI) utilizando L-

arginina como sustrato. Todos estos productos en conjunto crean un ambiente reductor dentro del macrófago ocasionando la no viabilidad del bacilo (Flynn y Chan, 2001).

Se ha demostrado que el H_2O_2 es un potente micobactericida, sin embargo, no se ha demostrado que los ROI también lo sean, ya que se ha observado que su actividad puede ser anulada por varios componentes micobacterianos como las lipoarabinomananas (LAM) y el fenilglicolípido-1 (PGL-1) quienes actúan como trampas de radicales libres de oxígeno, esto se ha observado en las personas que padecen granulomatosis crónica pues son más susceptibles a desarrollar alguna forma clínica de la tuberculosis (Flynn y Chan, 2001).

Una de las funciones más importantes que tienen los macrófagos es el procesamiento y presentación de los antígenos micobacterianos. Al ser fagocitadas, algunas proteínas secretadas y otras estructurales de las micobacterias son degradadas y unidas a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) para ser expresadas en la superficie celular y presentar los antígenos a las células T $CD4^+$ (Caruso et al., 1999; Flynn y Chan, 2001).

De forma paralela a las actividades del macrófago descritas anteriormente, los mismos macrófagos y otras células presentadoras de antígeno (CPAs) involucradas en el control de la infección comienzan a liberar una serie de citocinas que conducen hacia la diferenciación y maduración de células Th1 ($CD4^+$), principales células efectoras en la inmunidad contra *M. tuberculosis*. El contacto entre las células T $CD4^+$ y las CPAs se da mediante la interacción del ligando CD40 (CD40L), presente en las primeras y su receptor (CD40), presente en las segundas; dando como resultado el incremento de la actividad co-estimuladora y presentación del antígeno (Clarke, 2000; Kalams y Walker, 1998; Flynn y Chan, 2001). Por otra parte, se ha observado que la activación de los macrófagos también se da mediante la interacción del factor de necrosis tumoral alpha o beta ($TNF-\alpha$, $TNF-\beta$) con el receptor CD40 (Janeway y Travers, 1997). Entre las citocinas de mayor relevancia y estudiadas que se ven involucradas en la respuesta inmune a tuberculosis se encuentran IL-6, IL-12, interferón gamma ($IFN-\gamma$) y $TNF-\alpha$.

La IL-12 e IL-18 (factor inductor de $IFN-\gamma$) son citocinas secretadas por macrófagos y células dendríticas, las cuales se consideran citocinas inductoras primarias de la producción de $IFN-\gamma$. IL-12

incrementa la secreción de IFN- γ y dirige la diferenciación de la célula T hacia Th1. El receptor funcional de IL-12 se expresa principalmente en células T activadas y en células NK (Trinchieri, 1998).

El IFN- γ es producido tanto por células T (CD4⁺ y CD8⁺) como por células NK en respuesta a una serie de estímulos inflamatorios y/o autorregulación inmune. Esta citocina es considerada clave en el control de la infección contra *M. tuberculosis* ya que estimula el desarrollo y función de células efectoras y es requerida para la producción de NO por el macrófago. Sin embargo, la producción únicamente de IFN- γ es insuficiente para el control total de la infección por *M. tuberculosis* ya que se ha observado que la respuesta inmune también es determinada y potenciada por otras citocinas (IL-12, TNF- α) y por la expresión correcta de los receptores correspondientes (Orme et al., 1993; Barnes et al., 1993; Lalvani et al., 1998; Micallef et al., 1996; Flynn y Chan, 2001).

La función principal del TNF- α en la respuesta inmune antimicobacteriana es coordinar la formación del granuloma y mantener aislados a los macrófagos infectados ya que regula la producción de quimiocinas y de sus receptores correspondientes (García et al., 1997; Bean et al., 1999; Flynn y Chan, 2001). TNF- α es secretado por macrófagos, células dendríticas y células T, para el control de la infección aguda por *M. tuberculosis* (Barnes et al., 1993; Henderson et al., 1997; Serbina y Flynn, 1999).

Las células T activadas secretan una serie de citocinas como las mencionadas anteriormente, lo que resulta en la activación de macrófagos y en el reclutamiento de monocitos circulantes para iniciar la formación del granuloma crónico (Okamura et al., 1998; Vankayalapati et al., 2000).

Cuando las células Th1 reconocen a las CPAs, secretan una serie de citocinas y quimiocinas que favorecen la migración de monocitos hacia el lugar de la infección y da origen a la transformación de macrófagos activados; el acúmulo de estos macrófagos activados forman estructuras compactas semejantes a un epitelio con cierto grado de necrosis caseosa (células epiteloides) denominadas tubérculos de Köster. La formación de esta estructura es también favorecida por el reconocimiento de moléculas de adhesión intracelular (ICAMs). En pacientes con

respuesta inmune deficiente se ha observado un incremento en la producción de exudado caseoso debido a que el bacilo se multiplica rápidamente, favoreciendo la necrosis caseosa; el exudado caseoso es degradado en el organismo para poder ser eliminado a través de los conductos bronquiales en forma de esputo; sin embargo, este proceso conlleva el riesgo de la diseminación del bacilo. Este hecho marca el paso de la infección a la enfermedad (Ausina Ruiz, 1992).

En el caseum se encuentran tanto restos de la micobacteria como restos de macrófagos que han entrado en apoptosis. La apoptosis de estos macrófagos se ve facilitada por las células T CD4⁺ y CD8⁺ ya que ambos subtipos son capaces de producir perforinas y granulinas (Keane et al., 1997; Balcewicz et al., 1998; Serbina y Flynn, 1999; Flynn y Chan, 2001).

La producción de IFN- γ para la activación de macrófagos es una de las principales funciones de las células CD4⁺, sin embargo, en estudios realizados en ratones, los cuales fueron tratados con anti-CD4⁺ y desafiados con *M. tuberculosis* no se observaron cambios en la producción de IFN- γ ni en la producción de NOS₂; estos resultados sugieren que las células CD8⁺ también producen el IFN- γ , siendo éste CD4⁺ independiente (Serbina y Flynn, 1999; Caruso et al., 1999; Flynn y Chan, 2001).

La identificación de la respuesta específica a antígenos de gran importancia en la infección y/o enfermedad por *M. tuberculosis* ha sido posible mediante la utilización de modelos animales. Los resultados obtenidos han sido extrapolados y han contribuido en gran medida para el diagnóstico de individuos enfermos o infectados. Se ha observado que la respuesta de linfocitos T hacia antígenos puros es más específica y eficiente cuando el reconocimiento de los mismos se da tanto por la porción glicosilada como por la porción proteica (Espitia y Mancilla, 1989b).

Dentro de la gama de proteínas antigénicas que se han estudiado en la TB se encuentra el complejo Apa el cual interactúa principalmente con los linfocitos T y/o los anticuerpos inducidos mediante la previa inmunización con la bacteria atenuada. Se ha observado que la presencia de manosa en esta proteína es esencial para su antigenicidad; debido a esta característica y a que Banchereau observó que son el blanco de células dendríticas ha sido considerado como un importante inmunógeno (Banchereau y Steinman, 1998).

Según el concepto de la existencia de receptores no específicos para patógenos, Stahl y Ezekowitz sugieren la presencia de receptores de manosa en macrófagos y células dendríticas, los cuales son capaces de reconocer estructuras moleculares similares entre grandes grupos de patógenos, incluidas las micobacterias. Esta teoría explicaría el hecho de la disminución de la inmunogenicidad de las moléculas de Apa que han perdido su residuo de manosa (Romain et al., 1999).

