



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICA

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
ANTIGÉNICAS DE *Mycobacterium avium*
CON POTENCIAL DIAGNÓSTICO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
ERICK AMADOR GAYTÁN



TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

MÉXICO, D.F.

Agosto de 2010



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.

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE *Mycobacterium avium* CON POTENCIAL DIAGNÓSTICO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Yolanda López Vidal en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana, en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Con el financiamiento de DGAPA IN209708 y CONACyT-SALUD-2007-C01-68729.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM
Dr. Enrique Ortega Soto	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Guillermo Mendoza Hernández, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, quien colaboro con la identificación de proteínas por espectrometría de masas.

Se reconoce la asesoría técnica de la M. en C. Jaqueline Larracilla Camacho en los experimentos de electroforesis en dos dimensiones.

Se reconoce la asesoría Dra Lourdes Lloret Sánchez en la planeación y desarrollo experimental.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT. La conclusión de la tesis fue financiada por la Secretaria de Desarrollo Institucional de la UNAM mediante el programa “Fomento a la Graduación de los Alumnos de Posgrado de la UNAM”.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en agosto de 2010

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Adela Rodríguez Romero	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón	I. I. Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos	C.C.G, UNAM
Suplente	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez	I. I. Biomédicas, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yolanda López Vidal, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su gran apoyo y la confianza que me brindo.

A la M. en C. Jaqueline Larracilla Camacho, por la asesoría en la técnica de 2D-PAGE, por todo su apoyo, paciencia, tiempo y consejos compartido.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández, por su valiosa colaboración en la identificación de las proteínas por espectrometría de masas.

A la Dra Lourdes Lloret Sánches por su apoyo, asesoría, compañerismo y sobre todo por su amistad durante la planeación y desarrollo experimental.

A los miembros de mi comité tural: Dra Yolanda López Vidal, Dra. Maricarmen Quirasco Baruch y Dr. Enrique Ortega Soto, por guiarme y apoyarme en la realización de este trabajo.

A los miembros del Jurado: Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos, Dra. Maricarmen Quirasco Baruch y Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, por todos sus comentarios y sugerencias que permitieron el enriquecimiento y mejora de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis papás por todo su apoyo, por su ejemplo de superación, por su confianza, por su amistad y por amor incondicional, porque gracias a que siempre han estado conmigo ha sido posible la culminación de mi maestría. Los quiero mucho.....¡Gracias!

A mis hermanos Jorge Damian y Adair por su amistad, apoyo, complicidad y por estar ahí en las buenas y en las malas. Porque gracias a ustedes vale la pena seguir adelante.

A toda mi familia en especial a mis abuelitos, a mi tía Chelin y a Abraham por su gran cariño, porque los quiero y los admiro mucho.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, en especial a Eric, a Gaby y a Jonathan, porque hemos pasado muy buenos momentos, por las pláticas e intercambio de opiniones tan acertadas, por sus sabios consejos y por ser muy buenos amigos.

A los compañeros de laboratorio: Maritoña, Maribel, Gonzalo, Paco, Paty, Lulú, Karen, Gaby, Brenda, Xavier, Adriana, Stephanie, Viridiana, Alicia, Melisa, Jaqueline, Elizabeth y Sebastian, por hacer ameno los momentos en el laboratorio y porque son excelentes compañeros y amigos.

ÍNDICE

	Página
RECONOCIMIENTOS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	
I.1. EL GÉNERO <i>Mycobacterium</i>	1
I.1.1. Ubicación taxonómica	1
I.1.2. Características generales	2
I.2. MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS (MNT)	5
I.2.1. Generalidades	5
I.2.2. Clasificación	8
I.2.3. Agrupaciones de riesgo para causar infección en el humano	9
I.3. IMPORTANCIA CLÍNICA DE LAS MNT	11
I.3.1. Complejo <i>Mycobacterium avium</i> (CMA)	14
I.4. DIAGNOSTICO PULMONAR DE <i>Mycobacterium avium</i>	18
I.4.1. Examen clínico, baciloscopia y cultivo de bacterias.	18
I.4.2. Prueba de Tuberculina	20

I.4.3. Pruebas con interferon gamma	21
I.5. PROTEÓMICA	23
II. JUSTIFICACIÓN	26
III. OBJETIVOS	27
IV. METODOLOGÍA	28
IV.1. TITULACIÓN DE SUEROS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA	31
IV.1.1 Sueros humanos	31
IV.1.2 Cepas de micobacterias	31
IV.1.3 Tratamiento de las cepas	33
IV.1.4 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	33
IV.1.4 Calibración de la técnica de ELISA indirecta	34
IV.2 CULTIVOS Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	35
IV.2.1 Precultivo de las cepas de estudio	35
IV.2.2 Cinéticas de crecimiento	35
IV.2.3 Cultivo primario y cosecha	36
IV.2.4 Obtención de proteínas de extracto celular	36
IV.2.5 Cuantificación de proteínas	36
IV.3 GELES DE DOS DIMENSIONES (2D-PAGE)	37
IV.3.1 Rehidratación	37
IV.3.2 Isoelectroenfoque (primera dimensión)	38
IV.3.3 Equilibrio y geles de acrilamida (segunda dimensión)	39

IV.3.4 Tinción de plata	39
IV.4 TRANSFERENCIA E INMUNO BLOT	41
IV.5 OBTENCIÓN DE LA IMAGEN DIGITAL Y ANÁLISIS DE LOS GELES BIDIMENSIONALES	42
IV.6 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE INTERÉS	44
IV.6.1 Búsqueda <i>in situ</i> de las proteínas Identificadas de <i>M. avium</i> en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y <i>M. bovis</i> BCG Pasteur	44
V. RESULTADOS	46
V.1 TITULACIÓN DE SUEROS	46
V.1.1 Reconocimiento de cepas contra grupo de sueros	47
V.1.2 Selección de sueros para el Inmuno blot	49
V.2 CURVAS DE CRECIMIENTO	52
V.3 GELES 2D-PAGE DE <i>M. avium</i> M7 y <i>M. bovis</i> BCG México	53
V.4 INMUNOPROTEOMAS	56
V.4.1 <i>M. bovis</i> BCG México	56
V.4.2 <i>M. avium</i> M7	58
V.5 COMPARACIÓN DE LOS INMUNOPROTEOMAS E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	60
V.5.1 Búsqueda <i>in situ</i> de las proteínas identificadas de <i>M. avium</i> en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y <i>M. bovis</i> BCG Pasteur.	61

VI.	DISCUSIÓN	63
	VI.1 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS	67
VII.	CONCLUSIONES	73
VIII.	REFERENCIAS	74
IX.	ANEXOS	78
	IX.1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS	78
	IX.2. WESTERN BLOT PARA <i>M. bovis</i> BCG MÉXICO	82
	IX.3. WESTERN BLOT PARA <i>M. avium</i> M7	84

ABREVIATURAS

BCG	Bacilo Calmette-Guérin
DNA	Ácido Desoxirribunucleíco
IEF	Isoelectroenfoque
CFP-10	Proteína de Filtrado de Cultivo de 10kDa
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1 propanosulfato
CMA	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
CMT	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DTT	Ditiotreitol
DO _{600nm}	Densidad óptica 600 nm
ESAT-6	Antígeno Blanco de Secreción Tempraba de 6kDa
MNT	Micobacterias No Tuberculosas
PPD	Derivado Proteico Puro
RNA _r	Ácido Ribonucleico ribosomal
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

2D	Dos dimensiones
°C	Grados centígrados
h	Hora
kDa	Kilodaltones
kVh	Kilovolts hora
µg	Microgramos (1×10^{-6} g)
µm	Micrómetros (1×10^{-6} m)
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
V	Volts
Vh	Volts hora
PVDF	Fluoruro de polivinilideno

RESUMEN

El término “micobacterias no tuberculosas” (MNT) fue introducido por la Sociedad de Tórax Americana. Las MNT están conformadas tanto por especies clasificadas generalmente como no patógenas, así como por especies que conllevan un moderado riesgo de infección, a las cuales se les considera patógenos potenciales. Dentro de las principales patologías, producto de estas bacterias, se encuentra la infección en piel y en tejido blando, la linfoadenitis, la infección diseminada y la enfermedad pulmonar, siendo esta última la afección más frecuente por MNT. Dentro de las especies de MNT que causan enfermedad pulmonar destaca el complejo *Mycobacterium avium* (CMA). *M. avium* es un patógeno potencial frecuentemente aislado de casos clínicos, además de que se ha aislado de suelo y agua. Los aerosoles son la principal vía de infección.

La sintomatología de la enfermedad pulmonar ocasionada por MNT y en particular por *M. avium*, es muy semejante a la que se presenta en la tuberculosis por *Mycobacterium tuberculosis*. No se cuentan con métodos diagnósticos oportunos que permitan un diagnóstico y manejo adecuado de la enfermedad, ya que los tratamientos, en cuanto al uso de fármacos, las dosis y los tiempos son diferentes. Por lo cual el objetivo del presente trabajo fue la identificación de proteínas antigénicas únicas de la cepa *Mycobacterium avium* M7 con potencial diagnóstico.

Se encontraron cuatro proteínas antigénicas candidatas de *M. avium*, dos de las cuales antes de comprobarse su expresión en este trabajo, estaban descritas como hipotéticas (MAP2888 y MAP3479c), una proteína que participa en la vía de la glucólisis (aldosa fructosa bifosfato) y la última la cual forma parte de la vía de la β -oxidación (enzima multifuncional peroxisomal II). Las cuatro proteínas identificadas mostraron en promedio 85% de similitud a partir de un alineamiento de secuencias múltiples (se utilizó el programa Clustal X) de los amino ácidos de cada proteína identificada de *M. avium* contra la secuencia de las proteínas correspondientes en *M. tuberculosis* H37Rv y en *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. EL GÉNERO *Mycobacterium*

I.1.1. Ubicación taxonómica

En 1896 Lehmann y Neumann propusieron por vez primera el género *Mycobacterium* para clasificar al bacilo de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y al de la lepra (*Mycobacterium leprae*) [1, 2]. Estos microorganismos se clasifican taxonómicamente dentro de la clase Actinobacteria, subclase Actinobacteridae, del orden de los Actinomycetales (bacterias con forma de hongos), suborden Corynebacterineae, compuesto por ocho familias entre las que se encuentra la familia Mycobacteriaceae con únicamente el género *Mycobacterium* (Tabla 1), su genoma tiene alrededor de 4 millones y medio de pares de bases y se caracteriza por tener en su ADN un contenido de G+C entre 62-70% [1, 3-5].

Tabla 1. Ubicación taxonómica del género *Mycobacterium* [4].

Clase: Actinobacteria [6]

Subclase: Actinobacteridae [6]

Orden: Actinomycetales [7]

Suborden: Corynebacterineae [6]

Familia: Mycobacteriaceae [8]

Género: *Mycobacterium* [9]

I.1.2 Características generales

Las micobacterias son microorganismos inmóviles, aerobios, con la capacidad de esporular de acuerdo a lo demostrado por Ghosh J. y su grupo de trabajo quienes lograron la formación de esporas en *M. marinum* y *M. bovis* en cultivos de laboratorio [5, 10]. La morfología de sus colonias puede variar desde lisas hasta rugosas entre las distintas especies, de igual forma, la mayoría presentan más de una morfología colonial (Figura 1). Algunas especies pueden sintetizar pigmentos que les otorgan coloraciones que varían entre amarillentas o anaranjadas y rosáceas (Figura 2) [3].



Figura 1. Colonias de *Mycobacterium tuberculosis* en agar de Löwestein-Jensen después de 8 semanas de incubación.



Figura 2. Colonias de *Mycobacterium kansasii* después de 1 día de exposición a la luz.

Las micobacterias son bacilos rectos o ligeramente curvos que miden de entre 0.2 a 0.6 μm de grosor y de 1 a 10 μm de longitud (Figura 3). La alta concentración lipídica en su pared las hace fuertemente hidrofóbicas y muy resistentes a agentes químicos como son a algunos antibióticos y a mecanismos de desinfección comunes del agua como la cloración y la ozonificación. Esta peculiaridad de la pared hace también que las micobacterias se colorean con

dificultad mediante la tinción de Gram, pero una vez teñidas resisten a la decoloración por alcoholes acidificados, por lo que se consideran ácido-alcohol resistente y Gram positivas. La tinción más característica de las micobacterias es la de Ziehl-Neelsen, en la cual se utiliza el colorante carbol fuscina y se requiere calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana que contiene ceras. Al suspender el calentamiento y enfriar con agua, provoca una nueva solidificación de los ácidos grasos de modo que el colorante ya no puede salir de las bacterias. Por otro lado, el calentamiento aumenta la energía cinética de las moléculas del colorante lo cual también facilita su entrada a las bacterias. Las bacterias se decoloran con alcohol ácido, las bacterias que resisten la decoloración son de color rojo y la que no se ven de color azul debido al uso de un colorante de contraste como es el azul de metileno [3, 5].



Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión de un corte de *Mycobacterium tuberculosis*. Obtenida del sitio: wadsworth.org [11].

El 60% de la pared celular de las micobacterias se encuentra conformado por lípidos diversos. La pared celular peptidoglicolípida contiene lipoarabinomanana (LAM), lipomanana, dimicocerosato, dimicolato de trehalosa,

ácido glutámico, glucosamina, ácido murámico, arabinosa y galactosa. Los ácidos micólicos (contienen entre 60 y 90 átomos de carbono) junto con lípidos libres, le proporciona una barrera impermeable hidrofóbica (Figura 4) [12].

La pared celular le confiere a las micobacterias ciertas características, como son la resistencia a la decoloración con alcohol-ácido y a la desecación, permanecen viables en el esputo desecado de seis a ocho meses cuando están protegidas de la luz solar directa; también es una barrera efectiva frente a muchos agentes antimicrobianos. Asimismo, les proporciona el carácter hidrofóbico y las hace refractarias al ataque por hidrólisis enzimática. Finalmente, las moléculas como la lipoarabinomanana y el dimicolato de trehalosa tienen un papel fundamental en la vida intracelular, en el establecimiento de la infección y en la patogénesis, la interacción con los componentes de la respuesta inmune y promueven la inhibición de sus funciones efectoras [3, 13-15].

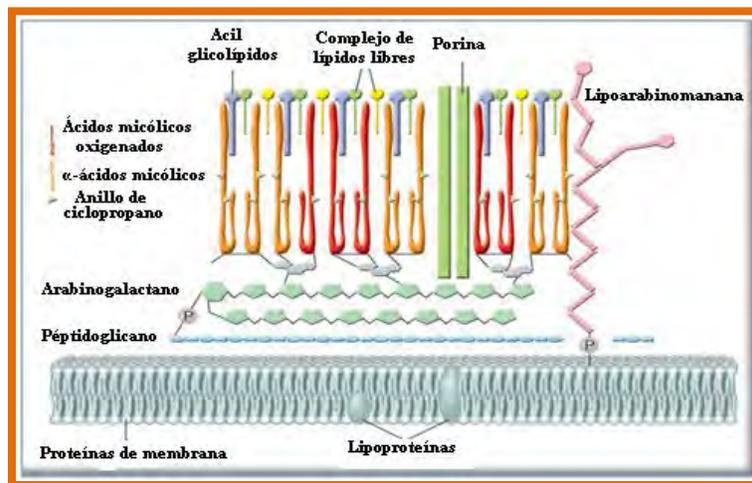


Figura 4. Estructura de la pared celular micobacteriana. Ubicación de los principales componentes de la pared celular, como son los ácidos micólicos, la capa de arabinogalactano, complejos de lípidos libres y LAM. Modificado de Riley, 2006 [15].

I.2 MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS (MNT)

I.2.1 Generalidades

Las MNT están conformadas principalmente por especies saprófitas excepcionalmente patógenas y algunas micobacterias oportunistas, con sólo dos excepciones de patógenos estrictos: *M. paratuberculosis* y *M. lepraemurium*.

Estos organismos, en el pasado, se han llamado micobacterias atípicas, término acuñado por Pinner [16] que en 1935 lo aplicó para denominar a aislados que causaron enfermedades en el humano pero no podían ser diferenciados de *M. tuberculosis* en base a su morfología, su pigmentación y su virulencia en animales. Estas especies de micobacterias también han recibido varios nombres como lo son el de “oportunistas”, “no tuberculosas”, “ambientales”, “micobacterias distintas a bacilos del tubérculo” (MOTT por sus siglas en inglés *Mycobacterium other than tuberculos*). Ninguno de estos términos se ha utilizado universalmente. El más aceptado es el de “micobacterias no tuberculosas” (MNT) introducido por la Sociedad de Tórax Americana y el cual se utilizó para el presente trabajo [1, 3, 17-20].

Las MNT pertenecen a las especies de micobacterias en las cuales no se incluyen a *M. leprae* el agente causal de la lepra en humanos ni a las especies pertenecientes al Complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). Este complejo está conformado por patógenos estrictos de animales y humanos destacando *M. tuberculosis* por ser el agente causal de la tuberculosis en los humanos [21, 22] y *M. bovis* el agente causal de la tuberculosis en los bovinos.

De *M. bovis* se obtuvo la vacuna conocida comúnmente como BCG (Bacilo de Calmette y Guérin), la cual provee una eficiente protección contra la tuberculosis en recién nacidos pero no evita el establecimiento de la tuberculosis latente o la reactivación de la tuberculosis pulmonar en adultos [23-28] (Figura 5).

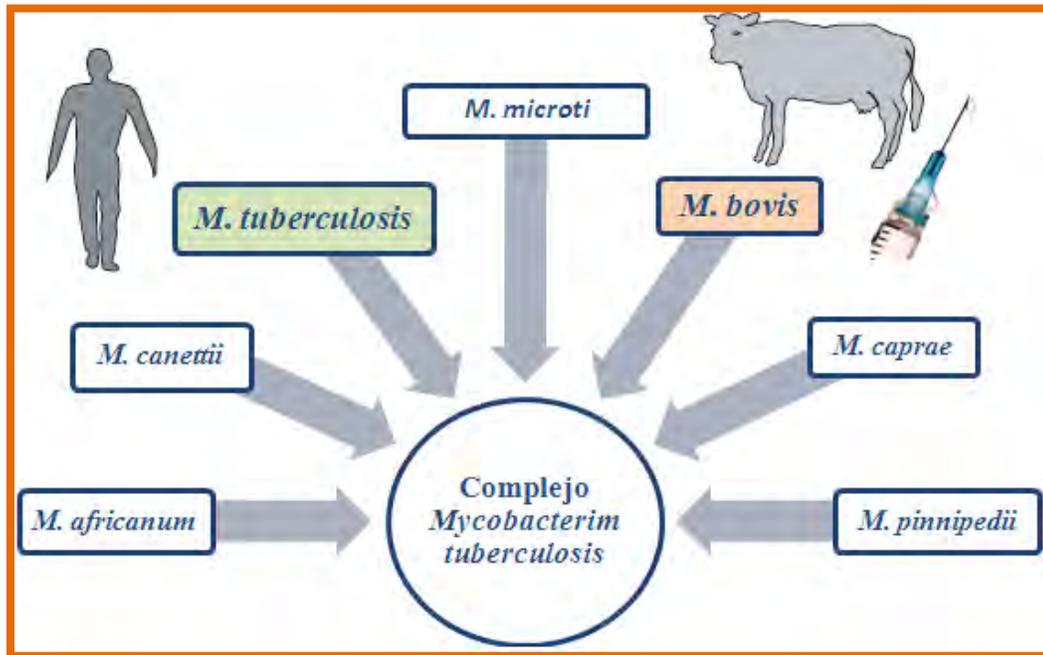


Figura 5. Integrantes del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Patógenos estrictos de animales y humanos. Destaca *M. tuberculosis* el agente causal de la tuberculosis en los humanos y *M. bovis* el agente causal de la tuberculosis en los bovinos y de la cual se desarrollo la vacuna BCG.

Las MNT representan al mayor número de especies incluidos en el género *Mycobacterium*, actualmente excede las 150 especies descritas (Figura 6). A diferencia del complejo *M. tuberculosis* y de *M. leprae*, las MNT son ubicuas en el ambiente y forman una parte integral del medio natural en los mantos acuíferos dulces y salados, en el suelo y en la vegetación. Pueden formar simbiosis con amibas y con protozoarios y son abundantes en los nichos ecológicos, donde las

condiciones climatológicas son adecuadas para su crecimiento, incluidos ambientes artificiales creados por el hombre (ej. piscinas, abastecimiento de agua, etc.) [29, 30].

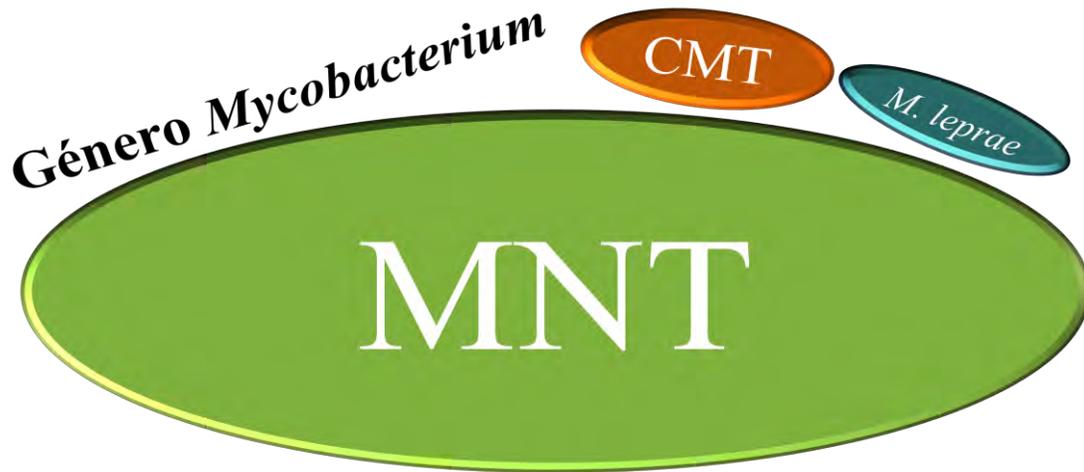


Figura 6. Ubicación de las MNT dentro del género *Mycobacterium*. Las micobacterias no tuberculosas (MNT) son todas aquellas que no incluyen a ninguna especie del Complejo *M. tuberculosis* (CMT) y *M. leprae* donde se encuentra el agente causal de la tuberculosis y de la lepra en el humano respectivamente, ambos patógenos obligados. También representan en número a la mayoría de las especies de micobacterias.

La mayoría de las especies crecen en medios con sustratos simples. Hay otras que requieren suplementos como micobactina, hemina u otros compuestos de hierro. El desarrollo se favorece con CO₂ y ácidos grasos. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 28 y 45° C. Sus tiempos de duplicación son aproximadamente de 20 h. La formación de pigmentos carotenoides es una propiedad observada con mayor frecuencia en las especies saprófitas que en las potencialmente patógenas [31].

I.2.2 Clasificación

Las MNT se clasifican dentro de dos grupos: aquellas micobacterias de rápido crecimiento (MRC) (sustrato Loewenstein-Jensen o McConkey entre 3 a 7 días y 28 a 30°C salvo algunas excepciones) y las micobacterias de lento crecimiento (MLC) (requieren de 7 o más días para la formación de colonias viables en medio Loewenstein-Jensen). La formación de pigmentos carotenoides es una propiedad que aunado a la velocidad de crecimiento ha sido útil para su clasificación (Tabla 2) [2, 3, 32].

Tabla 2. Clasificación de Runyon para las micobacterias [32].

Grupo I	Micobacterias de lento crecimiento. Fotocromógenos: producen pigmento en presencia de la luz. Ejemplo: <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i> y <i>M. szulgai</i> .
Grupo II	Micobacterias de lento crecimiento. Escotocromógenos: producen pigmento en presencia o ausencia de la luz. Ejemplo: <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. aurum</i> y <i>M. flavescens</i> .
Grupo III	Micobacterias de lento crecimiento. No fotocromógenos: no producen pigmento. Ejemplo: <i>M. avium</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. intracellulare</i> y <i>M. celatum</i> .
Grupo IV	Micobacterias de rápido crecimiento. Carecen de pigmentación. Ejemplo: <i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. smegmatis</i> y <i>M. mucogenicum</i> .

Recientemente en los años 1990s la clasificación de las MNT se enfoca en las características genotípicas con la información obtenida a partir del análisis del gen que codifica para el RNA 16S (*rrs*). Este gene de aproximadamente 1,500 nucleótidos, contiene dos secuencias muy variables conocidas como región A y

región B, que son responsables de la variedad especie específica [33]. Además del 16S otros genes como GroEL, que codifica para la proteína de choque térmico *hsp65* y la región intergénica entre el 16S y 23S se han utilizado para la identificación de micobacterias [34]. Debido a la alta discriminación de las técnicas genotípicas, el número de especies de MNT se incrementó durante la década pasada, con el reconocimiento de especies nuevas o taxonómicamente reclasificadas que causan enfermedad en el humano.

I.2.3 Agrupaciones de riesgo para causar infección en el humano.

En cuanto al riesgo que representan para causar infección en el humano, a las micobacterias se les ha otorgado una categorización de acuerdo al riesgo de infección para el individuo y su comunidad, la frecuencia con la que causan enfermedad en adultos sanos, por ser patógenos oportunistas o estrictos y la gravedad de la infección, la cual en algunas ocasiones es fatal [2] (Tabla 3):

El grupo de riesgo I. Presenta bajo riesgo de infección para el individuo y su comunidad. Las enfermedades ocasionadas son raramente o nunca descritas en adultos sanos. Las especies son clasificadas generalmente como no patógenas.

El grupo de riesgo II. Conlleva un moderado riesgo de infección para el individuo y su comunidad. Las especies involucradas se consideran patógenos potenciales u oportunistas.

El grupo de riesgo III. Hay riesgo de transmisión por vía aérea; la enfermedad después de la infección es severa y en ocasiones fatal. El riesgo para el individuo es alto pero moderado para la comunidad. Las especies generalmente se agrupan como patógenos estrictos.

El grupo de riesgo IV. Finalmente este grupo presenta un alto riesgo de infección y con frecuencia fatal; riesgo alto para la comunidad. (No hay especies de micobacterias incluidas en este grupo). Ejemplo el virus del ébola.

Tabla 3. Grupos de riesgo para causar infección en el humano por parte de las micobacterias.

Grupo de riesgo I			
<i>M. agri</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lepraemurium</i>
<i>M. aichiense</i>	<i>M. madagascariense</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. moriokaense</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. obuense</i>
<i>M. aurum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. phlei</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. poriferae</i>	<i>M. pulveris</i>
<i>M. branderi</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. senegalense</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. brumae</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. sphagni</i>	<i>M. tokaiense</i>
<i>M. chitae</i>	<i>M. thermoresistibile</i>	<i>M. triplex</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. chlorophenolicum</i>	<i>M. vaccae.</i>	<i>M. chubuense</i>	<i>M. confluentis</i>
<i>M. cookii</i>	<i>M. conspicuum</i>	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. duvalii</i>
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. hassiacum</i>
<i>M. flavescens</i>	<i>M. hiberniae</i>	<i>M. hodleri</i>	<i>M. interjectum</i>
<i>M. gadium</i>	<i>M. gastris</i>	<i>M. gilvum</i>	
Grupo de riesgo II			
<i>M. abscessus</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. shimoidei</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. xenopi</i>
<i>M. chelonae,</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. malmoense</i>
Grupo de riesgo III			
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. leprae</i>
<i>M. bovis</i>			

Agrupaciones de riesgo para las micobacterias. Las MNT se ubican en los grupos de riesgo I y II. *M. avium* se ubica dentro del grupo de riesgo II, el cual está formado por micobacterias potencialmente patógenas en el hombre o los animales [2].

I.3 IMPORTANCIA CLÍNICA DE LAS MNT

Algunas MNT tienen la capacidad bajo ciertas circunstancias de producir enfermedad, incluso en sujetos inmunocompetentes [32]. A pesar de que en las últimas dos décadas y media la infección por MNT ha tomado importancia, debido en parte a la enfermedad del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida humana (SIDA), estos microorganismos se describieron muchos años atrás, en 1950s cuando la prevalencia de tuberculosis disminuyó después de la introducción de la terapia antimicobacteriana como lo fue la estreptomycinina en 1944 [33]. Desde entonces se han descrito enfermedades ocasionadas por MNT agrupadas principalmente en cuatro patologías: linfadenitis, enfermedad cutánea y en tejido blando, enfermedad diseminada y enfermedad pulmonar. Todas ellas presentan un constante incremento. (Tabla 4) [36].

Linfadenitis. Es una infección de los ganglios linfáticos submandibulares, submaxilares, cervicales o preauriculares. Se presenta comúnmente en niños entre 1 a 5 años de edad. Las especies a la que más se le atribuyen estos casos son *M. scrofulaceum*, además de *M. avium* y *M. intracellulare* [30, 37].

Enfermedad cutánea y en tejido blando. *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae* infectan la piel y el tejido subcutáneo y forman abscesos en la piel herida así como lesiones en las vainas de los tendones y en las articulaciones. *M. marinum* se encuentra constantemente en granulomas en codos, rodillas, pies y manos [38]. *M. ulcerans* ocasiona una patología conocida como úlcera de Buruli, que es la tercera micobacteriosis en significancia. Se

caracteriza por heridas necróticas en niños y en adultos jóvenes que progresan hasta causar deformaciones severas.

Tabla 4. Principales patologías por MNT.

ENFERMEDAD CLÍNICA	AGENTE ETIOLÓGICO COMÚN
Linfadenitis	1. Complejo <i>M. avium</i> 2. <i>M. srcofulaceum</i> 3. <i>M. malmoense</i>
Enfermedad cutánea y en tejido blando	1. <i>M. marinum</i> 2. <i>M. fortuitum</i> 3. <i>M. chelonae</i> 4. <i>M. abscessus</i> 5. <i>M. ulcerans</i>
Enfermedad diseminada	1. Complejo <i>M. avium</i> 2. <i>M. kansasii</i> 3. <i>M. chelonae</i> 4. <i>M. haemophilum</i>
Enfermedad pulmonar	1. Complejo <i>M. avium</i> 2. <i>M. kansasii</i> 3. <i>M. abscessus</i> 4. <i>M. xenopi</i> 5. <i>M. malmoense</i>



Principales patologías por MNT y ejemplos de sitios de infección: A) infección en los ganglios linfáticos submandibulares; B) lesiones en piel; C) lesiones en hueso; D) representación esquemática de la enfermedad diseminada y E) lesiones en pulmón, debida a infección pulmonar por *M. avium*. Sobresale la enfermedad pulmonar por ser la patología más común producto de MNT, dentro de la cual los integrantes del CMA representan a las especies más frecuentes en aislados clínicos.

Enfermedad diseminada. Esta modalidad se presenta en adultos con SIDA y en individuos susceptibles por la terapia con inmunosupresores posterior a trasplantes de corazón y de riñón por el uso crónico de corticosteroides y leucemia. *M. avium* se localiza a nivel sistémico y en algunos sujetos se ha encontrado incluso en las heces [37].

Enfermedad pulmonar. Es la manifestación clínica más común causada por MNT (Figura 7), y las responsables son principalmente especies pertenecientes al Complejo *M. avium*. Los pacientes generalmente son adultos varones de 60 años o más que cuentan con uno o más factores de riesgo como tabaquismo, bronquiectasis, fibrosis quística y un sistema inmunológico debilitado [19]. En las mujeres la enfermedad se presenta en no fumadoras y *M. intracellulare* es la principal especie asociada. *M. abscessus* ocasiona el 80% de enfermedad pulmonar por MNT de rápido crecimiento y se le considera oportunista en la fibrosis quística pulmonar. Otras especies de importancia, cuya distribución es variable son: *M. fortuitum*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. celatum*, *M. asiaticum* y *M. chelonae* [32, 39].

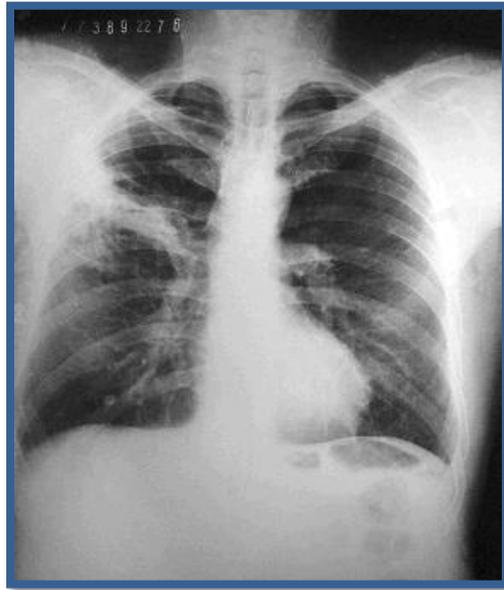


Figura 7. Radiografía frontal de un paciente con enfermedad pulmonar debida a un integrante del complejo *Mycobacterium avium*. Tomado de Piersimoni, 2008 [33].

I.3.1 Complejo *Mycobacterium avium* (CMA)

Los miembros del complejo *Mycobacterium avium* son de crecimiento lento y no pigmentados. En CMA incluye ocho especies, *M. chimaera* [40], *M. colombiense* [41], *M. marseillense* [42], *M. timonense* [42], *M. bouchedurhonense* [42], *M. vulneris* [43], *M. intracellulare* [44] y *M. avium* [45] la cual esta subdividida a su vez en cuatro subespecies (ssp.): ssp. *avium* [45], ssp. *paratuberculosis* [45], ssp. *silvaticum* [45] y recientemente ssp. *hominissuis* [46] (Figura 8).