Por otra parte, se ha reportado reacción cruzada entre los complejos Apa de *M. bovis* y el complejo 50/55 kDa de *M. tuberculosis*. En un trabajo realizado por Espitia y cols. (1989b), emplearon las proteínas P-38, 50 y 55 kDa sometidas a un proceso de oxidación con peryodato para afectar los residuos de manosa; ellos observaron una disminución en el reconocimiento de P-38 por el anticuerpo, sin embargo, con el antígeno 50/55 kDa el reconocimiento por el anticuerpo no se vio afectado. Estos resultados reforzaron la idea de que la respuesta inmune hacia las glicoproteínas debe ser por el reconocimiento de ambas porciones, protéica y glucosídica, del antígeno para que la respuesta sea más eficiente.

En otro estudio reportan que los complejos Apa y 50/55 kDa poseen características bioquímicas muy similares y ambos son reconocidos por el mismo sitio de reconocimiento del anticuerpo; en base a los resultados obtenidos, los autores sugieren que la secuencia de aminoácidos en la porción protéica de estos antígenos pueden originar una reacción cruzada. En suma, las observaciones hechas con respecto al complejo Apa lo perfilan como un compuesto potencialmente eficaz para el diagnóstico de la tuberculosis en humanos y bovinos (Espitia et al., 1995).

Otra de las proteínas antigénicas que se han estudiado en la respuesta inmune a *M. tuberculosis* es la ESAT-6, la cual es secretada por el bacilo y es un eficaz antígeno para estimular las células CD4+. Al igual que ESAT-6, otros antígenos micobacterianos, P-16, P-38 y Trx, corresponden al grupo de proteínas secretadas en respuesta al ambiente hostil dentro de los macrófagos (Pollock y Andersen, 1997).

Se sabe que el subtipo CD4⁺ estimula mediante la interacción CD40-CD40L a los linfocitos B para la expresión de B7.1 y B7.2, permitiendo el desarrollo de la respuesta inmune humoral. Una característica importante de la respuesta humoral a la tuberculosis es el reconocimiento a diversos antígenos, el cual se ha observado varía de persona a persona y se denomina reconocimiento heterogéneo; sin embargo, esta variabilidad no se presenta en el reconocimiento a antígenos particulares (Lyashchenko et al., 1998b).

A pesar de que se ha relegado el papel de los linfocitos B en la respuesta inmune contra tuberculosis, en los últimos años se han hecho varios estudios que permiten dilucidar otras funciones de estas células además de la producción de anticuerpos. Se ha observado que en ratones con linfocitos B deficientes no existen cambios en la carga bacilar después de la infección pero los granulomas en sus pulmones fueron notablemente más pequeños. Una posible explicación a este suceso es que un número significativo de células que comúnmente se encuentran dentro de los granulomas son linfocitos B. Otros autores proponen que las células B contribuyen a la estimulación continua de la memoria inmune pues se ha visto que en ratones knock-out para linfocitos B las células T de memoria se encuentran disminuidas (Orme, 2001).

El reconocimiento heterogéneo de antígenos por anticuerpos en la tuberculosis involucra múltiples factores, entre ellos: antecedentes inmunogenéticos del hospedero, producción de diferentes antígenos por la micobacteria dependiendo también del estadio de la enfermedad o infección, diversidad genética de las distintas cepas de *M. tuberculosis*, carga bacilar, terapia antituberculosa, entre otros (Lyashchenko et al., 1998b).

2. JUSTIFICACIÓN

En México la TB continúa siendo endémica (Tapia et al., 1995); de acuerdo con los informes de la Dirección General de Epidemiología, la tasa de incidencia aumentó entre los años de 1986 a 1996, de 9.0 casos por 100,000 habitantes a 11.75 casos por 100,000 habitantes. Se ha estimado que la tasa de morbilidad promedio anual es de 50 casos por 100,000 y que en la última década se

han presentado por lo menos 27,000 casos adicionales (Valdespino et al., 1994; Baez-Saldaña et al., 2003).

El diagnóstico de pacientes con una mínima actividad de *M. tuberculosis* será difícil mientras no exista una prueba con elevada sensibilidad y especificidad. Actualmente la prueba más ampliamente utilizada para el diagnóstico de la tuberculosis es el examen microscópico de un frotis de esputo para la detección de bacilos ácido resistentes. Sin embargo, la lectura del frotis detecta solo del 40% al 80% de los casos de tuberculosis pulmonar y solo casos avanzados (Gordin y Slutkin, 1990). Considerar el diagnóstico de pacientes en una etapa temprana de la infección, cuando el frotis aún se observa negativo, puede ser ventajoso porque ellos son menos contagiosos y presentan una morbilidad y una mortalidad menor (Menzies, 1997; Behr et al., 1999).

Realizar cultivos micobacterianos resulta ser fastidioso y tardan por lo menos dos semanas en crecer empleando medios sólidos; además, las facilidades para cultivar no están disponibles en cualquier laboratorio. Las radiografías de tórax se utilizan comúnmente para el diagnóstico de tuberculosis activa, pero su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad son pobres. La prueba de la tuberculina es poco específica (Menzies, 1999) y se ha observado que da falsos negativos en el 20-30 % de los pacientes recientemente diagnosticados con tuberculosis activa (Pesanti, 1994). Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos desarrolladas recientemente tienen especificidad de más del 95% y sensibilidad de más del 95% en pacientes cuyo frotis resultó positivo. Como sea, estas pruebas son costosas, requieren de equipo sofisticado y tienen sensibilidad de solo 50-71% en pacientes cuyo frotis resultó TB negativo (Clarridge et al., 1993; Forbes y Hicks, 1993).

Las pruebas serológicas utilizando el ensayo inmunoenzimático ligado a una enzima (ELISA) para detectar anticuerpos contra *M. tuberculosis* son relativamente simples y menos costosas pero hasta la fecha tienen poca sensibilidad y especificidad, particularmente en los casos de frotis negativos (Bothamley et al., 1992; Chan et al., 1990). La combinación de varios antígenos empleada en las técnicas serológicas parece ser prometedora (Lyashchenko et al., 1998a).

La detección de anticuerpos es una de las herramientas más comúnmente utilizadas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Las técnicas serológicas son simples, rápidas y no

requieren del aislamiento o del cultivo del agente patógeno. En las infecciones causadas por ciertos patógenos, como *M. tuberculosis*, se genera un repertorio heterogéneo de anticuerpos por lo que en el diagnóstico de estas enfermedades se emplean mezclas de múltiples antígenos para cubrir, en lo máximo posible, la respuesta mediada por anticuerpos (Lyashchenko et al., 2000).

En la búsqueda de antígenos apropiados, se ha observado repetidamente que los ensayos basados en un único antígeno nunca alcanzan un desarrollo satisfactorio (Wilkins, 1994). Se sabe que las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* inducen una fuerte respuesta inmune. Una característica muy importante de la inmunidad humoral en la tuberculosis es que el reconocimiento de antígenos es de carácter heterogéneo y variable de persona a persona, más que el reconocimiento de antígenos particulares (Lyashchenko et al., 2000).

En el presente trabajo se pretende estandarizar una técnica de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos (IFMA) empleando diversos soportes para fijar proteínas, así como la utilización de una gama diversa de antígenos micobacterianos.

3. HIPÓTESIS

El patrón antigénico micobacteriano reconocido por sueros de pacientes con tuberculosis será diferente al patrón de reconocimiento presentado por individuos sanos, y posiblemente las diversas variaciones del reconocimiento de los mismos se deberán al tipo de tuberculosis que presente cada uno de los individuos infectados.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Analizar la respuesta humoral contra una serie de antígenos micobacterianos en diferentes concentraciones utilizando muestras séricas de pacientes infectados con *M. tuberculosis* y muestras

de individuos sanos, mediante la técnica de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos (IFMA) en membranas de nitrocelulosa (NC) y de nylon (NY).