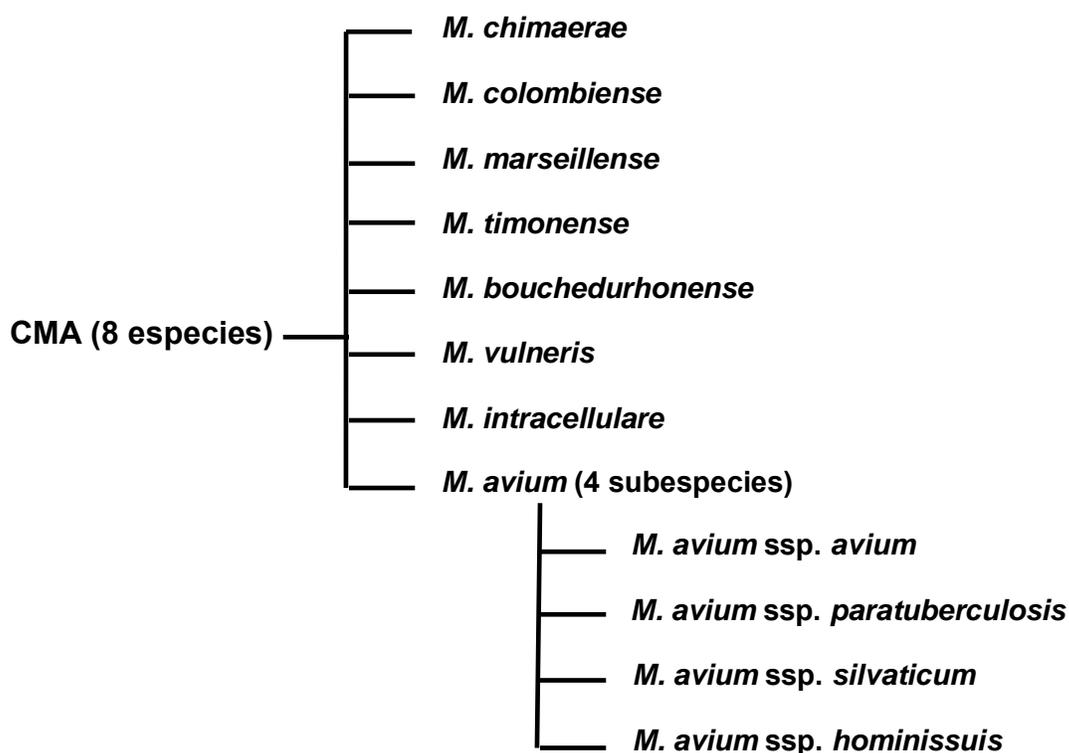


Figura 8. Integrantes del Complejo *M. avium* (CMA).

El CMA se ha sido aislado de muchos biotipos (Tabla 5), como son fuentes de agua (incluso en aguas salobres con más del 2% de salinidad) y suelo con pH bajo, poco oxígeno disuelto y alto contenido de materia orgánica. Con estas

características no es sorprendente que organismos pertenecientes al CMA puedan ser aislados de sistemas de agua potable [29, 47, 48].

Tabla 5. Fuentes ambientales donde se ha aislado a integrantes del CMA [29].

ESPECIES	ORIGEN DEL AISLADO
CMA	Agua y suelo pantanoso
CMA	Fuente de agua residencial
CMA	Sistema de recirculación de agua caliente en Hospitales
CMA	Piscinas públicas y bañeras de hidromasaje
CMA	Fuentes de agua potable
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	Dípteros
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	<i>Blatta orientalis</i>
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	Lombrices de tierra
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	Agua de río
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	Larvas de Tricostrongilidos
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	Dípteros
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	Larva de nematodos
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	Lombrices de tierra
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	<i>Blatta orientalis</i>
<i>M. avium</i> ssp. <i>Paratuberculosis</i>	Leche

La transmisión de las especies pertenecientes al CMA y en general de las MNT se da principalmente por la inhalación de aerosoles o por inoculación. La presentación clínica, en general, de las MNT y en particular de *M. avium* es indistinguible de la tuberculosis. Los síntomas más frecuentemente observados son: tos, producción de esputo, fatiga, pérdida de peso, fiebre, sudores nocturnos y con menor frecuencia hemoptisis [33]. Adicionalmente, los estudios histológicos por infección causada por MNT son en muchos aspectos morfológicos, indistinguibles de aquellos causados por el CMT. Finalmente, puesto que la

enfermedad pulmonar ocasionada por el CMA es casi siempre progresiva y potencialmente fatal, y debido a que gran parte de los aislados clínicos son resistentes *in vitro* a un amplio intervalo de antibióticos incluidos agentes antimicobacterianos, por lo que un gran número de diferentes antibióticos y sus combinaciones se han usado en muchos ensayos clínicos.

La guía de la Sociedad Americana del Tórax (ATS por sus siglas en inglés) publicada en 2007, recomienda para el tratamiento de enfermedad pulmonar producto del CMA la combinación de un macrólido (claritromicina o azitromicina), etambutol y rifampicina sean administrados tres veces por semana durante 18 meses, hasta que los cultivos de esputo (de los cuales se debe tomar muestra cada mes) sean negativos por al menos un año.

Tabla 6. Comparación de los tratamientos contra la infección pulmonar ocasionada por MNT y por *M. tuberculosis*.

	TRATAMIENTO	DURACIÓN (MESES)
<i>M. avium</i>	Macrolido (claritromicina y azitromicina) junto a etambutol y ciprofloxacino u otra quinolona .	18
<i>M. kansasii</i>	Rifampicina, Isoniacida y etambutol	18
<i>M. malmoense</i>	Rifampicina y etambutol	24
<i>M. szulgai</i>	Rifampicina, Isoniacida, etambutol y estreptomina	18
<i>M. simiae</i>	Claritromicina, moxifloxacina y co-trimoxazol	18
<i>M. celatum</i>	No definido	No definido
<i>M. abscessus</i>	Clartromicina, amicacina, cefoxitina	1
<i>M. tuberculosis</i>	Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol y Estreptomina	18

Los tratamientos en comparación con otras MNT productoras de enfermedad pulmonar e incluso de *M. tuberculosis*, son diferentes ya que presentan diferencia en la susceptibilidad a antibióticos estándar, lo que origina un uso de fármacos, así como las dosis y tiempos diferentes para cada especie (Tabla 6), de ahí la importancia de la detección oportuna del agente etiológico que ocasiona la enfermedad ya que diagnósticos tardíos y resultados falso positivos (cruce con *M. tuberculosis*) conduce a un avance progresivo de la enfermedad o a la iniciación inapropiada de profilaxis antimicrobiana con un alto potencial de efectos tóxicos secundarios [17, 33, 49, 50].

I.4 DIAGNÓSTICO PULMONAR DE *Micobacterium avium*

El diagnóstico de las enfermedades causadas por MNT se incrementó en las últimas dos décadas en Estados Unidos y en Europa debido al desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento microbiológico y de la identificación por pruebas moleculares. En los países en vías de desarrollo, como es el caso de México, la información epidemiológica se conoce poco debido a la carencia del personal especializado para identificar a las especies involucradas en enfermedad pulmonar, entre otras. Además, la notificación de los casos nuevos no es obligatoria ante las autoridades de salud.

La presentación clínica de la enfermedad pulmonar debido a *Mycobacterium avium* es como la tuberculosis y sólo se sospecha de infección debido a MNT en los casos en los cuales el tratamiento inicial antituberculosis no presentó la respuesta deseada [51].

I.4.1 Examen clínico, baciloscopía y cultivo de bacterias

El diagnóstico de manera rutinaria se realiza por examen clínico acompañado con el examen microscópico directo de aislamientos repetidos de la misma bacteria de esputo o lavado broncoalveolar (baciloscopía) y el cultivo de bacterias con el desarrollo de pruebas bioquímicas [52]. El cultivo de muestras requiere la descontaminación de la flora normal y su homogenización antes de su concentración por centrifugación.

La sensibilidad de los frotis de esputo es de 25% si las muestras no se homogenizaron y se concentraron. Si las muestras son tratadas la sensibilidad aumenta a un 50% tanto para MNT como para CMT. Para una detección por microscopio se necesita de al menos 10^4 micobacterias/ml de esputo [36, 52].

La identificación de aislados por características fenotípicas incluye el tiempo de crecimiento, pigmentación de las colonias y pruebas bioquímicas. Para identificar a la mayoría de las micobacterias de relevancia clínica son de utilidad las siguientes pruebas bioquímicas: la producción de niacina, reducción de nitrato, hidrólisis de tween-80, arilsulfatasa, ureasa, reducción de tellurite, sensibilidad al hidrácido tiofeno-2-carboxílico ácido (HTC), catalasa (cuantitativa y cualitativa), crecimiento en agar MaConke y la tolerancia al cloruro de sodio. Esta estrategia es, sin embargo, tardada y no es concluyente para muchos aislados con características variables. El análisis de lípidos de micobacteria por cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se han recomendado como acercamientos alternativos, pero presenta ciertas limitaciones como son costos elevados de la instrumentación y la operación, el cual hace que el equipo no sea accesible para todos los laboratorios, así como la falta de personal altamente calificado que tenga la experiencia necesaria para manejar y llevar a cabo este tipo de pruebas [53].

I.4.2 Prueba de Tuberculina

La prueba de tuberculina (TST por sus siglas en inglés Tuberculin skin test) permanece como una de las pruebas más comúnmente usadas pero carece de suficiente precisión (Figura 9). Está basado en el uso del derivado proteico purificado (PPD) de *M. tuberculosis*, el cual es una mezcla poco definida de antígenos. Este ensayo es la herramienta estándar para el diagnóstico de la TB pulmonar activa, pero está muy lejos de ser el estándar de “oro”. Dificultades en la administración e interpretación de la prueba a menudo conduce a resultados falsos [5, 54].



Figura 9. Realización de la prueba de tuberculina. Tomado de García 2006 [54].

Existe un gran número de razones por las cuales esta prueba puede dar resultados falsos positivos. La principal es debido a que varias micobacterias comparten antígenos incluidos *M. tuberculosis*, BCG y MNT, lo cual puede provocar reacción cruzada por la vacunación con BCG (Bacille Calmette-Guerin) o por la exposición a MNT (Tabla 7) [55]. El efecto de la vacunación con BCG sobre la prueba puede persistir hasta 15 años después de la vacunación [56, 57].

I.4.3 Pruebas con interferón gamma

Las pruebas con interferón gamma se han desarrollado para reemplazar la prueba TST. La infección por *M. tuberculosis* evoca una fuerte respuesta inmune por células mediadoras de tipo Th 1 que acumulan la producción de interferón gamma que liberan las células T por lo que es usado como un marcador de esta infección. Estudios *in vitro* de producción de interferón gamma en respuesta a antígenos de micobacteria se han usado para detectar la infección latente por TB. Los antígenos usados para medir la respuesta a interferón gamma definen los diferentes tipos de las pruebas comerciales existentes basadas en el PPD o en antígenos específicos de RD-1 de *M. tuberculosis*, la cual es una región del genoma que codifica los antígenos inmunodominantes, como son el antígeno blanco de secreción temprana de 6 kD (ESAT-6) y la proteína de filtrado de cultivo de 10 kD (CFP-10), que más sin embargo en algunas MNT se encuentra presente (Tabla 7). Tres pruebas comerciales se han desarrollado, la prueba de QuantiFERON-TB, la prueba de T SPOT-TB y la prueba de Quantiferon Gold [58-60].

Las pruebas de interferón gamma son muy caras y requieren de un laboratorio básico. Hay gran heterogeneidad en las pruebas de interferón gamma con respecto a los antígenos, el tipo y la fuente de los antígenos, puntos de corte utilizados y el periodo de incubación de las muestras. Hay varias cuestiones técnicas, que incluyen la extracción, almacenamiento, transporte y el tiempo desde la toma de muestra hasta la incubación. La reproducibilidad de los resultados de

las pruebas de interferón gamma en el tiempo en una misma persona es en gran parte desconocido. La variabilidad entre laboratorios también está poco estudiada [59, 60].

Tabla 7. Pruebas para la detección de la tuberculosis [61].

	Prueba de Tuberculina	Ensayo de interferón gamma basado sobre el PPD	Ensayo de interferón gamma basado en antígenos específicos de RD1
Uso en pacientes vacunados con BCG	Falso positivo debido a la vacunación con BCG.	Menor probabilidad de falsos positivos debido a la vacuna BCG.	Potencialmente menos falsos positivos debido a la vacunación por BCG.
Efectos por MNT	Falsos positivos debido a la exposición a MNT.	Discrimina entre <i>M. avium</i> y <i>M. tuberculosis</i> sin embargo no otras MNT.	Discrimina entre muchas MNT. Sin embargo cruza con <i>M. kansasii</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. gastrii</i> y <i>M. flavescens</i> .

I.5 PROTEÓMICA

La proteómica se define como la genómica funcional a nivel de proteínas. Es la ciencia que estudia las proteínas que expresa una célula en un momento o condición dada. Cuando se cuenta con la información del genoma del organismo de estudio, se puede correlacionar la proteómica con sus genes. La proteómica intenta resolver preguntas como: ¿Qué función tienen las proteínas?, ¿Qué tipo de modificaciones postransduccionales sufren las proteínas y cuál es su función?, ¿Cómo varía el proteoma de una célula en distintas condiciones fisiológicas, patológicas o ambientales? Entre muchas otras [62].

El estudio y comparación sistemáticos del proteoma en diferentes situaciones metabólicas y/o patológicas permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estadios fisiológicos. En el caso concreto del análisis proteómico asociado a patologías concretas, es posible identificar proteínas que permitirían diagnosticar la enfermedad o pronosticar la evolución de la misma. Dichas proteínas se conocen con el nombre genérico de biomarcadores.

La proteómica es una ciencia relativamente reciente. La accesibilidad a cientos de secuencias de genomas de bacterias ha cambiado el camino para estudiar el mundo de las bacterias, incluyendo bacterias patógenas como *M. tuberculosis*, cepas vacunales como lo fue en el trabajo realizado dentro del grupo de trabajo de la Dra. López Vida [63], en el cual se investigaron las diferencias

fenotípicas entre vacunas de BCG a nivel proteómico e incluso en algunas MNT como *M. avium*, lo cual aunado a la consolidación definitiva de la espectrometría de masas como técnica aplicada al análisis de moléculas biológicas y el crecimiento exponencial en el número de secuencias correspondientes a genes y/o proteínas en las bases de datos (bioinformática) ha permitido que la proteómica sea una herramienta de estudio y de análisis masivo de proteínas [62-66].

Los estudios clásicos de proteomas envuelven la práctica de electroforesis en dos dimensiones (2D), la cual combina la separación de las proteínas por su punto isoeléctrico (isoelectroenfoque) y su masa molecular, a través de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tiene la capacidad de resolver hasta 10,000 especies de proteínas en geles de gran formato [67]. Estos geles de 2D complementados con ensayos como el inmuno blot han permitido la identificación de proteínas antigénicas con potencial diagnóstico o para el desarrollo de nuevas vacunas [68], como se ha demostrado en diferentes estudios como el realizado por Cho Donghee en el caso de la infección de bovinos por *M. avium* subespecie *paratuberculosis*, agente causal de la enfermedad de Johne's, la cual es una enteropatía granulomatosa crónica. En ese estudio la aplicación de la proteómica e inmuno blot permitió la identificación de 14 proteínas como fuertes candidatas para su uso como antígenos para el desarrollo de serodiagnósticos [69].

En el presente trabajo se aplicaron estas herramientas para identificar proteínas específicas de *M. avium*, especie potencialmente patógena de enfermedad pulmonar. La cepa utilizada se aisló de agua para uso de riego en los canales de Xochimilco, lugar situado al sur de la ciudad de México. La comparación se realizó contra *M. bovis* BCG México, la cual es una cepa vacunal y que forma parte del CMT.

II. JUSTIFICACIÓN

Debido a que dentro de las MNT, *M. avium* es una de las especies que causa enfermedad pulmonar con mayor frecuencia y con síntomas indistinguibles a la tuberculosis, la identificación de proteínas antigénicas específicas que permitan diferenciar a *M. avium* del agente causal de la tuberculosis y evite reacción cruzada con la vacuna BCG, será un elemento esencial para el desarrollo de una herramienta diagnóstica especie-específica.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Identificación de proteínas antigénicas específicas de *M. avium* a partir de la comparación de inmunoproteomas entre la cepa *M. avium* M7 y *M. bovis* BCG México.

Objetivos particulares:

- Titulación y selección de sueros de sujetos con tuberculosis pulmonar activa, micobacteriosis por MNT, PPD+ y PPD- para su uso en la búsqueda de proteínas antigénicas.
- Identificación de proteínas antigénicas únicas y comunes entre los sueros utilizados y entre las cepas *M. avium* M7 y *M. bovis* BCG México cepa vacunal e integrante del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

IV. METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos se llevó a cabo la siguiente metodología, la cual se dividió en seis etapas (Figura 10).