4.2. Objetivos específicos:

- 4.2.1. Seleccionar las concentraciones óptimas de los antígenos a utilizar mediante el empleo de diversas diluciones para estandarizar la técnica de IFMA.
- 4.2.2. Elegir el tipo de soporte más adecuado, comparando membranas de NC y membranas de NY, para fijar los diversos antígenos.
- 4.2.3. Analizar el patrón de reconocimiento de antígenos proteicos micobacterianos presentado por pacientes con la enfermedad y compararlo con el patrón de reconocimiento de individuos sanos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Material biológico

5.1.1.1. Antígenos:

- Proteínas:
 - ESAT-6 fue proporcionada por el Dr. Eduardo Sada, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
 - 38 kDa, 45/47 kDa y tiorredoxina fueron proporcionadas por la Dra. Clara Espitia Pinzón, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

- rPT-16 fue proporcionada por la Dra. Gabriela Barcenas Morales, FES-Cuautitlán, UNAM.

- Filtrados de cultivo:

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

- Derivados proteicos purificados:

PPD tuberculosis fue proporcionado por la Dra. Iris Estrada, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

PPD bovino y PPD aviar fueron proporcionados por la M.V.Z. Aurora Romero, FES-Cuautitlán, UNAM.

5.1.1.2. Sueros:

Los sueros trabajados en el presente estudio fueron donados por la Dra. Clara Espitia Pinzón (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). Se emplearon 99 sueros de los cuales 36 correspondían a individuos con diferentes tipos de tuberculosis, 6 a individuos negativos a tuberculosis pulmonar, 5 a individuos con afecciones distintas a la tuberculosis, 30 a individuos sospechosos a tuberculosis y 22 a individuos sanos.

5.1.1.3. Conjugados:

- Conjugado peroxidado anti-IgG humana (SIGMA: A-6029).
- Conjugado peroxidado anti-IgG humana (BIORAD: 172-1001).

5.1.1.4. Sustratos:

- Sustrato para fosfatasa alcalina (ZYMED; BCIP/NBT, 508108)

- α -cloronaftol (SIGMA: C8890).

5.2. Métodos

5.2.1. Activación de las membranas.

Se emplearon membranas de NY (Millipore Immobilon-P: IPVH 00010) de 45 μ m de tamaño de poro y con dimensiones de 15 cm x 15 cm, estas membranas se sumergieron en metanol durante 30 min a temperatura ambiente para activarlas. Las membranas de NC (Millipore Immobilon-P: HAHY 00010) del mismo tamaño de poro y dimensiones se sumergieron en buffer de fosfatos (PBS) (ver apéndice) por el mismo tiempo, posteriormente ambas fueron enjuagadas en PBS.

5.2.2. Determinación de la concentración óptima de los antígenos a utilizar.

Las concentraciones que fueron utilizadas de los extractos protéicos en el presente estudio se definieron con base a un ensayo piloto, donde se emplearon concentraciones de 1, 10 y 100 μ g/ml del extracto micobacteriano correspondiente a la cepa RV-12. Los antígenos fueron fijados a las membranas de NC y de NY utilizando una cámara Miniblotter 45 (Immunetics). Se depositaron 133 μ l de cada dilución del antígeno por carril y se dejó en incubación con agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se retiraron las diluciones de cada carril empleando una bomba de vacío y seguidamente se lavaron las membranas con PBS. Finalmente cada membrana fue cortada en 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 posteriormente conservarlos a 4°C hasta el momento de su uso.

Para verificar la fijación de los antígenos utilizados a las membranas de NC, se utilizó una tira de cada uno de los extremos de dichas membranas y se sumergieron en solución teñidora de

Negro de Amido al 0.1% durante 30 seg. Concluido este tiempo, las tiras se lavaron con agua destilada y posteriormente se sumergieron en solución desteñidora de Negro de Amido (ver apéndice) hasta la apreciación de bandas correspondientes. Finalmente, se enjuagaron las tiras con agua destilada.

Las tiras de NY se tiñeron con solución teñidora de Azul de Coomasie R-250 (ver apéndice), incubándose de 5 a 10 min; posteriormente se lavaron con agua destilada y seguidamente se sumergieron en solución desteñidora de Azul de Coomasie hasta la apreciación de bandas correspondientes. Por último las tiras se lavaron con agua destilada para remover los residuos de la solución desteñidora.

El resto de las tiras se enfrentaron a un suero positivo (U127) y a uno negativo (N3). El grado de reconocimiento de la banda donde se utilizó la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ fue más intenso que las otras dos concentraciones más bajas, sin embargo, la intensidad de la banda utilizando 10 $\mu\text{g/ml}$ fue ligeramente menos intensa que la concentración anterior, pero más visible que cuando se utilizó 1 $\mu\text{g/ml}$, donde la banda fue demasiado tenue (datos no mostrados). Considerando estas observaciones y la cantidad donada de cada uno de los extractos proteicos se decidió trabajar con las concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$.

Con respecto a las proteínas recombinantes, estudios previos con la proteína de 16 kDa mostraron que concentraciones en un rango de 2 a 10 $\mu\text{g/ml}$ fueron adecuadas. Con base en estos resultados se emplearon concentraciones de 2.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ para los antígenos recombinantes.

5.2.3. Determinación del título de los conjugados.

La titulación de los conjugados se realizó mediante la técnica de Dot ELISA; brevemente: en discos de membrana de NC se fijaron 7 μl de suero humano diluido 1:2 en PBS, los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente colocar cada disco en una placa de ELISA. Los discos se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS-T (ver apéndice) durante toda la noche a 4° C. Posterior al lavado con PBS-T, 5 veces, se realizaron diluciones dobles (1:200,

1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 y 1:8000) y por duplicado de cada uno de los conjugados a probar (SIGMA: A-6029; BIORAD: 172-100) incubándose a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente se realizaron lavados bajo las condiciones descritas anteriormente. Los discos fueron revelados con α -cloronaftol y peróxido de hidrógeno, y el título del conjugado se tomó en la última dilución en la cual se observó una coloración violeta con una intensidad considerable.

5.2.4. Elección del sustrato y del revelador.

Se probaron dos sustratos: sustrato para fosfatasa alcalina (ZYMED; BCIP/NBT: 508108) y α -cloronaftol (SIGMA:C8890). Para revelar con alfa-cloronaftol se utilizó peróxido de hidrógeno al 30% y al 50% (Fermont: 56001 y Fermont: 56021, respectivamente).

5.2.5. Fijación de los antígenos a probar.

Se utilizaron las siguientes proteínas: rPT-16, 38 kDa, 45/47 kDa, tiorredoxina y ESAT-6. Estas fueron fijadas en las membranas utilizando concentraciones de 2.5 μ g/ml y 5 μ g/ml de cada uno. Así mismo se utilizaron los filtrados de cultivo AN-5 y RV-11, y los derivados protéicos purificados: PPD tuberculosis, PPD bovino y PPD aviar. Estos antígenos se trabajaron en concentraciones de 25 μ g/ml y 50 μ g/ml de cada uno.

5.2.6. Técnica de IFMA.

Los antígenos a utilizar se fijaron en las membranas de NY y de NC de la misma manera que se menciona en el punto 5.2.2. (un antígeno por carril), y en las concentraciones indicadas en el párrafo anterior (5.2.5). Las membranas se cortaron en tiras, las cuales contenían el total de antígenos en las concentraciones establecidas previamente. Inicialmente se comparó el efecto de dos soluciones bloqueadoras, una con albúmina sérica bovina (ASB) al 1 %, y la otra con leche descremada al 5 %. Así mismo cada tipo de membrana fue trabajada bajo condiciones diferentes:

membrana de NY sin solución bloqueadora (SB), membrana de NY con SB de albúmina sérica bovina al 1 %, membrana de NC sin SB y membrana de NC con SB de PBS-T leche 5 %. Las membranas trabajadas con SB se dejaron sumergidas y en agitación durante 90 min; transcurrido este tiempo, se lavaron 5 veces con PBS-T y se secaron con la ayuda de la bomba de vacío.