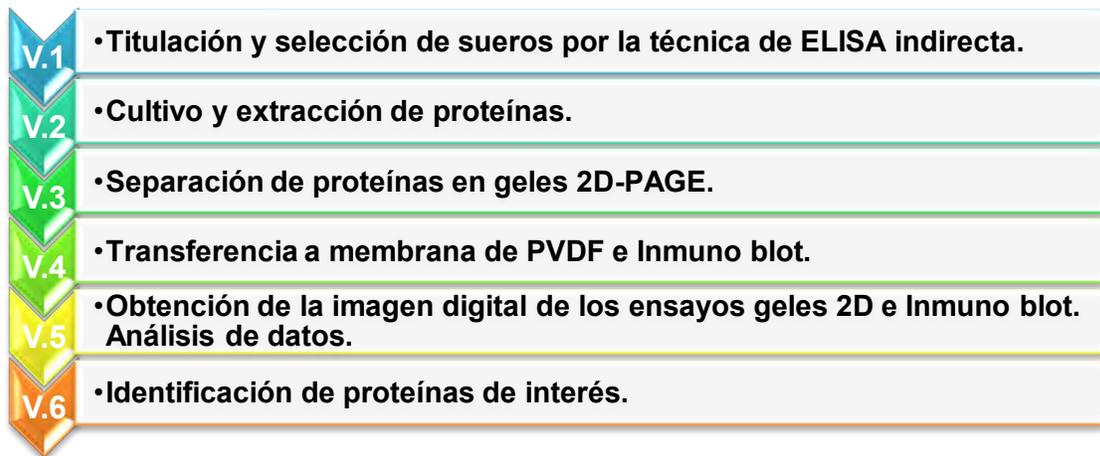


Figura 10. Etapas generales de la metodología.

En la primera etapa se realizó la titulación de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA indirecta de 52 sueros, ubicados en cuatro categorías: 12 sueros de sujetos con TB pulmonar activa, 11 sueros de sujetos con micobacteriosis, 19 sueros de sujetos PPD+ y 10 sueros de sujetos PPD-. La titulación de sueros se llevo a cabo contra 16 cepas de micobacterias ubicadas en tres grupos: 4 cepas de *M. tuberculosis*, 5 cepas de *M. bovis* BCG y 7 cepas de MNT. A partir de la titulación se seleccionó un suero de cada grupo. El criterio de selección fue el siguiente; se seleccionó aquel suero de cada grupo que presentara reactividad cruzada al mayor número de cepas y que entre este reconocimiento estuvieran presentes *M. avium* M7 y *M. bovis* BCG México, las cepas de estudio. Para el

caso del suero de MNT se seleccionó aquel que presentara las características mencionadas previamente, así como que el agente etiológico de la enfermedad fuera *M. avium*. Estos sueros se utilizaron para realizar los ensayos de Inmunoblot.

En la segunda etapa se llevo a cabo el cultivo de las cepas *M. avium* M7 y *M. bovis* BCG México, así como la extracción de proteínas a partir del lisado celular por sonicación y cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

En la tercera y cuarta etapa se realizaron los geles de dos dimensiones de las cepas previamente mencionadas así como la transferencia de uno de los geles a una membrana de PVDF en la cual se realizó el ensayo de Inmuno blot para cada suero previamente seleccionado.

La quinta etapa incluyó la obtención de las imágenes digitales de los ensayos realizados tanto de los geles de dos dimensiones como de los revelados de Inmuno blot para cada suero. Se construyeron los inmunoproteomas para *M. avium* M7 y para *M. bovis* BCG México. A partir del inmunoproteoma de *M. avium* M7, se seleccionaron las proteínas que resultaron antigénicas al suero del sujeto con enfermedad pulmonar por MNT. Estas proteínas antigénicas no presentaron reactividad a ningún otro suero utilizado y no se encontraron en el inmunoproteoma de *M. bovis* BCG México.

Finalmente en la sexta etapa a partir de los análisis previos se obtuvo la identidad de las proteínas de interés a partir de su análisis por espectrometría de masas y su búsqueda en la base de datos Mascot dirigida al CMA. Estas etapas de la metodología se describen con más detalle en el texto.

IV.1 TITULACIÓN DE SUEROS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ELISA

IV.1.1 Sueros humanos

Para la titulación de los sueros con la técnica de ELISA indirecta, se utilizó un panel de 52 sueros, clasificados en 4 grupos: 12 pertenecientes a sujetos con tuberculosis pulmonar activa (TB), 11 pertenecientes a sujetos con enfermedad producto de micobacterias no tuberculosas (MNT), 19 pertenecientes a sujetos con (PPD+) y 10 pertenecientes a sujetos con la prueba cutánea al derivado proteico puro negativo (PPD-) (Tabla 8).

Tabla 8. Clasificación de las muestras de sueros.

	Pacientes con tuberculosis pulmonar activa	Pacientes con MNT	Pacientes PPD+	Pacientes PPD-
Número de muestras	12	11	19	10
Total	52 muestras séricas			

IV.1.2 Cepas de micobacterias

A partir del cepario del Programa de Inmunología Molecular Microbiana, se utilizaron 16 cepas de micobacterias clasificados dentro de 3 grupos: 4 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis* H7Rv, *M. tuberculosis* Manila, *M. tuberculosis* Fam T y *M. tuberculosis* Beijing), 5 cepas pertenecientes a las vacunas BCG (BCG Tice, BCG Japón, BCG Danesa 1173, BCG México y BCG Phipps) y 7 cepas pertenecientes a las MNT, de las cuales 6 pertenecen a aislamientos ambientales (*M. noncromogenicum* tipo I, *M. noncromogenicum* tipo

II, *M. peregrinum*, *M. abscessus*, *M. gordonae* y *M. avium*) y 1 aislamiento clínico (*M. avium*) (Tabla 9).

Tabla 9. Cepas de Micobacterias.

<i>M. tuberculosis</i>	BCG	MNT
n=4	n=5	n=7
		* <i>M. noncromogenicum</i> tipo I
H37Rv	Tice	* <i>M. noncromogenicum</i> tipo II
Manila	Japón	* <i>M. peregrinum</i>
Fam T	Danesa 1173	* <i>M. abscessus</i>
Beijing	México	* <i>M. avium</i>
	Phipps	* <i>M. gordonae</i>
		** <i>M. avium</i>

*aislado ambiental
 **aislado clínico

Los pasos de titulación de sueros, cultivo de cepas y extracción de proteínas de las cepas de micobacterias trabajadas en este estudio se realizaron en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana, el cual es un laboratorio de bioseguridad tipo II y bajo las medidas de seguridad pertinentes como son: un entrenamiento específico en el manejo de agentes patógenos, restricción al laboratorio cuando se estuvo realizando algún trabajo y cuando se realizaron ciertos procedimientos de riesgo como son la formación de aerosoles se llevaron a cabo en campana de flujo laminar de seguridad tipo II.

IV.1.3 Tratamiento de las cepas

Para trabajar con las cepas de micobacterias utilizadas en la titulación de los sueros, fueron tratadas con glutaraldehído al 4% como agente bactericida para inactivarlas, durante toda la noche a 4° C. Adicionalmente las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* ya habían sido inactivadas por radiación gamma, pero aún así recibieron el tratamiento con glutaraldehído al 4% para que todas las cepas presentaran las mismas condiciones.

Las muestras se centrifugaron a 14, 000 rpm durante 10 min y se lavaron 2 veces con solución salina isotónica al 0.9% (SSI) por 10 min. Finalmente cada muestra se resuspendió en solución amortiguadora de bicarbonatos, pH 9.6. Las muestras de cada cepa se colocaron en tubos de vidrio con tapa de rosca y se conservaron a 4°C hasta su uso.

IV.1.4 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

A partir de cultivos bacterianos en fase exponencial (alrededor de 20 días) a una DO = 0.6 a 0.8 (absorbancia 600 nm) en espectrofotómetro para microplaca (TECAN Genius Plus), se cuantificaron las proteínas totales por el método de Bradford. Este método se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 a las proteínas, las cuales forman un complejo proteína-colorante [70]. Para las 16 cepas de micobacterias, se construyó una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA 1mg/mL) en concentraciones de 1-5 mg de BSA y de 5-10 mg de BSA. De cada cepa se realizaron 2 diluciones en agua destilada (H₂O_d) 1:25 y 1:10. Se obtuvo el promedio de ambas lecturas y se calcularon las

concentraciones finales en $\mu\text{g/mL}$. Se ajustó la concentración de proteínas a $0.1 \mu\text{g/mL}$ para sensibilizar las placas de ELISA.

IV.1.5 Calibración de la técnica de ELISA indirecta

La prueba de ELISA indirecta (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) [71, 72] se realizó en placas de poliestireno blanco para luminiscencia de alta unión de 96 pozos con fondo plano (Costar). El sistema se calibró de acuerdo a las recomendaciones del fabricante tanto para los conjugados como para los sustratos. El Anti IgG2 humano unido a AP (Alkaline Phosphatase) (Zymed, Invitrogen) se usó 1:500. El sustrato quimioluminiscente para AP (Millipore) se usó 1:10.

Cada antígeno se adsorbió a la placa de ELISA a una concentración de $0.1 \mu\text{g/mL}$, se incubaron durante la noche a 4°C . El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con PBS-leche descremada al 5% y los lavados con PBS-TWEEN 20 al 0.05% usando el lavador de placas (Stat Fax 2600). Los sueros se incubaron en dilución 1:25, 1:125, 1:625 y 1:1125 por duplicado a 37°C durante 1 hora. Los conjugados se incubaron durante 1 hora a 37°C . El sustrato quimioluminiscente se incubó por 5 min y se obtuvo la lectura por luminiscencia en el espectrofotómetro para microplaca (TECAN Genius Plus).

IV. 2 CULTIVOS Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para la realización de los proteomas e inmunoproteomas se realizaron cultivos tanto de *M. avium* M7 así como de *M. bovis* BCG México. De estos cultivos se obtuvieron las proteínas a partir de los lisados celulares por sonicación y se cuantificaron las proteínas de cada cepa para ajustar la concentración proteica para la realización de los geles analíticos.

IV.2.1 Precultivo de las cepas de estudio

Las cepas de *M. avium* y *M. bovis* BCG México se cultivaron en medio Sauton pH 7.2 a partir de un inóculo tomado con asa de un cultivo previo en medio sólido 7H10 (DIFCO Laboratories). La incubación del precultivo se llevó a cabo bajo agitación constante a 150 rpm y a una temperatura de 37° C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6 y se guardaron alícuotas para ser usadas como inóculo para obtener los cultivos, de los cuales se obtuvieron los extractos celulares.

IV.2.2 Cinéticas de crecimiento

Para ambas cepas se determinó su velocidad de crecimiento a partir de alícuotas del precultivo. Se inocularon 100 μ L de cada cepa por duplicado en 250 mL de medio Sauton bajo las mismas condiciones del precultivo descrito previamente. Las lecturas de DO_{600nm} se registraron cada 24 h. Con los datos de las lecturas se construyó la curva de crecimiento graficando la DO_{600nm} en función del tiempo lo cual es un indicativo del incremento en el crecimiento de las micobacterias para de esta forma localizar la fase media logarítmica (el cual representa el punto medio en la cual la velocidad de duplicación es constante).

IV.2.3 Cultivo primario y cosecha

Una vez determinadas las curvas de crecimiento de *M. avium* M7 y *M. bovis* BCG México, se realizó un cultivo primario, inoculando 25 µL del precultivo de cada cepa en 250 mL de medio Sauton bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura que el precultivo. Una vez que los cultivos llegaron a fase media logarítmica, se cosecharon por centrifugación a 5000 x g, a 4° C durante 15 min. El paquete celular se lavó tres veces en H₂O estéril y finalmente se resuspendió para ajustarlo a una concentración de 100 mg de bacterias/mL.

IV.2.4 Obtención de proteínas de extracto celular

Para la preparación del extracto, se tomaron 3 mL de la suspensión obtenida y las células se lisaron con ultrasonido (Ultrasonic Processor, Cole Parmer Corporation). Los pulsos se administraron a 20 kHz y 80% de amplitud de salida con una punta de 7 mm de diámetro a intervalos de un minuto, manteniendo la muestra en hielo y agregando inhibidores de proteasas (PMSF final de 20 mM). Tanto para *M. avium* como BCG México se aplicaron 18 pulsos. Al término, las muestras se centrifugaron por 20 min a 14000 rpm, a 4° C, recuperando el sobrenadante. Éste se etiquetó y se almacenó en alícuotas a -70° C hasta su uso.

IV.2.5 Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford previamente descrito en la etapa de titulación de sueros utilizando BSA como estándar, obteniendo un rendimiento de 0.6 µg/µL. aproximadamente.

IV.3 GELES DE DOS DIMENSIONES (2D-PAGE)

Se realizaron geles de 2D-PAGE de *M. avium* M7 y *M. bovis* BCG México, en los cuales las proteínas se separaron por dos características fisicoquímicas, el punto isoeléctrico y masa molecular [67]. Para cada uno de los cuatro sueros seleccionados en la primera etapa de la metodología, se realizaron dos geles de cada cepa, uno teñido con plata y otro el cual se transfirió a una membrana de PVDF (membrana hidrofóbica de difluoruro de polivinilideno) en la cual se realizó el Inmuno blot. Las proteínas antigénicas encontradas en el Inmuno blot se ubicaron directamente sobre el gel teñido con plata y el cual se realizó simultáneamente y bajo las mismas condiciones que el gel transferido a la membrana de PVDF. A continuación se describen las etapas que comprenden la realización de los geles 2D-PAGE.

IV.3.1 Rehidratación

Para la rehidratación se utilizaron tiras de gradiente de pH inmóvil (ReadyStrip™, IPG strips. Bio-Rad Laboratories) de 11 cm de longitud con un rango de pH de 4-7. La muestra almacenada a -70°C se descongeló gradualmente en hielo. Se emplearon 100 µg de proteínas para la realización de los geles analíticos y 200 µg para los geles preparativos (de los cuales se identificaron las proteínas). Los extractos proteicos se solubilizaron en una solución constituida por CHAPS 4%, 2 M Urea, 2 M Tiourea y DTT 70 mM, anfolinas (Bio-Lyte pH 3-10; Bio-Rad Laboratories) 0.1% y azul de Bromofenol 0.001% dando un volumen final de 180 µL en la mezcla de rehidratación.

Una vez preparada la mezcla se aplicó la totalidad del volumen en el carril de la bandeja de rehidratación (Amersham Biosciences) y se colocó la tira IPG en contacto con la muestra y se dejó hidratando toda la noche hasta cumplir un total de 16 horas aproximadamente para permitir la absorción de las muestras. La tira con la muestra se recubrió con aceite mineral, para evitar que se secan las muestras. Para cada ensayo se usaron 2 tiras, una para teñir el gel con plata y la segunda para realizar la transferencia a la membrana de PVDF para ser posteriormente utilizada en el Inmuno blot.

IV.3.2 Isoelectroenfoque en tiras de IPG (Primera dimensión)

Las proteínas una vez en las tiras de IPG fueron ubicadas dentro de un gradiente de pH de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) para obtener la primera dimensión. Las tiras se colocaron y se alinearon en la cámara Multiphor II (Amersham Biosciences) conectada a cámara de enfriamiento a 17°C y se recubrieron con aceite mineral. Se colocó la tapa de la cámara Multipor II y se conectaron los electrodos del equipo a la fuente de poder (EPS 3501 XL Accesolab). La corrida electroforética se programó de la siguiente manera: 500 V 30 min, 1000 V 30 min, 1500 V 30 min, 2000 V 30 min y finalmente se completó a 2500 V durante aproximadamente 22 horas hasta completar ~52,000 VH.

IV.3.3 Equilibrio y geles de acrilamida (segunda dimensión)

Al término de la electroforesis las tiras de IPG se enjuagaron en H₂O_d y se realizó la primera exposición con DL-ditiotreitol (DTT) en solución amortiguadora de equilibrio durante 15 min en agitación moderada. Al término del primer lavado se realizó una segunda exposición con iodoacetamida (IAA) en solución amortiguadora de equilibrio durante 15 min en agitación moderada.

Cada tira se colocó en un gel de poliacrilamida al 12% de gran formato (16x16 cm), para llevar a cabo la segunda dimensión que separó a las proteínas por masa. Al gel que se utilizó para teñir con plata se le colocó un marcador de masa molecular estándar (MMM) de 10 – 250 kD (Bio-Rad) y al gel para realizar la transferencia y Inmuno blot se le colocó el MMM Dual Color de 10 – 250 kD (Bio-Rad). La segunda dimensión se realizó en la cámara de electroforesis (Hoeffer) incrementando el voltaje gradualmente, 50 V el tiempo necesario para que saliera la muestra de la matriz de agarosa hacia el gel de poliacrilamida (alrededor de 30 min), 100 V durante 2 h, 150 V durante 1 h y 200 V hasta que la muestra llegara a 2 mm del borde inferior del gel.

IV.3.4 Tinción de plata

Al finalizar la electroforesis, los geles se colocaron en una solución de fijación compuesta por etanol al 40% y ácido acético al 10% en H₂O_d a 4°C durante toda la noche. A continuación se lavaron con etanol al 50% y se realizó un pretratamiento con tiosulfato de sodio pentahidratdo (0.2 g/L) durante 1 min; se impregnaron en una solución de nitrato de plata (2g/L) y 0.75 mL de formaldehido

al 37% durante 20 min en agitación constante y oscuridad; se revelaron con carbonato de sodio (60 g/L), tiosulfato de sodio (4 mg/L) y formaldehído al 37% (0.5 mL/L) hasta visualizar los puntos de las proteínas separadas (aproximadamente 10 min) y al final la reacción se detuvo con una solución de ácido acético al 1%.