Se prepararon diluciones 1:100 en SB de cada uno de los sueros humanos y se pusieron a reaccionar con cada una de las tiras durante 1 h con agitación y a temperatura ambiente. Se repitieron los 5 lavados como se ha indicado anteriormente.

A continuación, se cubrieron las tiras con el conjugado peroxidado anti-IgG humana (SIGMA, A-6029) obtenido en cabra, diluido 1:1000 en SB. Se dejaron incubando las muestras durante 45 min en agitación a temperatura ambiente; repitiéndose la operación de lavado posteriormente.

Una vez que las tiras se secaron perfectamente, se revelaron con solución de α -cloronaftol con peróxido al 50% agregando un volumen suficiente para cubrirlas. Las tiras se dejaron sumergidas en la solución reveladora durante 15 min o hasta la apreciación de bandas de color violeta sobre las membranas. Finalmente, las tiras se lavaron con agua destilada para detener la reacción de revelado.

6. RESULTADOS

Para la realización de la técnica de IFMA se emplearon membranas de NC bloqueadas con solución de PBS-Tween con 5% de leche descremada. De esta manera se eliminó el fondo que se observó con las otras condiciones trabajadas.

Para la fijación de los antígenos a las membranas de NC se empleó una cámara Miniblotter 45 (Immuntics). Se depositaron 133 μ l por carril de los antígenos en las diluciones que a continuación se indican: las proteínas rPT-16, 38 kDa, 45/47 kDa, tiorredoxina y ESAT-6 fueron fijadas en concentraciones de 2.5 y 5 μ g/ml cada una, mientras que los filtrados de cultivo AN-5 y RV-11 así como los derivados protéicos purificados (PPD tuberculosis, PPD bovino y PPD aviar) se trabajaron

en concentraciones 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$ cada uno. El análisis de resultados se realizó considerando únicamente las concentraciones más altas de cada uno de los antígenos (5 $\mu\text{g/ml}$ para las proteínas y 50 $\mu\text{g/ml}$ para los PPDs y filtrados de cultivo).

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 humana obtenido en cabra, de SIGMA (A-6029) 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 α -cloronaftol (SIGMA: C8890) con peróxido de hidrógeno al 50% (Fermont: 56021).

En la tabla 1 se muestran los datos generales de los 99 sueros empleados en este trabajo. Se especifica el diagnóstico hecho a los pacientes antes de este estudio. De acuerdo a ese diagnóstico los individuos se clasificaron en cuatro grupos: tuberculosos, sospechosos, con afecciones diferentes a TB y sanos.

La figura 1 muestra el reconocimiento serológico de las muestras pertenecientes a los grupos mencionados anteriormente hacia las proteínas, filtrados de cultivo y derivados proteicos purificados micobacterianos obtenido mediante la técnica de IFMA.

Los resultados obtenidos del enfrentamiento de los sueros de cada grupo de individuos contra los diversos antígenos probados en este trabajo mediante la técnica de IFMA, se muestran en las tablas 2, 3 y 4, que corresponden a las muestras de individuos tuberculosos, sospechosos, con afecciones diferentes a TB y sanos, respectivamente. Los resultados se reportan en una forma cualitativa según el grado de intensidad del color que presentó cada una de las bandas que se muestran en la figura 1, considerándose bajo (1), medio (2 y 3) y alto (4 y 5). Cabe mencionar que los antígenos reconocidos por los sueros de individuos tuberculosos presentaron una intensidad mayor que aquellos reconocidos por los otros grupos. Los sueros no enlistados, así como los pertenecientes al grupo de individuos con afecciones diferentes a TB, fueron aquellos que no reconocieron a ninguno de los antígenos utilizados.

La gráfica 1 muestra el porcentaje de sueros de los distintos grupos de individuos que presentaron un reconocimiento positivo por lo menos a uno de los diversos antígenos micobacterianos empleados en el presente estudio; resultando los siguientes porcentajes para cada grupo: 54.76% (23/42 sueros) para el grupo de individuos con TB, 23.30% (7/30) en el grupo de individuos sospechosos, 0.0% en el grupo de individuos con afecciones diferentes a TB, y solo 4.5% (1/22) para el grupo de individuos sanos.

En la gráfica 2 se muestran los porcentajes de reconocimiento positivo a cada uno de los antígenos micobacterianos por los sueros de los distintos grupos de individuos. De los 23 sueros de individuos tuberculosos que reconocieron por lo menos un antígeno, el 100% de ellos reconoció RV-11, el 91.3% PPD tb y el 86.95% AN-5 y PPD bov; solamente el 2.38% reconoció PPD av. En el caso de los antígenos proteicos, el 56.50% de estos sueros reconoció solamente a la rP-16. De los 7 individuos sospechosos que reconocieron por lo menos un antígeno, el 100% reconoció RV-11, 85.71% PPD tb y AN-5, 71.42% PPD bov, y 57.14% rP-16.

En el caso de los individuos sanos, solamente uno de los sueros (N-2) reconoció tanto el extracto RV-11 y el PPD tuberculosis, ambos solamente en la concentración alta (50 µg/ml). Por otra parte, todos los sueros de individuos con afecciones distintas a tuberculosis fueron negativos a todos los antígenos presentes en las tiras.

TABLA I. Relación de sueros humanos empleados en este estudio.

CLAVE	DIAGNÓSTICO
U-3	TBP III
U-4	TB miliar
U-5	TBP III
U-11	TBP V
U-20	TB renal
U-21	TB renal
U-26	TBP III
U-27	TBP III
U-28	TBP III
U-29	TBP -
U-34	TBP IV
U-47	TB reactivado
U-49	TBP III
U-52	TB renal
U-62	TB ganglionar
U-89	TBP III
U-91	TBP IV
U-94	TBP IV
U-98	TBP III
U-99	TBP IV
U-100	TBP III
U-107	TB miliar
U-108	TBP-
U-109	TBP III
U-111	TB renal
U-114	TBP-
U-115	TB miliar
U-116	TBP -
U-118	TBP
U-120	TBP III
U-126	TB ganglionar
U-127	TBP III
U-129	TB testicular

CLAVE	DIAGNÓSTICO
U-141	TBP III
U-143	TBP III
U-144	TBP -
U-145	TBP -
U-147	TBP
U-151	TB renal
U-152	TBP III
I-1	Sospechoso
I-2	Sospechoso
I-3	Sospechoso
I-4	Sospechoso
I-5	Sospechoso
I-28	Sospechoso
I-31	Sospechoso
I-125	Sospechoso
I-127	Sospechoso
I-131	Sospechoso
I-134	Sospechoso
I-140	Sospechoso
I-141	Sospechoso
I-149	Sospechoso
I-152	Sospechoso
I-156	Sospechoso
I-158	Sospechoso
I-162	Sospechoso
I-167	Sospechoso
I-170	Sospechoso
I-172	Sospechoso
I-192	Sospechoso
I-206	Sospechoso
I-210	Sospechoso
I-215	Sospechoso
I-223	Sospechoso

CLAVE	DIAGNÓSTICO
I-227	Sospechoso
I-232	Sospechoso
I-233	Sospechoso
MP-5 (s)	Sospechoso
N-1	Sano
N-2	Sano
N-3	Sano
N-4	Sano
N-5	Sano
N-6	Sano
N-7	Sano
N-8	Sano
N-9	Sano
N-10	Sano
N-12	Sano
N-15	Sano
N-17	Sano
N-18	Sano
N-19	Sano
N-21	Sano
N-22	Sano
N-23	Sano
N-24	Sano
N-25	Sano
N-26	Sano
N-27	Sano
U-13(o)	Ca. Laringe
U-16(o)	Bronquitis
U-19 (o)	Asma B.
U-33 (o)	Ca. bR
U-110(s)	TB linfo?
U-128 (s)	Pble TB renal
U-149 (o)	Pble ca br

TB tuberculosis.
TBP tuberculosis pulmonar.
Ca carcinoma.
B bronquial.
Pble probable.