IV.4 TRANSFERENCIA E INMUNO-BLOT

Para realizar los ensayos de Inmuno blot para cada suero, se realizó la transferencia de uno de los dos geles 2D-PAGE a membranas de PVDF con poro de 0.45 μm (Amersham HybondTM-P, GE Healthcare) mediante electrotransferencia utilizando Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer (Bio-Rad[®]) a una diferencia de potencial constante de 10 volts durante 1 hora. La membrana de PVDF se bloqueó con una solución de TBS/Tween 20 al 0.05% con leche deshidratada al 5% durante toda la noche a 4°C con agitación moderada. Se realizaron 2 lavados de 10 min con TBS-Tween 20 al 0.05% para eliminar el exceso no reactivo y se incubaron con el suero a una dilución 1:100 durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación moderada. Se realizaron 2 lavados TBS-Tween 20 al 0.05% para eliminar el anticuerpo no reactivo y posteriormente se incubó con el conjugado anti IgG2 humana unido a AP (Zymed, Invitrogen) en dilución 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación moderada. Se realizaron 3 lavados para eliminar el conjugado no reactivo y se colocó el sustrato quimioluminiscente para AP durante 5 min. Se colocó en el casete para revelado de películas para evaluar la reactividad de las membranas [73].

IV.5 OBTENCIÓN DE LA IMAGEN DIGITAL Y ANÁLISIS DE LOS GELES BIDIMENSIONALES

Las imágenes de los geles teñidos con plata y de las películas reveladas para cada suero se capturaron en formato digital con un densitómetro (Molecular Imager GS-800TM Calibrated Densitometer. Bio-Rad Laboratories) con ayuda del programa Quantity One™ 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories) a una resolución de 63.5 µm x 63.5 µm.

El análisis de los geles se hizo con el programa PDQuest (PDQuest TM 2-D Analysis Software Version 8.0 Bio-Rad Laboratories). Como criterio de reproducibilidad entre ensayos se comparó el número total de pixeles. Cada imagen y su réplica fueron utilizadas para construir un gel maestro, en el que se incluyeron todos los puntos presentes en los experimentos independientes.

Los geles maestros obtenidos de *M. avium* M7 y *M. bovis* BCG México se compararon entre sí para construir un gel maestro denominado experimento de alto nivel (EAN) (Figura 11) en el cual se ubicaron tanto las proteínas comunes como las únicas para ambas cepas a comparar. Los inmunoproteomas se construyeron a partir de la ubicación de las proteínas antigénicas para cada suero sobre sus correspondientes proteomas. Una vez obtenido los inmunoproteomas para cada cepa, estos se compararon entre sí sobre el gel maestro EAN (Figura 11).

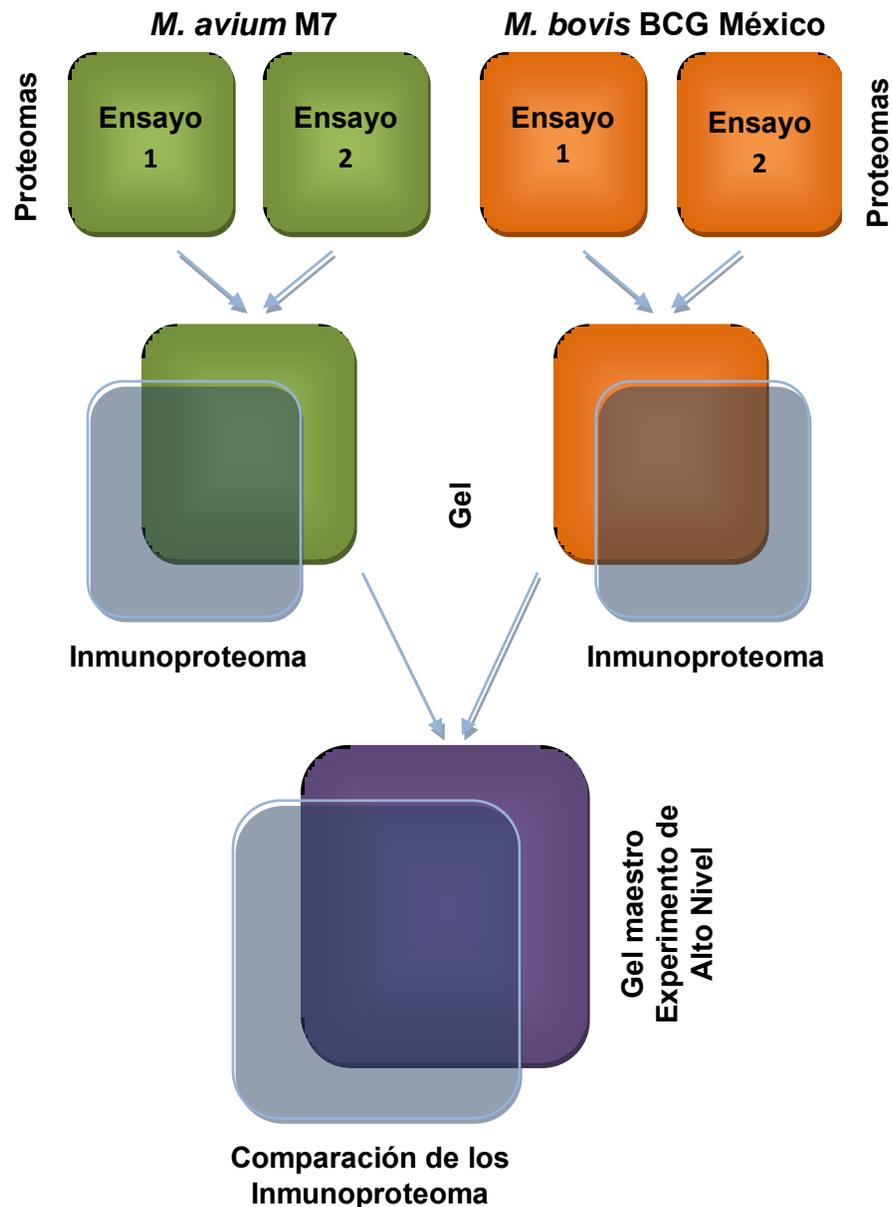


Figura 11. Esquema de la construcción de geles maestros. De cada cepa se obtienen los geles 1 y 2. El gel maestro (imagen sintética) para cada cepa incluye la suma de todos los puntos resueltos en los geles 1 y 2. El gel maestro experimento de alto nivel (EAN) se realiza a partir de la comparación de los geles maestros de cada cepa. A partir de los ensayos de Inmunodetección se ubican las proteínas antigénicas sobre el gel maestro correspondiente, originando los inmunoproteomas. Finalmente los inmunoproteomas se ubican sobre el gel maestro EAN.

IV.6 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE INTERÉS

Para identificar las proteínas de interés se realizaron geles bidimensionales preparativos de las proteínas de extracto celular de *Mycobacterium avium* revelados con la tinción de plata.

El gel teñido se envió para la secuenciación de proteínas de interés al laboratorio de Espectrometría de Masas del Dr Guillermo Mendoza Hernández del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. La secuenciación se llevo a cabo en un espectrómetro de masas híbrido triple cuádruplo-trampa de iones lineal (3 200 Q TRAP Applied Biosystem) [74]. Las proteínas se identificaron a partir de los espectros MS/MS empleando la base de datos Mascot (<http://www.matrixscience.com>) contra el CMA.

IV. 6.1. Búsqueda *in situ* de las proteínas identificadas de *M. avium* en *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG Pasteur.

Una vez identificadas las proteínas de interés de *M. avium* M7, se realizó un alineamiento de las secuencias de las proteínas con ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), este programa se desarrollo en los Institutos Nacionales de Salud del gobierno de EE.UU. y se encuentra de forma gratuita en el servidor del Centro Nacional de Información Biológica (NCBI). Las secuencias de las proteínas identificadas de *M. avium* se compararon de forma general contra las secuencias del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG Pasteur, con el fin de saber si estas proteínas se encuentran presentes. Una vez ubicada la región con mayor identidad a la proteína de interés, se ubico a que

proteína corresponde y posteriormente se realizó un alineamiento múltiple con el uso del programa Clustal X, en el cual se compararon únicamente las secuencias de las proteínas de *M. avium* M7, contra las proteínas correspondientes en *M. tuberculosis* 37R y contra *M. bovis* BCG Pasteur. Finalmente se obtuvo el porcentaje de identidad entre las proteínas.

V. RESULTADOS

V.1. TITULACIÓN DE SUEROS

De cada grupo de sueros (Tabla7), se obtuvieron los títulos a partir de los promedios de luminiscencia obtenidos por la técnica de ELISA indirecta para cada una de las 16 cepas de micobacterias (Tabla 8).

Tabla 10. Intervalos de títulos para los grupos de suero de TB, MNT, PPD+ y PPD-.

Cepa		Intervalo de títulos			
		Suero TB	Suero MNT	Suero PPD+	Suero PPD-
BCG	H37Rv	32 – 321	48 – 1400	<25 – 121	<25 – 200
	Manila	37 - 260	32 - 320	51 – 244	48 - 180
	Fam T	<25 - 180	<25 - 290	<25 - 200	<25 - 102
	Beijing	48 - 320	<25 – 320	<25 - 220	<25 – 72
M. tuberculosis	Tice	<25 – 320	<25 – 120	44 – 320	<25 – 110
	Japón	<25 - 1300	<25 - 330	<25 – 290	<25 - 80
	Pasteur	<25 - 310	<25 - 122	<25 – 122	<25 - 72
	México	27 - 300	<25 - 280	<25 – 120	<25 - 100
	Phipps	<25 – 312	<25 – 300	<25 - 122	<25 – 63
MNT	<i>M. non tipo II</i>	<25 - 302	<25 – 260	32 – 120	<25 – 80
	<i>M. peregrinum</i>	<25 - 120	<25 - 280	49 – 120	<25 - 110
	<i>M. avium</i> (a)	38 - 1200	42 - 300	51 – 120	<25 – 66
	<i>M. abscesus</i>	<25 - 220	22 - 300	30 – 108	<25 - 100
	<i>M. non tipo I</i>	27 - 63	<25 - 270	30 – 78	<25 - 92
	<i>M. gordonae</i>	42 – 120	38 - 300	48 – 121	42 - 63
	<i>M. avium</i>	32 - 120	<25 – 620	<25 - 280	<25 - 128

En negritas se muestran los títulos más altos para cada grupo de sueros.

Los resultados con IgG2 muestran que los intervalos de títulos más altos se encontraron contra los sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa TB (<25 – 1300) y contra los sueros de pacientes con MNT (<25 – 1400). Los intervalos más cerrados se encontraron contra los sueros de PPD+ (<15 – 320) y contra los sueros de PPD- (<25 - 200) (Tabla 10).

V.1.1. Reconocimiento de cepas contra grupos de sueros

El reconocimiento de cepas por cada grupo de sueros TB, MNT, PPD+ y PPD- mostró que entre el 44% y el 50% de las muestras no reconocen ninguna cepa para los tres grupos de micobacterias (TB, BCG y MNT). De este porcentaje, cerca del 80% lo conformaron los sueros de sujetos PPD+ y los sueros de sujetos PPD-.

Cerca del 30% de los sueros sólo reconocen una cepa. Para el caso de los tres grupos de cepas de *M. tuberculosis*, MNT y BCG alrededor del 50% del reconocimiento lo conforman los sueros de individuos con TB y los sueros de individuos con MNT.

Conforme aumenta el número de cepas reconocidas, los sueros principales son los de individuos con TB y los de individuos con MNT, salvo en algunos casos, en donde el reconocimiento de dos cepas de BCG, fue dado en un 40% por los sueros de PPD+ y en el reconocimiento de 3 cepas de *M. tuberculosis* los sueros de PPD+ aportaron más del 50%. La mayoría de los sueros que presentaron

reactividad, se dio entre una y tres cepas. Pocos sueros son los que llegaron a ser reactivos a cuatro cepas (Tabla 11).

Tabla 11. Reactividad de los tipos de sueros contra los grupos de cepas.

A		Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>				
Categorías de suero	0	1	2	3	4	
TB	3	4	4	1	0	
MNT	2	6	2	0	1	
PPD+	12	5	1	2	0	
PPD-	6	3	0	0	0	
Total	23	18	7	3	1	
%	44%	35%	13%	6%	2%	

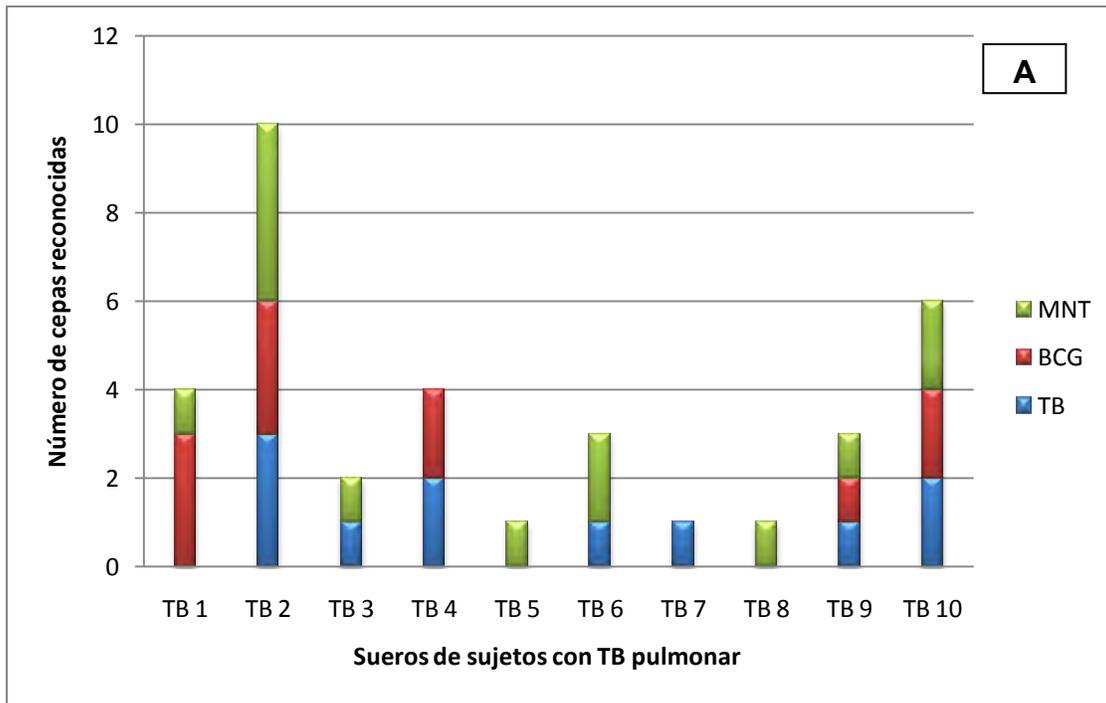
B		Cepas de <i>M. bovis</i> BCG					
Categorías de suero	0	1	2	3	4	5	
TB	7	2	1	2	0	0	
MNT	4	2	4	1	0	0	
PPD+	11	4	4	1	0	0	
PPD-	6	2	1	0	0	0	
Total	28	10	10	4	0	0	
%	52%	20%	20%	8%	0%	0%	