Fig. 1. Reconocimiento antigénico de sueros de individuos tuberculosos, sospechosos y no tuberculosos mediante la técnica de IFMA.

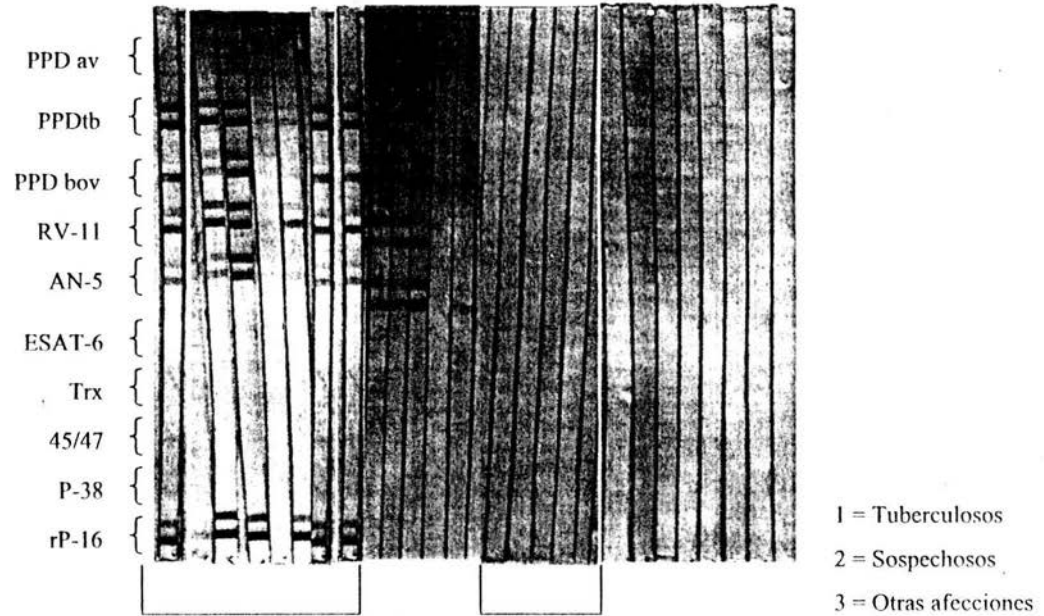


TABLA 2. Reconocimiento antigénico hacia diferentes proteínas, filtrados y extractos mycobacterianos presentado por sueros de individuos tuberculosos.

SUEROS	rPT-16		P-38		45/47		Tiorredoxina		ESAT-6		AN-5		RV-11		PPDbov		PPDt.b.		PPDav	
	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	5 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg
U-5	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	1	2	1	2	2	2	-	-
U-99	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	1	1	-	-
U-100	4	5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	3	1	2	1	2	-	-
U-107	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	2	3	1	2	2	3	-	1
U-109	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	-	1	1	1	-	-
U-118	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	1	-	1	-	-
U-127	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	1	2	1	1	1	2	-	-
U-141	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	1	1	-	-
U-143	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
U-144	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	1	1	1	2	-	-
U-152	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	2	-	-
U-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	1	2	1	1	2	2	-	-
U-26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	2	-	-
U-27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	-	1	2	2	-	-
U-28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	2	1	2	2	3	-	-
U-52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	1	2	1	3	-	-
U-91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	1	1	2	-	-
U-120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	1	2	-	1	1	2	-	-
U-47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-
U-145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	1	1	1	1	1	1	-	-
U-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-
U-110	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1	-	-
U-129	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-

GRADO DE INTENSIDAD

1 = BAJO

2 y 3 = MEDIO

4 y 5 = ALTO

TABLA 3. Reconocimiento antigénico hacia diferentes proteínas, filtrados y extractos mycobacterianos presentado por sueros de individuos sospechosos.

SUEROS	rPT-16		P-38		45/47		Tiorredoxina		ESAT-6		AN-5		RV-11		PPDbov		PPDt _b		PPD _{av}	
	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	5 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg
I-1	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	1	1	1	2	-	-
I-2	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
I-3	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	-	1	1	2	-	-
I-4	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	1	1	2	2	1	2	-	-
I-131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-
I-156	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
I-192	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	1	-	1	-	1	-	-

GRADO DE INTENSIDAD

1 = BAJO

2 y 3 = MEDIO

4 y 5 = ALTO

TABLA 4. Reconocimiento antigénico hacia diferentes proteínas, filtrados y extractos mycobacterianos presentado por sueros de individuos sanos.

SUEROS	rPT-16		P-38		45/47		Tiorredoxina		ESAT-6		AN-5		RV-11		PPDbov		PPDt _b		PPD _{av}	
	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	5 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg
N-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-