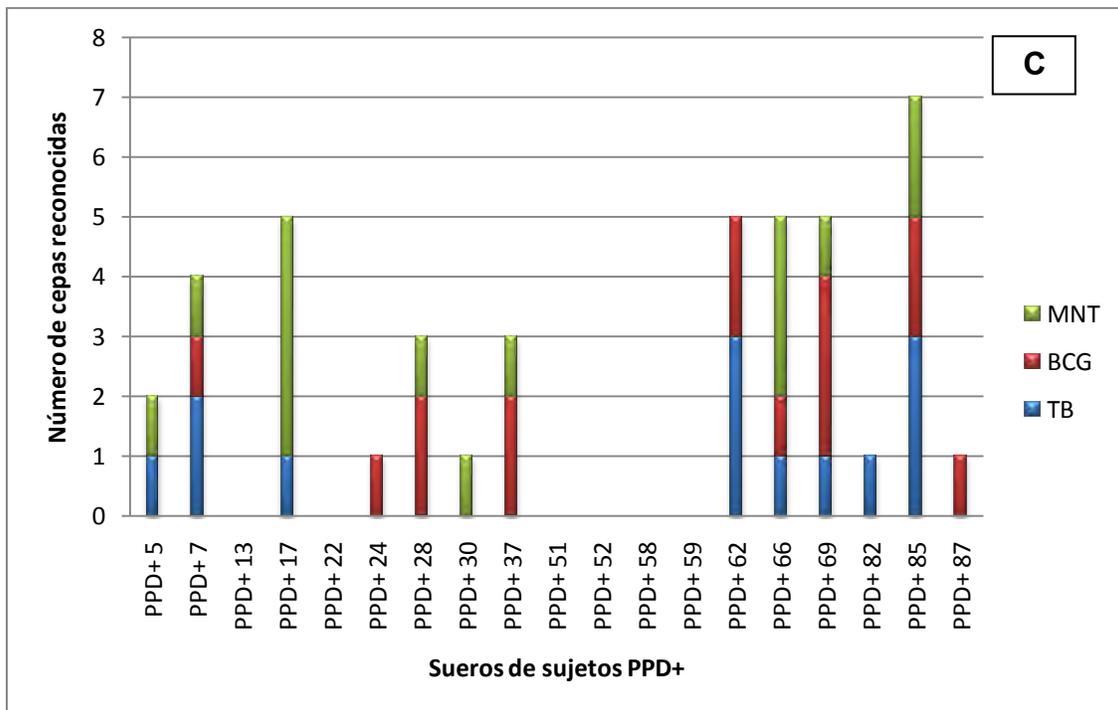
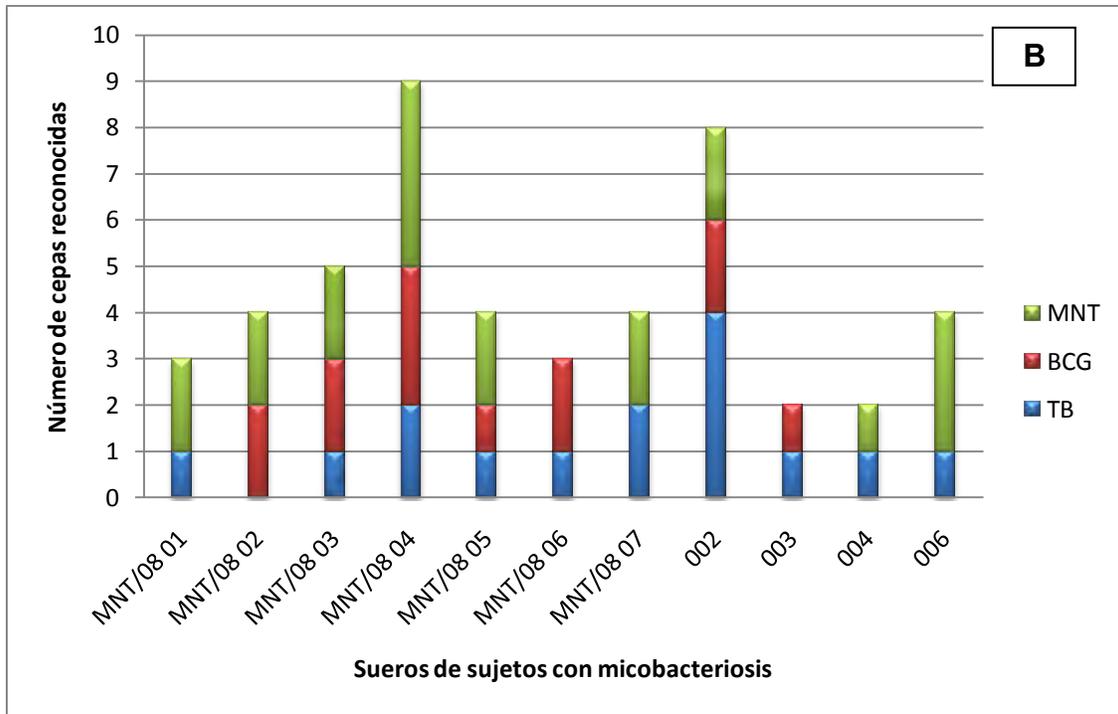
C		Cepas de MNT							
Categorías de suero	0	1	2	3	4	5	6	7	
TB	4	5	2	0	1	0	0	0	
MNT	2	1	6	1	1	0	0	0	
PPD+	11	6	1	1	1	0	0	0	
PPD-	6	3	0	0	0	0	0	0	
Total	23	15	9	2	3	0	0	0	
%	44%	28%	18%	4%	6%	0%	0%	0%	

En A se indican las 4 cepas de *M. tuberculosis*, en B las 5 cepas de *M. bovis* BCG y en C las 7 cepas de MNT. La primer columna muestra las cuatro categorías de sueros.

V.1.2 Selección de sueros para el Inmuno blot

Para realizar los ensayos de Inmuno blot se selecciono aquel suero de cada grupo que presentaran reactividad al mayor número de cepas (Figura 12) y que entre este reconocimiento estuvieran presentes *M. avium* M7 y *M. bovis* BCG México, las cepas de estudio. Para el caso del suero de MNT se seleccionó el que presentara las características mencionadas previamente, así como que el agente etiológico de la enfermedad fuera *M. avium*. La reactividad se determinó por arriba de la línea de corte (título de 100) La línea de corte se obtuvo a partir del promedio de los títulos de PPD- más 2 desviaciones estándar, asumiendo que de origen son sueros sin exposición a antígenos de micobacterias.





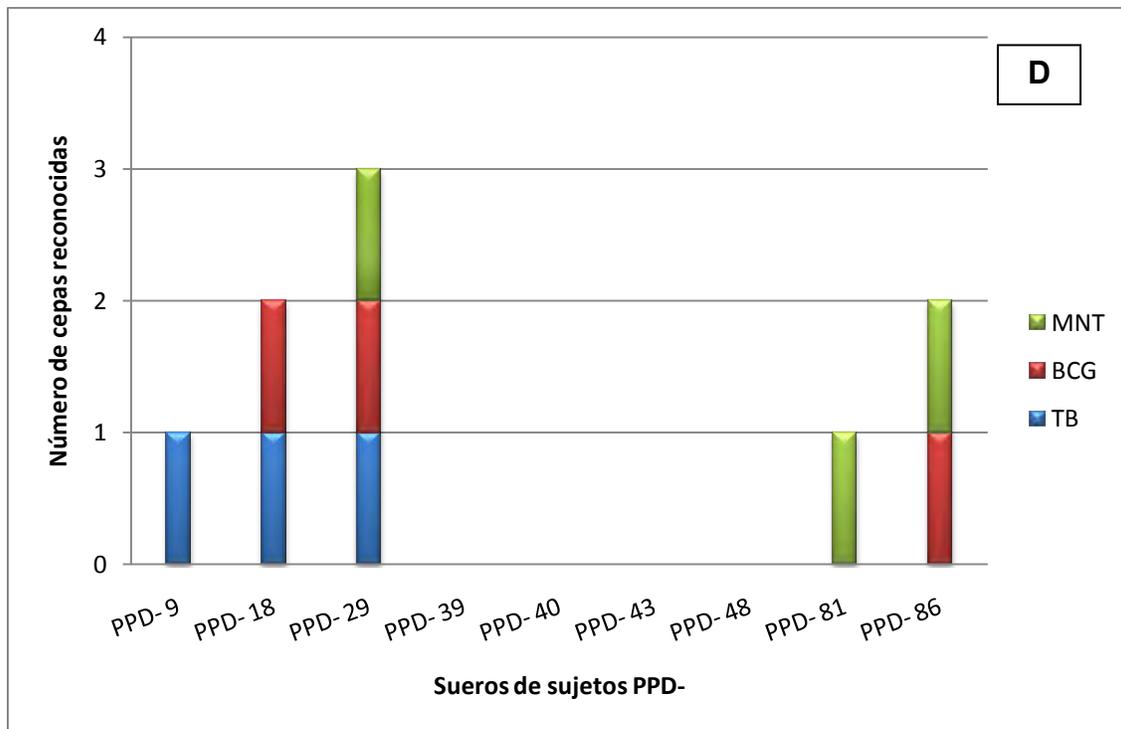


Figura 12. Reactividad de los sueros de TB, MNT, PPD+ y PPD- contra los grupos de cepas. (A-D) En el eje de las “x” se ubican los sueros individuales que integran cada categoría de suero, en el eje de las “Y” se ubica el número de cepas con la que se presento reconocimiento para cada suero. El color de las barras indica el grupo de cepa de micobacteria al cual pertenece: verde para MNT, rojo para BCG y azul para TB.

Los sueros seleccionados para la realización de los Inmuno blot fueron TB2 como suero de sujeto con tuberculosis pulmonar activa, MNT/08 004 como suero de sujeto con enfermedad pulmonar por MNT, PPD+85 y PPD-29 como sueros de sujetos con reacción positiva y negativa a la prueba de Tuberculina respectivamente.

V.2 CURVAS DE CRECIMIENTO

En la Figura 13 se observan las curvas de crecimiento para las cepas de estudio *Mycobacterium avium* M7 y *Mycobacterium bovis* BCG México, las cuales se realizaron a partir del promedio de tres cultivos independientes en medio Sauton para cada cepa. El punto que se utilizó para la cosecha de las bacterias fue la fase media logarítmica a partir de una D.O. de 600 nm, ya que esta fase representa el punto medio en el cual la duplicación de las micobacterias es constante, de esta manera se asegura que la cantidad de proteína obtenida sea la adecuada para los ensayos de 2D-PAGE. La fase media logarítmica alcanzó en el día 20 para *M. avium* M7 una D.O. de 1.5 y para *M. bovis* BCG México al día 18 con una D.O. de 0.8.

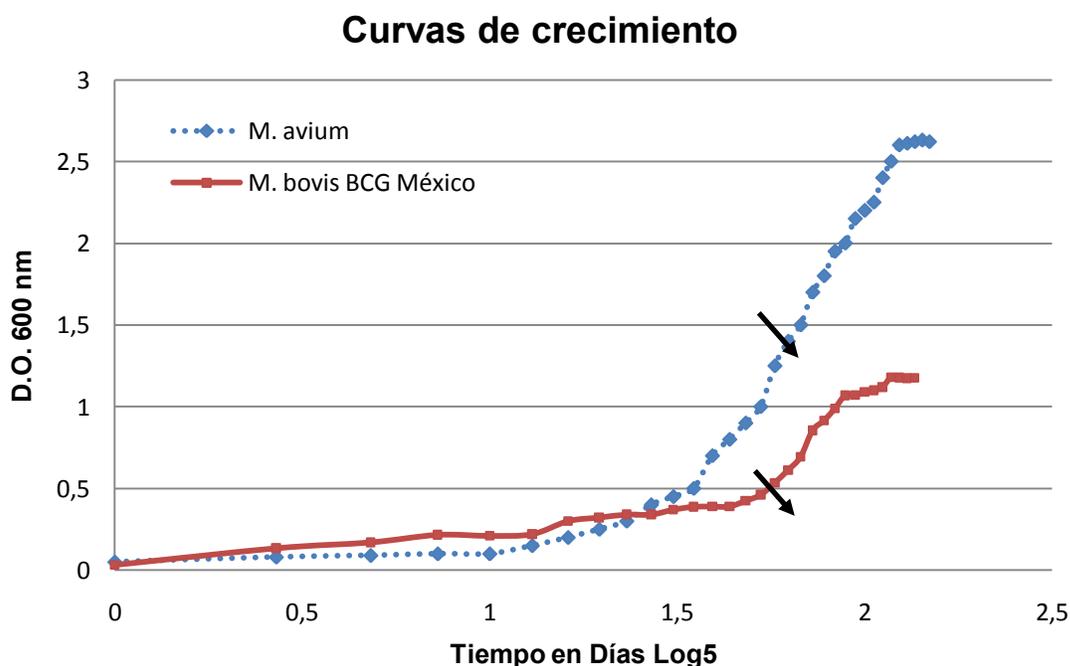


Figura 13. Curvas de crecimiento. Las flechas indican fase media logarítmica para cada cepa. En azul la curva de crecimiento de *M. avium* y en rojo la de *M. bovis* BCG México.

V.3 GELES 2D- PAGE DE *M. avium* M7 Y *M. bovis* BCG MÉXICO

Para la obtención de los geles maestros, se verificó con el programa PDQuest™ que el coeficiente de variación entre las replicas de cada cepa cumpliera con lo establecido por Molloy y colaboradores (2003) [75], el cual no debe ser mayor de 31.2%. En la tabla 12 se muestra el número total de pixeles para el duplicado de cada cepa. De esta forma se verificó que el coeficiente de variación entre las replicas se mantuviera por debajo del límite, lo cual nos permitió demostrar la reproducibilidad inter-ensayo y la validez de la comparación entre los geles derivados de ambas especies de micobacterias.

Tabla 12. Densidad total de pixeles.

Cepa	<i>M. avium</i>	BCG México
Ensayo 1	4,056,370	4,076,244
Ensayo 2	4,166,010	4,047,615
Promedio	4,111,190	4,061,929
Desviación estándar	77,527	20,243
*Coeficiente de variación (%)	1.8	0.4

***Límite permitido <31.2%. El Coeficiente de variación es una medida de dispersión que permite comparar dispersiones, Se obtiene al dividir la desviación estándar entre el promedio por cien.**

El programa PDQuest permitió la ubicación del número total de puntos de los geles 2D-PAGE, los cuales se resolvieron de 500 a 700 puntos para los extractos celulares de las cepas de estudio. Alrededor del 80% de los puntos resueltos se ubicaron entre un intervalo de pH de 4.0 a 6.5 de punto isoeléctrico (primera dimensión) y entre 10 y 100 kDa de masa molecular (segunda dimensión). La Tabla 13 muestra los puntos encontrados para cada duplicado de

cada cepa así como el total construido en el gel maestro (imagen virtual que suma los puntos de los duplicados).

Tabla 13. Cuenta total de puntos en los geles individuales y maestros.

Cepa	Ensayo 1	Ensayo 2	Gel Maestro
<i>M. avium</i>	594	696	869
<i>M. bovis</i> BCG México	668	564	883

Los geles maestros de ambas cepas se compararon entre sí, con el fin de construir el gel maestro experimento de alto nivel (Figura 11) en el cual se consideraron los puntos en común y únicos para cada cepa (Figura 14).

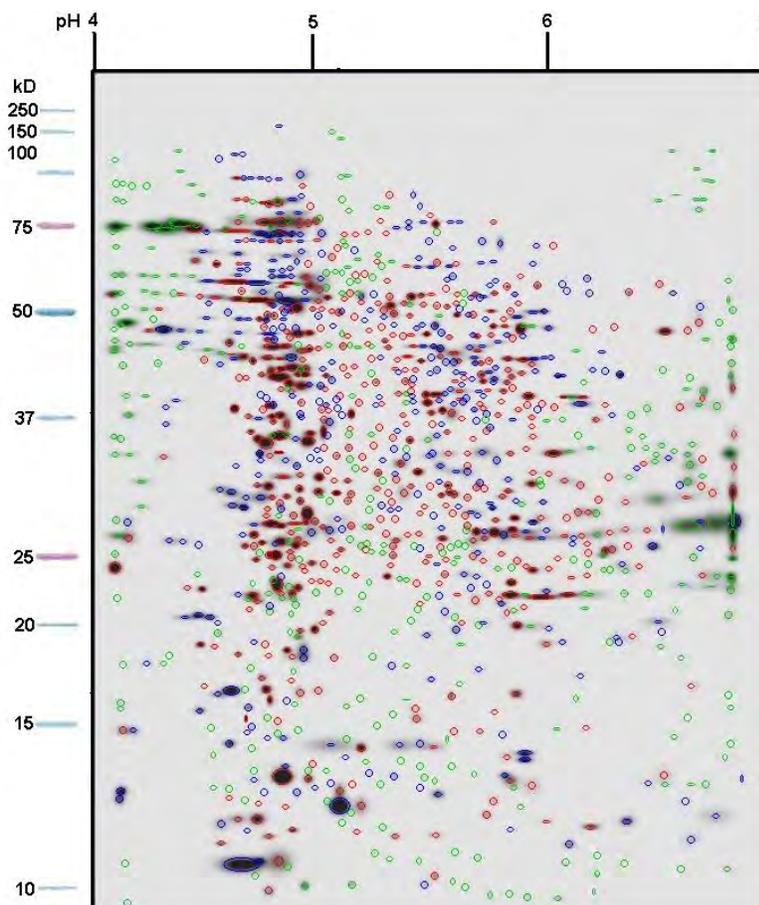


Figura 14. Gel Maestro Experimento de alto nivel. Imagen virtual construida a partir de los geles maestros de *M. avium* y *M. bovis* BCG México. En círculos rojos se ubican las proteínas compartidas, en verde y azul las proteínas únicas para *M. avium* M7 y *M. bovis* BCG México respectivamente.

El número total de puntos encontrados en el gel maestro experimento de alto nivel fue de 1,233 puntos, de los cuales 518 los comparten las dos cepas y el número de puntos únicos fue de 350 para *M. avium* y de 365 para *M. bovis* BCG México (Figura 15).

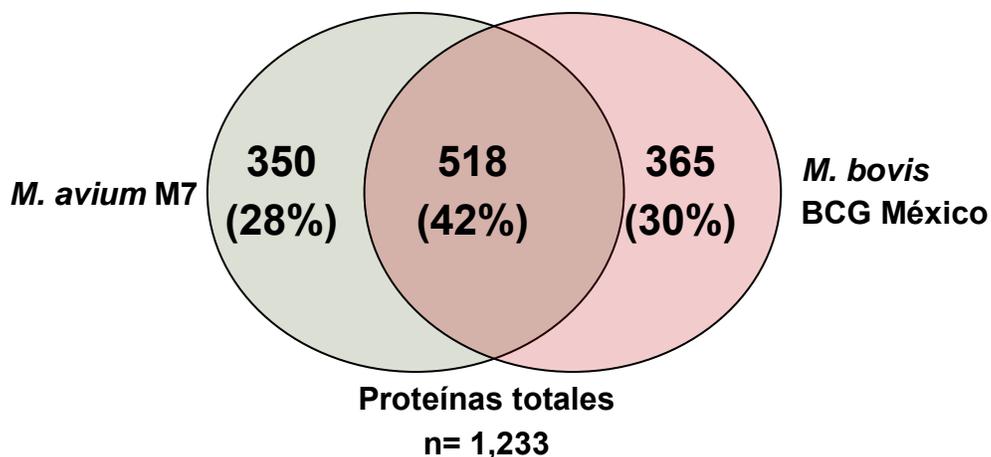


Figura 15. Comparación de los puntos únicos y compartidos entre *M. avium* M7 y *M. bovis* BCG México. Los números dentro de cada conjunto indican el número de puntos ya sean únicos y la intersección de ambos conjuntos indica el número de puntos compartidos. El porcentaje se encuentra ubicado entre paréntesis que se obtuvo con respecto al total de puntos n=1,233.

V.4 INMUNOPROTEOMAS

V.4.1 *Mycobacterium bovis* BCG México

En el inmunoensayo de PVDF de *M. bovis* BCG México contra los sueros seleccionados de sujetos con TB pulmonar activa, micobacteriosis por MNT y PPD+ y PPD-, se encontraron tanto proteínas únicas como comunes entre diferentes sueros. El suero de TB mostró 16 proteínas antigénicas de las cuales 12 resultaron únicas y 4 compartidas; para MNT 7 totales, con 6 únicas y 1 compartida; para PPD+ 14 totales, con 12 únicas y 2 compartidas y para PPD- solamente 2, 1 única y 1 compartida (Figura 16), (Tabla 14).

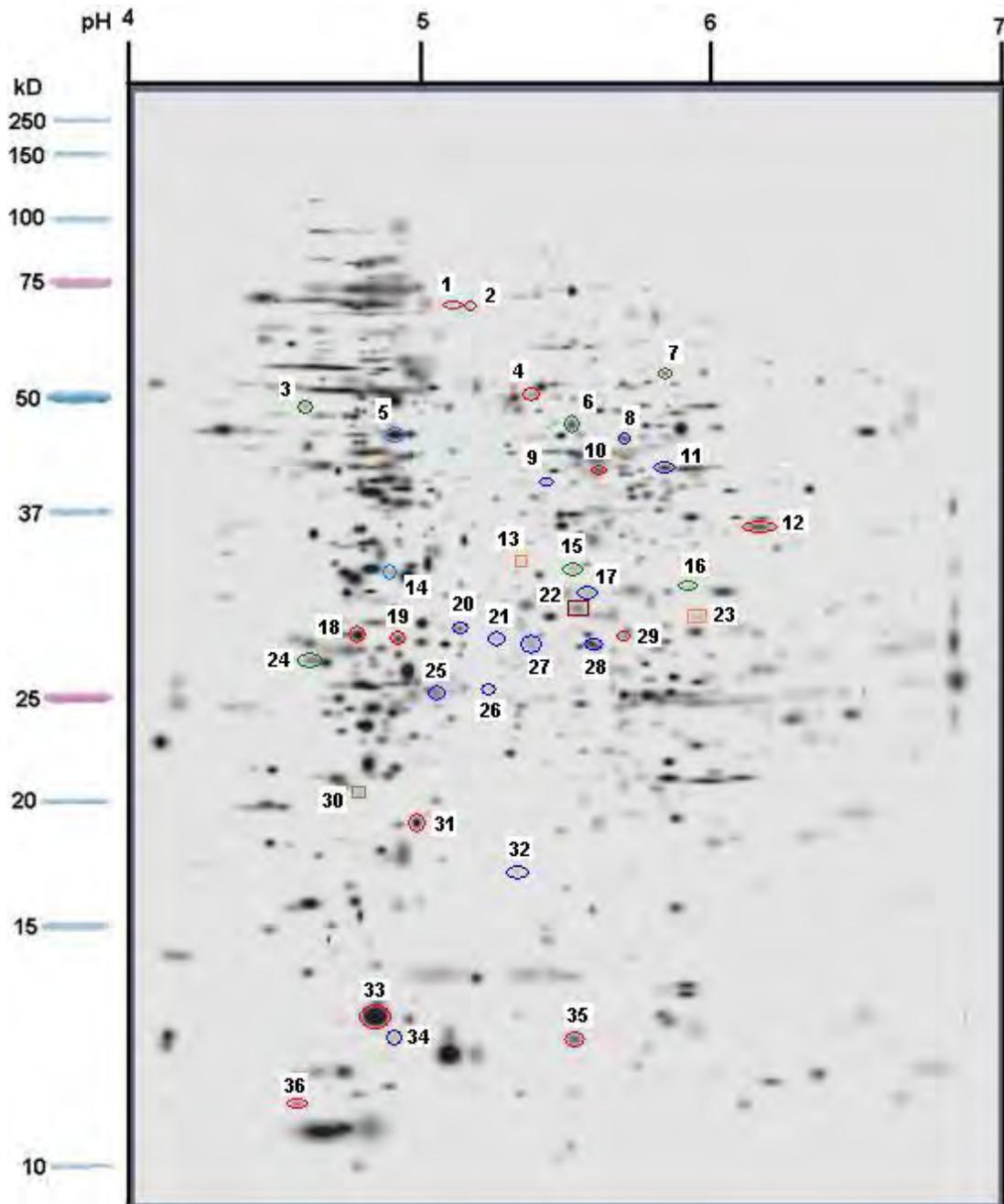


Figura 16. Construcción del inmunoproteoma de *M. bovis* BCG México a partir de la ubicación de las proteínas antigénicas reconocidas por los cuatro tipos de sueros en el Inmuno blot sobre su proteoma. Se ubica el marcador de masa molecular (10-250 kD) y el pH (4-7). Las proteínas únicas se muestran encerradas en círculo y las comunes en un cuadrado, los números indican las proteínas identificadas. Los colores representan los diferentes sueros utilizados: el rojo para el suero de TB, el verde para MNT, el azul oscuro para PPD+ y el azul claro para PPD-. El cuadro rojo marca las compartidas entre los sueros de TB y MNT, el naranja para TB y PPD+ y el verde para TB y PPD-.

**Tabla 14. Proteínas únicas y compartidas de *M. bovis*
BCG México y *M. avium* M7.**

Tipo de suero	<i>M. bovis</i> BCG México			<i>M. avium</i> M7		
	Comunes	Únicas	Total / %	Comunes	Únicas	Total / %
TB	4	12	16 / 40	5	13	18 / 47
MNT	1	6	7 / 18	5	9	14 / 37
PPD+	2	12	14 / 35	1	3	4 / 11
PPD-	1	2	3 / 7	1	1	2 / 5
Total / %	8 / 20	32 / 80	40 / 100	12 / 32	26 / 68	38 / 100

V.4.2 *Mycobacterium avium* M7

En el inmunoensayo realizado en las membranas de PVDF de *M. avium* contra los sueros seleccionado de sujetos con TB pulmonar activa, micobacteriosis por MNT, PPD+ y PPD-, se encontraron tanto proteínas únicas como comunes. El suero de TB mostró 18 proteínas antigénicas de las cuales 13 resultaron únicas y 5 compartidas, para MNT 14 totales, de las cuales 9 fueron únicas y 5 compartidas, para PPD+ 4 totales, 3 únicas y 1 compartida y para PPD- solamente 2, 1 única y 1 compartida (Figura 17), (Tabla 14).

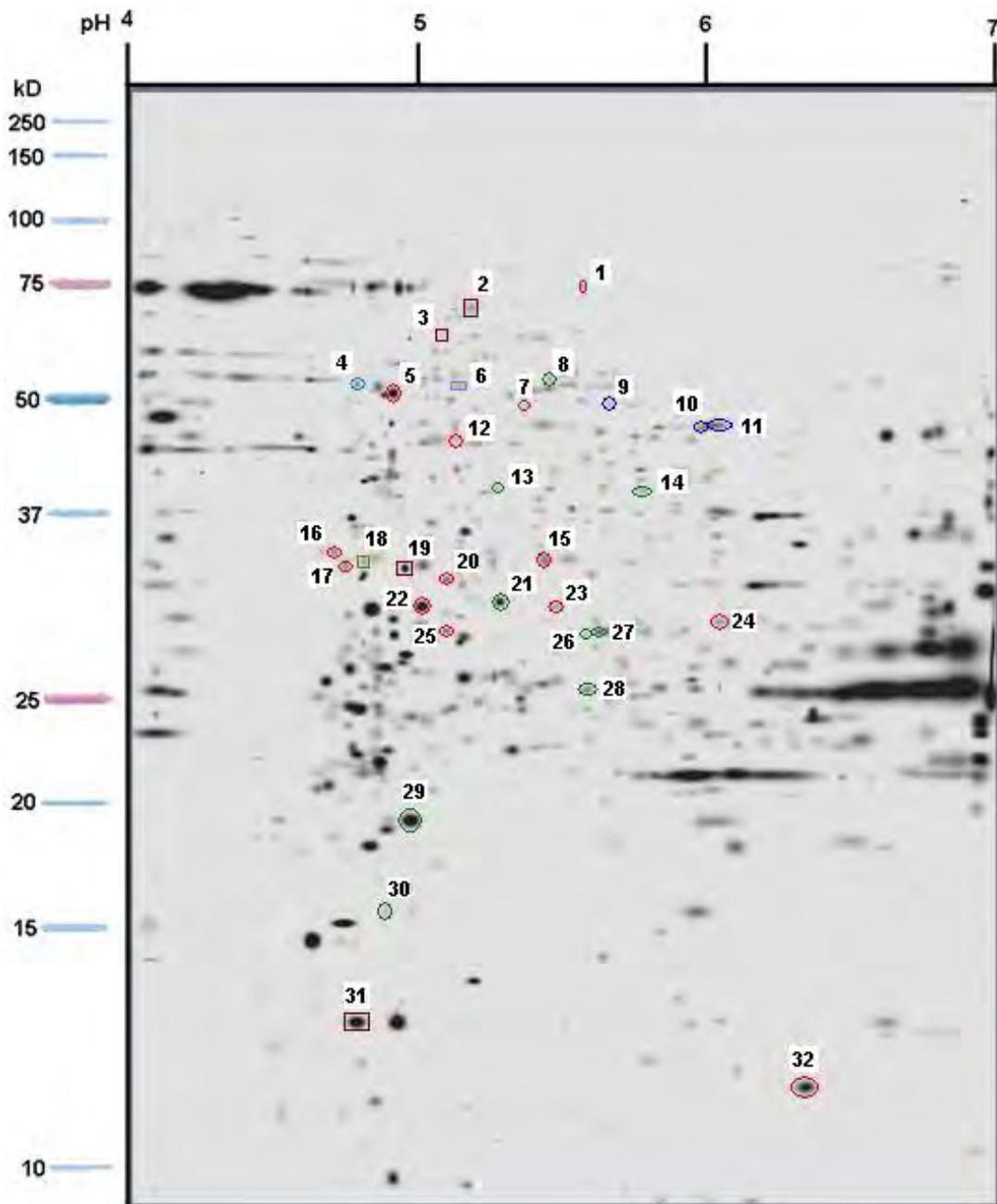


Figura 17. Construcción del inmunoproteoma de *M. avium* M7 a partir de la ubicación de las proteínas antigénicas reconocidas por los cuatro tipos de sueros en el Inmuno blot sobre su proteoma. Se ubica el marcador de masa molecular (10-250 kD) y el pH (4-7). Las proteínas únicas se muestran encerradas en círculo y las comunes en un cuadrado, los números indican las proteínas identificadas. Los colores representan los diferentes sueros utilizados: el rojo para el suero de TB, el verde para MNT, el azul oscuro para PPD+ y el azul claro para PPD-. El cuadro rojo marca las compartidas entre los sueros de TB y MNT, el azul para MNT y PPD+ y el verde para TB y PPD-.

V.5 COMPARACIÓN DE LOS INMUNOPROTEOMAS E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Una vez construidos los inmunoproteomas de cada cepa, se compararon para identificar a las proteínas que en los ensayos de Inmuno blot resultaron reactivas solamente para el suero de MNT; es decir, que no se compartieron con ningún otro suero, y que se encontraron en el inmunoproteoma ni en el proteoma de *M. bovis* BCG México (Figura 18). De esta evaluación resultaron 4 puntos (13, 14, 21 y 28) y que se identificaron por espectrometría de masas (Tabla 15).

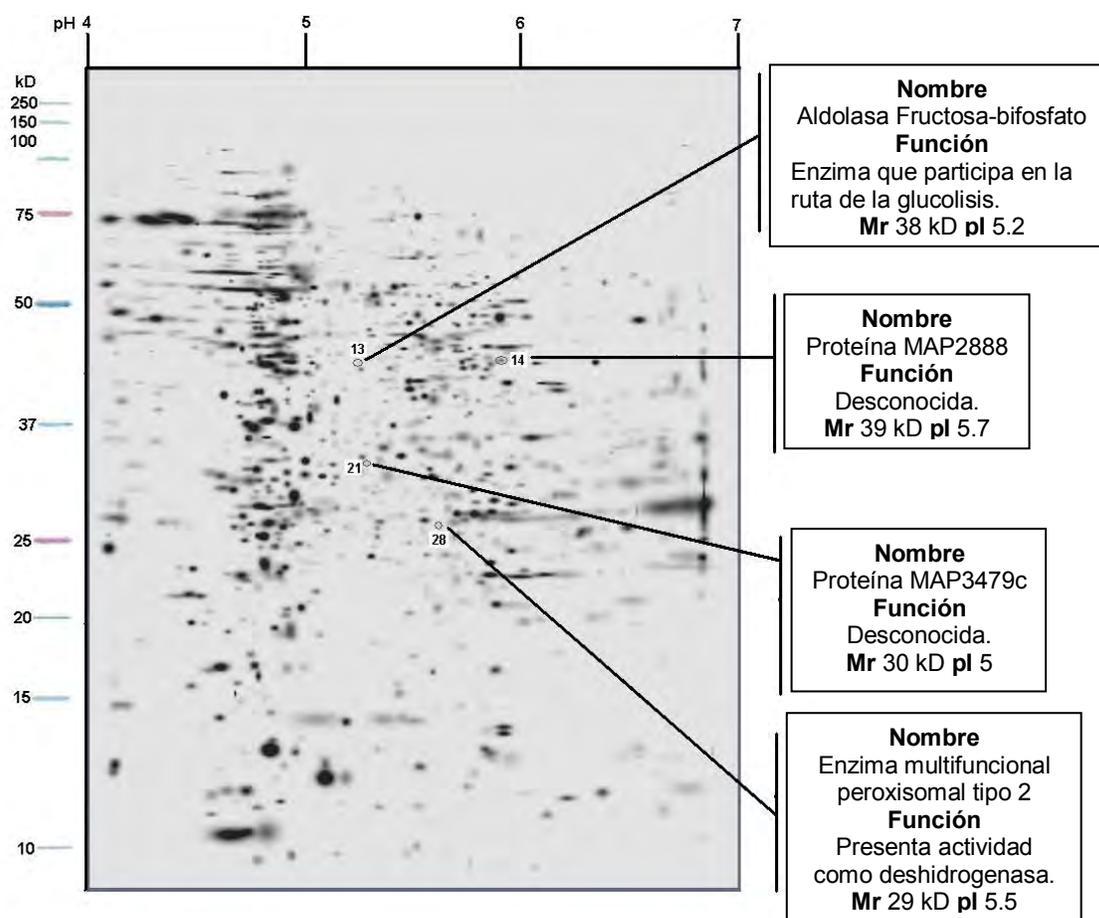


Figura 18. Ubicación e identificación de las proteínas de *M. avium* M7 reactivas únicamente al suero de MNT a partir de la comparación de los inmunoproteomas de las cepas de *M. avium* M7 y *M. bovis* BCG México. Los números indican la ubicación de los cuatro puntos (13, 14, 21 y 28) identificados por secuenciación a partir de espectrometría de masas.

Tabla 15. Proteínas de *M. avium* identificadas por espectrometría de masas.

Proteína			Número de acceso del NCBI	No. de péptidos identificados	% de secuencia	pI	MM kDa
No	Nombre	Función ^a					
14	Proteína Hipotética MAP2888	Desconocida (10)	gi 41408986	4	13	5.64	39
13	Aldosa fructosa bifosfato	Participa en la glucólisis (7)	gi 254822872	9	23	5.18	38
21	Proteína Hipotética MAP3479c	Desconocida (10)	gi 41409577	12	54	4.92	30
28	Enzima multifuncional peroxisomal	Metabolismo de ácidos grasos (1)	gi 118463535	21	45	5.55	29

^a Clasificación propuesta por el Instituto de Investigación Genómica. (TIGR): 0= virulencia, desintoxicación y adaptación; 1= metabolismo de lípidos; 2= vías de señalización; 3= pared celular y procesos celulares; 4= RNA estables; 5= elementos de inserción y fagos; 6= PE/PPE; 7= metabolismo intermediario y respiración; 8= desconocida; 9= proteínas reguladoras; 10= proteínas hipotéticas conservadas. Entre paréntesis se indica la clasificación TIGR.