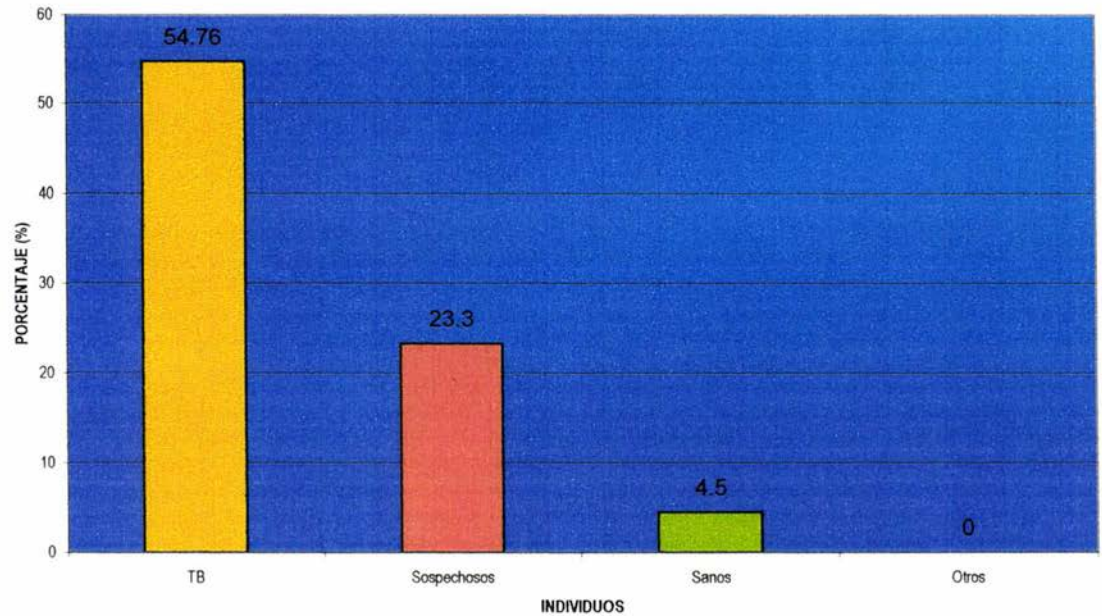
GRADO DE INTENSIDAD

1 = BAJO

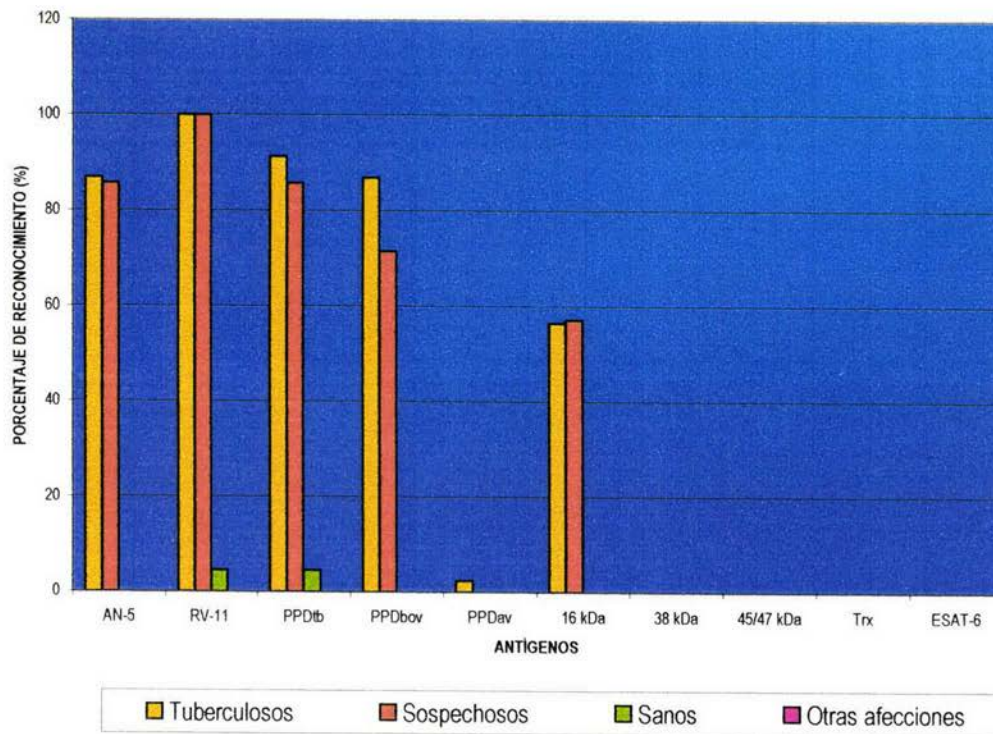
2 y 3 = MEDIO

4 y 5 = ALTO

Gráfica 1. Porcentaje de sueros que presentaron un reconocimiento positivo a uno o más antígenos mycobacterianos en grupos de individuos tuberculosos, sospechosos, sanos y con afecciones diferentes a TB.



Gráfica 2. Porcentaje de reconocimiento a cada uno de los diferentes antígenos micobacterianos que presentaron los sueros de individuos tuberculosos, sospechosos, sanos y con afecciones diferentes a TB.



7. - DISCUSIÓN

Entre los métodos de diagnóstico de la tuberculosis se encuentran: el examen del esputo y el cultivo del baciío, los cuales son considerados los estándares de oro. Sin embargo, la sensibilidad del frotis a partir del esputo para la coloración acidorresistente es solamente del 50%, debido a que se requiere una cantidad mayor de 10^4 bacilos por ml de esputo para una detección positiva. Por otra parte, aunque la sensibilidad del cultivo a partir del esputo es considerada de mayor rendimiento (80%), la realización de cultivos micobacterianos resulta ser fastidiosa y estos tardan por lo menos dos semanas en crecer, empleando medios sólidos; además, las facilidades para cultivar este microorganismo no son accesibles en cualquier laboratorio (Chan et al., 2000).

Otras pruebas comúnmente utilizadas para el diagnóstico de tuberculosis activa son: las radiografías de tórax, cuya sensibilidad, especificidad y reproducibilidad son bajas; la prueba de la tuberculina, es poco específica y se ha observado que da falsos negativos en el 20-30 % de los pacientes recientemente diagnosticados con tuberculosis activa; las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos desarrolladas recientemente son más específicas y sensibles, sin embargo su costo es muy elevado y requieren de equipo sofisticado (Menzies, 1999; Pesanti, 1994).

La técnica de ELISA (inmunoensayo ligado a una enzima) empleada para detectar anticuerpos contra *M. tuberculosis* es relativamente simple y poco costosa, sin embargo, presenta poca sensibilidad y especificidad, particularmente en pacientes cuyos resultados por la técnica de frotis fueron negativos (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 es considerada la variación en el reconocimiento antigénico de cada individuo enfermo (según la inmunogenética del paciente, los factores ambientales, etc.) ni la producción de diferentes proteínas micobacterianas en las diferentes etapas de la enfermedad (Gennaro, 2000).

Actualmente se han desarrollado técnicas serológicas en las cuales se emplea la combinación de varios antígenos micobacterianos con la finalidad de establecer un patrón antigénico en las

diferentes etapas de la enfermedad y/o infección. Sin embargo, se ha observado que esta mezcla de antígenos utilizados en la técnica de ELISA suele disminuir la serorreactividad de cada uno de los componentes de dicha mezcla (Gennaro,2000).

Entre las técnicas desarrolladas recientemente se encuentra la técnica de 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, 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 (Lyashchenko et al., 2000).

Considerando la técnica de MAPIA, existen diferentes formas de preparar mezclas de múltiples antígenos, una de ellas consiste en imprimir los antígenos individuales uno seguido del otro pero sobre el mismo sitio en la membrana para lo cual es necesario aplicar carga eléctrica; la otra forma consiste en hacer una mezcla de antígenos, es decir, los antígenos se mezclan 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, lo cual no permite identificar que proteínas son las que reaccionan con el suero del paciente. Además, sería difícil determinar que antígeno(s) se está reconociendo en dicha mezcla, la cual incluye antígenos expresados en diferentes etapas de la enfermedad. Otra opción es imprimir cada antígeno en diferentes sitios de la membrana, lo cual elimina ambos problemas mencionados anteriormente (Lyashchenko et al., 2000).

En el presente trabajo se estandarizó la técnica de IFMA, la cual además del presentar las mismas ventajas que la técnica de MAPIA, no requiere de un sistema atomizador pues la fijación de los antígenos se hace manualmente empleando un miniblotted 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 nos ayudaría a obtener información e integrar en la prueba proteínas que se reconocen en distintos estadios de la enfermedad (Lyashchenko et al., 2000).

Ya que la detección de anticuerpos se hizo utilizando un cromógeno, cualitativamente la prueba se puede evaluar visualmente y sin ayuda de ningún aparato, lo que hace 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.

La detección de una diferente gama de proteínas micobacterianas ha sido empleada por una gran cantidad de investigadores con la finalidad de establecer un patrón antigénico que ayude a discernir a individuos tuberculosos de individuos asintomáticos empleando distintos métodos de diagnóstico. Por ejemplo, la proteína de 16 kDa, la cual se ha reportado que se expresa en la fase temprana de la enfermedad mientras que la proteína de 38 kDa es expresada únicamente por *M. tuberculosis* y no por micobacterias vacunales, por ende se les asocia a diversas etapas de la enfermedad (Good y Shinnick, 1998).

La ausencia de respuesta humoral hacia un antígeno micobacteriano en particular puede ser interpretada como consecuencia de una inmunosupresión o debido a la genética del hospedero. Raja y cols.(2002) demostraron que este hecho también puede deberse a que los anticuerpos se encuentren secuestrados formando complejos inmunes circulantes (CICs); ellos emplearon la técnica de ELISA para comparar los niveles de IgG, IgA e IgM hacia el antígeno de 16 kDa entre pacientes esputo-cultivo positivos e individuos sanos, encontrando que la IgG es el anticuerpo predominante en el suero de pacientes tuberculosos, aunque en ausencia de este anticuerpo algunos sueros fueron positivos a IgA e IgM. Sin embargo, al precipitar los CICs con polietilenglicol, observaron que muchos sueros de pacientes enfermos que resultaron negativos en la medición de antígenos libres fueron positivos para CICs, principalmente para aquellos formados con IgG (Raja et al., 2002).

La observación anterior podría justificar la ausencia de reconocimiento por varios de los sueros de pacientes tuberculosos hacia algunos de los antígenos micobacterianos analizados en el presente trabajo, como es el caso de las proteínas de 16 kDa, 38 kDa, tiorredoxina y el complejo Apa.

Por otra parte; en un estudio realizado en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* los antígenos de 16 kDa y ESAT-6 indujeron una producción elevada de anticuerpos en la mayoría de estos animales; mientras que la respuesta fue débil hacia el complejo Apa. Estos resultados también fueron observados en estudios previos en humanos, concluyendo que la proteína de 16 kDa y ESAT-6 son potentes antígenos serorreactivos tanto en humanos como en bovinos (Lyashchenko et al., 1998b). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo son parcialmente similares a estos reportes, ya que fue posible la detección de anticuerpos contra la proteína de 16 kDa en individuos tuberculosos (26%), pero en caso contrario, el reconocimiento del antígeno ESAT-6 fue negativo. En México no hay antecedentes del reconocimiento de este último antígeno por individuos tuberculosos utilizando la técnica de IFMA.

Se sabe que la proteína de 38 kDa es un antígeno serodominante, característico de la enfermedad aguda y recurrente, y ha sido reconocido solamente por el suero de pacientes con TB cavitaria, sin embargo, también se han registrado casos de pacientes con éstas característica o de individuos infectados con VIH con bajos niveles de anticuerpos contra esta proteína (Samanich et al., 1998). Wilkinson y cols. (1997) sugieren que los bajos niveles de producción de anticuerpos contra esta proteína sea ocasionada por un estado de anergia de linfocitos T y/o B. Estas teorías podrían avalar los resultados obtenidos en el presente estudio mediante la técnica de IFMA, en el que ningún individuo con tuberculosis reconoció la proteína P38. Así mismo, algunos estudios sugieren que las proteínas nativas de las micobacterias poseen epítomos para las células B que liberan anticuerpos durante la infección natural y que las versiones recombinantes de estos antígenos carecen de esos epítomos, esto es aplicable al complejo Apa y a P-38 (Samanich et al., 2000).

Por otra parte, en un experimento realizado por Samanich y cols. en 1998 con antígenos de los filtrados de cultivo (incluido el complejo Apa) observaron que del total de proteínas (>100) presentes solamente 26, entre ellas el complejo Apa, fueron reconocidas por los anticuerpos de pacientes tuberculosos; sin embargo, en otro estudio observaron que el reconocimiento de esta proteína es débil, sugiriendo que es poco serorreactiva (Lyashchenko et al., 1998b). El hecho de que esta proteína (45/47 kDa) sea poco serorreactiva puede ser una de las causas por las cuales los pacientes involucrados en este estudio no la hayan reconocido.

Los estudios realizados acerca de la Trx han sido hasta el momento acerca de su caracterización, composición y función en el género *Mycobacterium* y no había sido considerada, hasta el presente trabajo, como una posible proteína útil en el diagnóstico de la TB. sin embargo, los resultados obtenidos no fueron los esperados para este propósito.

La utilización de filtrados de cultivo como antígenos en técnicas para el diagnóstico de la TB ha sido de gran utilidad, aunque no se conozca 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. Se sugiere que los dos filtrados de cultivo (RV-11, proveniente de *M. tuberculosis* y AN-5, de *M. bovis*) empleados para este estudio contengan proteínas en común y por ende los resultados obtenidos para cada uno de ellos sean similares.

Los datos obtenidos en el presente trabajo muestran que individuos sanos y no vacunados no reconocen ningún antígeno empleado, mientras que el único individuo sano y vacunado, incluido en este estudio, reconoció el PPDtb y el filtrado de cultivo RV-11, por lo tanto sería necesario realizar un análisis con un mayor número de este tipo de muestras para confirmar si el empleo de la técnica de IFMA sería útil para distinguir a las personas vacunadas de las no vacunadas.

8. CONCLUSIONES

- 1) La proteína recombinante de 16 kDa, los filtrados de cultivo RV-11 y AN-5 y los PPDs obtenidos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* son antígenos prometedores para el diagnóstico de la tuberculosis.
- 2) El desarrollo de ésta técnica permite emplear concentraciones muy bajas y volúmenes muy pequeños tanto de antígenos como de muestras séricas.
- 3) Esta técnica nos permite trabajar con una gran cantidad de antígenos y/o concentraciones diferentes en una misma tira de membrana.

- 4) Las membranas de nitrocelulosa presentaron mayor capacidad de adsorción para los antígenos empleados, y las bandas obtenidas presentaron mejor resolución que en las membranas de nylon.
- 5) Las membranas con los antígenos fijados pueden conservarse en refrigeración durante períodos de tiempo prolongados.
- 6) IFMA es una técnica relativamente económica comparada con técnicas como ELISA y PCR.

APÉNDICE

Preparación de soluciones

Preparación de solución PBS (pH = 7.2).

NaCl..... 8g
K₂HPO₄..... 1.21g
KH₂PO₄..... 0.34g
H₂O dest..... 1.00 L

Preparación de solución PBS-T 20 (0.05%).

PBS pH 7.2 1.0 L
Tween 20 0.5 ml

Preparación de Solución Bloqueadora:

Solución PBS-T 20 (0.05% , pH = 7.2) 1.0 L
Leche descremada 25 g

Preparación de solución reveladora α -cloronaftol.

α -cloronaftol..... 0.3 g
Metanol..... 10.0 ml
PBS..... 50.0 ml
H₂O₂..... 50.0 μ l

Preparación de la Solución Teñidora de Azul de Coomassie R-250:

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

REFERENCIAS

- Andersen, Á., Yuan, Z., Haslov, K., Vergmann, B., and Bennedsen, J., (1986). Interspecies reactivity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* as examined by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 446-451.
- Andersen A.B. y Brennan P. (1994). En *Tuberculosis: Pathogenesis, Progection , and Control*, cap. 21. Ed. Barry R. Bloom. U.S.A. pp. 307-332.
- Arend, S.M., P. Andersen, K.E. van Meijgaarden, R.L. V. Skjot, J.T. van Dissel, and T.H.M. Ottenhoff. (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.
- Ausina Ruiz, V. (1992). En *Medicina Interna*, 13ª ed. Sección 17, parte II. CD-ROM.
- Baez-Saldaña A.R., Pérez-Padilla J.R., Salazar-Lezama M.A. (2003). Discrepancias entre los datos ofrecidos por la Secretaria de Salud y la Organización Mundial de la Salud sobre tuberculosis en México, 1981-1998. *Salud Pública Mex.* **45**: 78-83.
- Balcewicz-Sablinska, M.K., Keane, J., Kornfeld, H., Remold, h.G. (1998). Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- α . *J. Immunol.* **161**:2636-2641.
- Banchereau, J. and R.M. Steinman. (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.

Barnes, P.F., Abrams, J.S., Lu, S., Sielings, P.A., Rea, T.H., Modlin, R.L. (1993). Patterns of cytokine production by *Mycobacterium* reactive human T-cell clones. *Infect. Immun.* 61: 197-203.

Bean, A.G.D., Roach, D.R., Briscoe, H., France, M.P., Komer, H., Sedgwick, J.D., Britton, W.J. (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.

Behr, M.A., S.A. Warren, H. Salamon, P.C. Hopewell, A. Ponce de Leon, C.L. Daley, and P.M. Small. (1999). Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative from acid-fast bacilli. *Lancet*. 353:444-449.

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

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

Caruso, A.M., Serbina, N., Klein, E., Triebold, K., Bloom, B.R., Flynn, J.K. (1999) Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN- γ , yet succumb to tuberculosis. *J. Immunol.* 162:5407-54016.

Chan, S.L., Z. Reggiardo, T.M. Daniel, D.J. Girling, and D.A. Mitchison. (1990). Serodiagnosis of tuberculosis using ELISA with antigen 5 and hemagglutination assay with glycolipid antigens. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142:385-390.

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

Chaulk C.P., K. Moore-Rice, R. Rizzo, et al. (1995). Eleven years of community-based directly observed therapy for tuberculosis. *JAMA*.**274**:945-951.

Clarke, S.R.M. (2000). The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. *J. Leuk. Biol.* **67**:607-6014.

Clarridge, J.E., R.M. Shawar, T.M. Shinnick, and B.B. Plikaytis. (1993). Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2049-2056.

Collins, F., J.R. Lamb, D.B. Young. (1998). Biological activity of protein antigens isolated from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. *Infect and Immun.* **56**:1260-1266.

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

Espitia C., I. Cervera, R. Gonzalez. (1989a). A 38 kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immunol.* **77**: 373-7.

Espitia, C. y Mancilla, R. (1989b). Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin exp Immunol.* **77**:378-383.

Espitia C., M. Elinos, R. Hernandez-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.

Espitia C., R. Espinosa, R. Saavedra, R. Mancilla, F. Romain, A. Laqueyrie, C. Moreno. (1995). Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50- to 55-Kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45- to 47-Kilodalton antigens. *Infect and immun.* **63**: 580-584.

Flynn J. y Chan J. (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* **19**:93-129.

Forbes, B.A., and K.E.S. Hicks. (1993). Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1688-1694.

Garbe, T., D. Harris, M. Vordermeier, R. Lathigra, J. Ivanyi, and D. Young. (1993). Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton antigen in *Mycobacterium smegmatis*: immunological analysis and evidence of glycosylation. *Infect. Immun.* **61**:260-267.

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, Kees 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.L. (2000). Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Clin Inf Dis.* **30 (Suppl 3)**: S243-246.

Glickman, S.M., Jacobs, R.W. (2001). Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a discipline. *Cell.* **104**:477-485.

Good R.C. y Shinnick T.M. (1998). Microbiology and microbial infections, vol. 2, capítulo 26: Mycobacterium. 9 ed. Arnold. UK.

Gordin, F., and G. Slutkin. (1990). The validity of acid-fast smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **114**: 1025-1027.

Graham, N.M., Nelson, K.E., Solomon, L., Bonds, M., Rizzo, R.T., Scavotto, J., Astemborski, J., and Vlahov, D. (1992). Prevalence of tuberculin positivity and skin test anergy in HIV-1-seropositive and – seronegative intravenous drug users. *JAMA*. **267**:369.

Harboe M., H.G. Wiker. (1992). The 38 kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *J Infect Dis*. **166**: 874-84.

Henderson, R.A., Watkins, S.C., Flynn, J.L. (1997). Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol*. **159**:635-643.

Janeway, C.A. y Travers, P. (1997). *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 3 ed. Garland Publishing Inc. p.p. 7:37.

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

Keane, J., Balcewicz-Sablinska, M.K., Remold, H.G., Chupp, G.L., Meek, B.B., Fenton, M.J., Komfeld, H. (1997). Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect. Immun*. **65**:298-304.

Lalvani, A., Brookes, R., Wilkinso, R., Malin, A., Pathan, A., Andersen, P., Dockrell, H., Pasvol, G., Hill, A. (1998). Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**:270-275.

Landowski C., H.P. Godfrey, S.I. Bentley-Hibbert, X. Liu, Z. Huang, R. Sepulveda, K.Huygen, M.L. Gennaro, F.H. Moy, S.A. Lesley, and M.Haak-Frendscho. (2001). Combinatorial use of antibodies to secreted mycobacterial proteins in a host immune system-independent test for tuberculosis. *J Clin Microbiol*. **39**:2418-2424.

Lyashchenko, K., Coliangeli, R., Houde, M., Jahdali, H.A., Menzies, D., Gennaro, M.L. (1998a). Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect. Immun*. **66**, 3936.

Lyashchenko K., J.M. Pollock, R. Colangeli, and M.L. Gennaro. (1998b). Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect and immun.* **66**:5344-5349.

Lyashchenko K.P., M. Singh, R. Colangeli, M.L. Gennaro. (2000). A multi-antigen print immuno assay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J Immunol Methods.* **242**: 91-100.

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

Menzies, D. (1997). Issues in the management of contacts of patients with active pulmonary tuberculosis. *Can. J. Public Health.* **88**:197-201.

Menzies, D. (1999). Interpretation of repeated tuberculin tests. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**:15-21.

Micallef, M.J., Ohtsuki, T., Kohno, K., Tanabe, F., Ushio, S., Namba, M., Tanimoto, T., Torigoe, K., Fujii, M., Ikeda, M., Fukuda, S., Kurimoto, M. (1996). Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur. J. Immunol.* **26**:1647-1651.

Miller K.S. y Miller J.M. (1996). Tuberculosis in pregnancy: interactions, diagnosis, and management. *Clin Obstet Gynecol.* **39**: 120-142.

Murray, C.J., Salamon, J.A. (1998). Modeling the impact of global tuberculosis control strategies. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**:13881 : 13886

Okamura, H., Tsutsui, H., Kashiwamura, S., Yoshimoto, T., Nakanishi, K. (1998). Interleucina-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv. Immunol.* **70**:281-312.

Orme, I.M., Roberts, A.D., Griffen, J.P., Abrams, J.S. (1993). Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* **151**:518-525.

Orme, I. (2001). The search for new vaccines against tuberculosis. *J Leukocyte Biol.* **70**:1-10.

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.

Pesanti, E.L. (1994). The negative tuberculin test: tuberculin, HIV, and anergy panels. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149**:1699-1709.

Pollock, J. y Andersen, P. (1997). Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* cattle. *Infect and Immun.* **65**:2587-2592.

Raja A., K.R. Uma Devi, B. Ramalingam and Patrick J. Brennan. (2002). Immunoglobulin G, A, and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by the 16-Kilodalton Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* **9**:308-312.

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.

Romain, F., A. Laqueyrie, P. Miltzer, 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**: (11); 5567-5572.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Russel, D.G. (1995). Of microbes and macrophages: entry, survival and persistence. *Current Opinion Immunol.* **7**:479-483.

Samanich K.M., J.T. Belisle, M.G. Sonnenberg, M.A. Keen, S. Zolla-Pazner, S. Laal. (1998). Delineation of human antibody responses to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Diseases.* **178**: 1534-8.

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.

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

Smith P.G. and Moss A.R. (1994). En Tuberculosis: Pathogenesis, Protection , and Control, cap. 4. Ed. Barry R. Bloom. U.S.A., pp. 47-60.

Sonnenberg M.G., J.T. Belisle. (1997). Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun.* **65**: 4515-24

Tapia, R., Ruiz, C., Ferreira, E. (1995). Epidemiología de la tuberculosis en México. En Sada E., sifuentes J. ed. Tuberculosis. México, D.F. McGraw-Hill/Inter-Americana Editores. 761-788.

Toossi Z. and J.J. Ellner. (1996). Mechanisms of anergy in tuberculosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* **215**: 221-238.

Trinchieri, G. (1998). Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol.* **70**: 83-243.

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.

Vankayalapati, R., Wizel, B., Weis, E.S., Samten, B., Girard, M.W., Barnes, F.P. (2000). Production of interleukin-18 in human tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases Society of America.* **182**:234-239.

Wieles B., S. Nagai, H.G. Wiker, M. Harboe, and T.H.M. Ottenhoff. (1995). Identification and functional characterization of thioredoxin of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect and Immun.* **63**:4946-4948.

Wiker, H.G., K. Sletten, S. Nagai, and M. Harboe. (1990). Evidence for three separate genes encoding the proteins of the mycobacterial antigen 85 complex. *Infect. Immun.* **58**: 272-274.

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.

Wilkinson R.J., K. Haslov, R. Rappuoli, F. Giovannoni, P.R. Narayanan, C.R. Desai, H.M. Vordermeier, J.Paulsen, G.Pasvol, J.Ivanyi, and M. Singh. (1997). Evaluation of the recombinant 38 Kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential immunodiagnostic reagent. *J Clin Microbiol.* **35**: 553-557.

Wilson A.P.R. y Grüneberg R.N. (1997). Ciprofloxacina: 10 years of clinical experience. Maxim Medical. UK. p.p. 8-10, 38 y 39.

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

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, Z., P.J. Hilaris, and P.R. Ortiz de Montellano. (1999). Reduction of peroxides and dinitrobenzenes by *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin and thioredoxin reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **363**: (1), 19-26.