V.5.1. Búsqueda *in situ* de las proteínas identificadas de *M. avium* en *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG Pasteur.

De las cuatro proteínas identificadas de *M. avium* se realizó un alineamiento de secuencias de tipo local utilizando el programa BLAST. Cada proteína se comparo contra el genoma completo *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG Pasteur, una vez ubicada la región con mayor parecido a la secuencia de cada una de las proteínas identificadas de *M. avium*, se realizó un Clustal X en el cual se compararon únicamente las proteínas identificadas de *M. avium* contra las proteínas correspondientes de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG Pasteur. Esta comparación de secuencias mostró un 85% de identidad en promedio. (Tabla 16).

Tabla 16. Porcentaje de identidad de amino ácidos entre las proteínas identificadas de *M. avium* contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG Pasteur.

	Proteína identificada	Cobertura de la proteína %	% de identidad de amino ácidos	
			Micobacteria	%
14	Proteína Hipotética MAP2888	99	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	83 (308/370)
		63	<i>M. bovis</i> BCG Pasteur	
15	Aldosa fructosa bifosfato	99	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	88 (304/342)
			<i>M. bovis</i> BCG Pasteur	
21	Proteína Hipotética MAP3479c	99	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	84 (242/287)
			<i>M. bovis</i> BCG Pasteur	
26	Enzima multifuncional peroxisomal	99	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	87 (248/283)
			<i>M. bovis</i> BCG Pasteur	

VI. DISCUSION

Las MNT se ubican en los grupos de riesgo I y II, la mayoría se ubican dentro del grupo de riesgo I, el cual se compone principalmente por especies que no son patógenas o solo excepcionalmente patógenas. *M. avium* se ubica dentro del grupo de riesgo II, el cual está formado por micobacterias potencialmente patógenas en el hombre o los animales. Una de las patologías más frecuentes es la enfermedad pulmonar, la cual es muy similar a la tuberculosis por *M. tuberculosis*. Y aunque poseen un particular riesgo de infección severa aquellos individuos en condiciones de inmunocompromiso, como es en el caso de pacientes con VIH o pacientes con previa enfermedad pulmonar como son la bronquiectasis, la fibrosis quística, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD por sus siglas en inglés) y la fibrosis pulmonar, se ha observado un incremento en el reporte de casos de infección pulmonar por MNT en pacientes sin una condición predisponente o inmunosupresión [32, 76].

M. avium especie integrante y de la cual deriva en nombre del CMA es una de las especies potencialmente patógenas y que después de *M. intracellulare* es la especie de MNT más frecuentemente aislada en pacientes con enfermedad pulmonar, alrededor del mundo [77]. Además, se han recuperado de un gran número de fuentes de agua (incluso en aguas salobres con hasta 2% de salinidad) y suelo, con bajo pH, poco oxígeno presente y un alto contenido de materia orgánica.

La peculiaridad de la pared celular le confiere a estas bacterias una alta resistencia contra los mecanismos de desinfección comunes como son la cloración y la ozonificación [78]. Por estas características no es sorprendente que *M. avium* sea uno de los principales representantes de aislamientos ambientales en sistemas de distribución de agua [47]. La cepa *M. avium* M7 se aisló de una muestra ambiental de agua de reuso para riego de los canales de Xochimilco, lugar situado al sur de la Ciudad de México, la presencia de *M. avium* en este tipo de agua representa un riesgo para la salud de la población [30, 33, 48, 79].

El diagnóstico de enfermedad pulmonar por *M. avium* se dificulta mucho debido a que la presentación clínica desarrolla síntomas muy similares e incluso indistinguibles de la tuberculosis producida por *M. tuberculosis* como son tos, producción de esputo, fatiga, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna y con menor frecuencia hemoptisis y sólo se sospecha de alguna MNT cuando el tratamiento antituberculosis no da los resultados esperados. Por lo cual es de suma importancia el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos que permitan identificar el agente etiológico de la infección de manera oportuna y específica, lo cual evite la progresión de la enfermedad por resultados tardíos o falso negativos, así como resultados falsos positivos para otro agente etiológico como *M. tuberculosis* que conlleven a la iniciación inapropiada de quimioprofilaxis con un alto riesgo de efectos tóxicos secundarios, debido a que los tratamientos, tanto el uso de fármacos, así como las dosis y los tiempos son diferentes [33].

Para la identificación de proteínas antigénicas potenciales para el desarrollo de un método de diagnóstico, *M. avium* M7 se comparó con la cepa *M. bovis* BCG México, la cual es una cepa vacunal que se utilizó durante dos décadas en los años cincuentas y sesentas en la población Mexicana contra la tuberculosis. Además, es integrante del CMT, complejo que toma su nombre por contener especies patógenas estrictas muy cercanas a *M. tuberculosis*, con una gran conservación entre sus genomas, como se refleja en genes tales como el 16S (99.9% de identidad) formando un grupo compacto y remoto del resto de especies del género *Mycobacterium* [24]. Al ser una cepa vacunal, el análisis comparativo contra *M. avium* M7 permitiría el desarrollo de una prueba diagnóstica, que evite en una primera instancia reacción cruzada con la vacuna BCG ya que como se ha demostrado en pruebas como la de la Tuberculina o los ensayos que miden la producción de interferón gamma, ocurren resultados falso positivos debido a que estas pruebas son inespecíficas.

Será necesario determinar la ausencia de reactividad cruzada en el reconocimiento de las proteínas identificadas contra anticuerpos en sujetos que hayan padecido tuberculosis producida por *M. tuberculosis* ya que a pesar de que *M. bovis* BCG como *M. tuberculosis* son muy cercanas filogenéticamente, presentan diferencias importantes como lo es la preferencia distinta por su hospedero (3% de disimilitud entre sus genomas (GenBank)).

Para lograr el objetivo del presente estudio se llevó a cabo la búsqueda de proteínas antigénicas únicas mediante el desarrollo de inmunoproteomas a partir

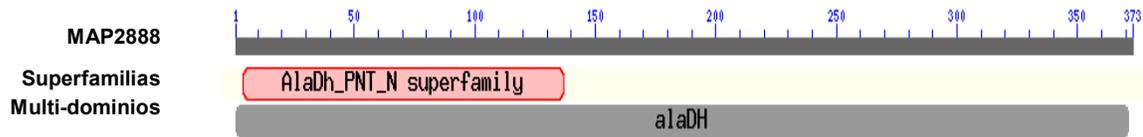
de diferentes tipos de sueros: de sujeto con tuberculosis pulmonar activa, sujeto con micobacteriosis producida por *Mycobacterium avium* y sujetos PPD+ y PPD-. En un primer escrutinio sólo se seleccionaron las proteínas que resultaron reactivas al suero de MNT y sin compartirse por algún otro suero, debido a que las proteínas antigénicas reactivas al suero de TB, PPD+ y PPD- indican las proteínas que son reconocidas por los anticuerpos contra *M. tuberculosis*, la vacunación, MNT o algún otro microorganismo y que se comparten con *M. avium*. De este modo seleccionamos a las proteínas antigénicas únicas para anticuerpos producidos por enfermedad pulmonar por *Mycobacterium avium*. En un segundo escrutinio de las proteínas seleccionadas previamente sólo se identificaron a proteínas antigénicas únicas, ausentes en el inmunoproteoma de *M. bovis* BCG México para evitar reacción cruzada con la cepa vacunal.

La electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) permitió el desarrollo de los proteomas de las dos cepas de estudio y las transferencias de las proteínas contenidas en los geles de acrilamida a las membranas de PVDF, permitió los ensayos de Inmuno blot para la construcción de los inmunoproteomas. 2D-PAGE permitió resolver entre 550 y 700 proteínas de los extractos celulares de *M. avium* M7 y *M. bovis* BCG México, las cuales se distribuyeron en alrededor de un 80% en el intervalo de 4.0 a 6.5 de pI y de 10 a 100 kDa de masa molecular, observación corresponde con lo predicho en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv por análisis *in silico*, en el que se determinó que alrededor de 60% de las proteínas predichas tienen un punto isoeléctrico entre un pH de 4 y 7 [80].

Parte fundamental de los estudios proteómicos e inmunoproteómicos consiste en determinar la identidad de las proteínas estudiadas que sean de interés para establecer las diferencias que permitan el desarrollo de un nuevo reactivo diagnóstico. En este trabajo se encontraron y se identificaron 4 proteínas de interés como posibles biomarcadores de la infección producida por *M. avium* que la distinguen de la vacunación por *M. bovis* BCG México y no presentaron reactividad cruzada ante el suero de TB. Éstas se clasificaron en las siguientes categorías funcionales de acuerdo al TIGR (The Institute for Genomic Research), el cual es un centro de secuenciación genómica de microorganismos en Rockville, Maryland, Estados Unidos [81]. Una de las proteínas correspondió al metabolismo de ácidos grasos en la β -oxidación, dos hipotéticas y una involucrada en la glucólisis. A continuación se mencionan algunas de las características reportadas para las proteínas identificadas.

VI.1 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

La proteína MAP2888 (No.14) es descrita inicialmente como una proteína hipotética, presenta dos dominios conservados; uno denominado como alanina deshidrogenasa (alaDH) la cual pertenece a la familia de la conocida L-alanina deshidrogenasa que incluye representantes de proteobacteras, firmicutes y cianobacterias, todas con alrededor de un 50% de identidad o mejor. Estas regiones están relacionadas a proteínas que unen NAD o/y NADP. El otro dominio corresponde a Alanina deshidrogenasa/PNT, dominio N terminal (AlaDh_PNT_N), relacionado al metabolismo de la lisina. Esta familia también contiene a la lisina 2-oxoglutarato reductasa (GenBank), (Figura 19). [82]



A

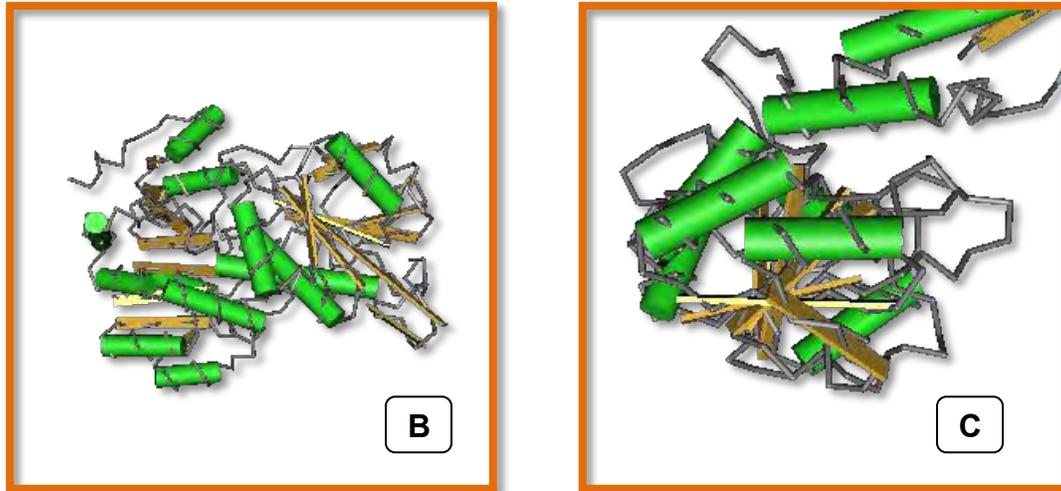
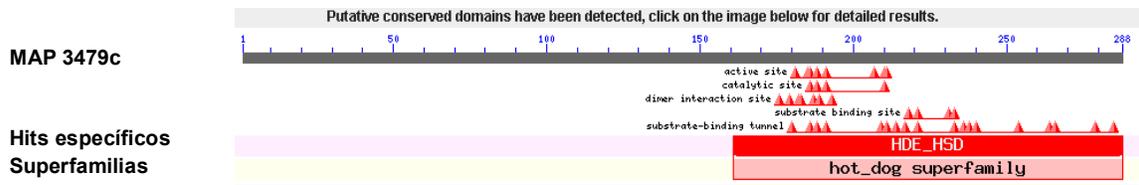


Figura 19. Dominios presentes en la proteína hipotética MAP2888. A) Ubicación de los dominios dentro de la proteína MAP2888. B) Dominio alanina deshidrogenasa (alaDH) relacionado con proteínas que unen NAD y/o NADP. C) Alanina deshidrogenasa/PNT, dominio N-terminal (AlaDh_PNT_N) relacionada al metabolismo de la Lisina.

La proteína aldosa fructosa bifosfato (No. 13) es una enzima glicolítica que cataliza la rotura reversible aldol o condensación de fructosa-1-6-bifosfato a dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato. Hay dos clases de aldolasas fructosa bifosfato con diferentes mecanismos catalíticos: las enzimas designadas de tipo I se encuentran en animales, no requieren iones metálicos y se caracteriza por la formación de una base Schiff intermedia entre un sitio activo de lisina altamente conservado y un sustrato grupo carbonilo durante la catálisis. Las enzimas de tipo II se encuentran en bacterias y hongos y requieren un sitio activo ion metálico divalente (une dos iones de Zn^{2+} o Fe^{2+} por subunidad). [83, 84]

La proteína designada originalmente como hipotética MAP3479c (No.21) presenta un dominio tipo dobles “emparedado” (Figura 20). Otras enzimas con este tipo de plegado incluyen a la MaoC dehidratasa y la subunidad beta de la sintetasa de ácidos grasos. Este dominio se identificó inicialmente en *Escherichia coli* en la proteína acarreadora de acilos (ACP) y subsecuentemente en 4HBT (4-hidroxibenzoil-CoA tioesterasa) de *Pseudomonas*. En otras proteínas aparentemente sin relación también comparten el plegado de tipo emparedado. Estas proteínas se han relacionado, con proteínas que tienen papeles metabólicos como la hidrólisis tioester en el metabolismo de ácidos grasos, y la degradación de ácido fenilacético y el contaminante ambiental 4-clorobenzoato. Esta superfamilia también incluye la proteína FapR, homóloga no catalítica involucrada en la regulación transcripcional de ácidos grasos [82, 85].

Cabe mencionar que esta proteína se ubicó como antigénica en dos puntos sobre el proteoma de *M. avium*, lo cual sugiere que esta proteína presente alguna modificación postraduccionales tales como acilación, glicosilación, metilación y acetilación. Sin duda el análisis diferencial de las modificaciones postraduccionales entre cepas proveerá información crucial respecto a la función e importancia biológica de las modificaciones específicas de las proteínas.



A

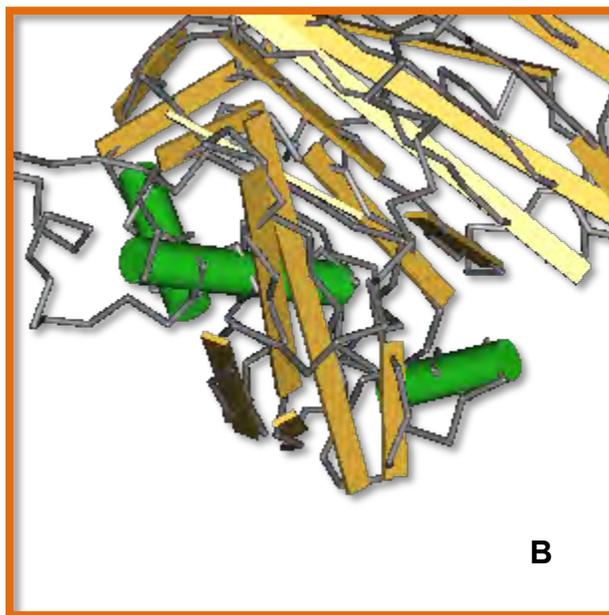


Figura 20. Dominio presentes en la proteína hipotética MAP3479c. A) Ubicación del dominio “emparedado” dentro de la proteína MAP3479c B) Dominio tipo “hot dog” relacionado a actividades catalíticas que incluyen funciones metabólicas como la hidrólisis tioéster en el metabolismo de ácidos grasos.

La enzima multifuncional peroxisomal tipo II (No. 26) interviene en la β -oxidación de ácidos grasos. Los ácidos grasos presentan una alta hidrofobicidad lo cual permite a las micobacterias resistir a los tratamientos antifímicos y a los agentes descontaminantes del agua, la cual es considerada como la principal vía de transmisión de las MNT. [86-88]

Cabe aclarar que todos los genes que codifican para estas proteínas se encuentran presentes en BCG, *M. tuberculosis* y el CMA. Las cuatro proteínas de

interés identificadas mostraron una considerable homología de su secuencia de aminoácidos en la comparación a partir de un CLUSTAL con proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv y con *M. bovis* BCG Pasteur. El promedio de identidad de los aminoácidos fue de 85% (Tabla 16). Por lo cual el no haber encontrado estas proteínas dentro del inmunoproteoma de *M. bovis* BCG México puede deberse a que no son o son poco antigénicas, o a que exista una expresión diferencial tal, que la sensibilidad de la técnica no fuera suficiente para detectar estas proteínas.

Estas proteínas de *M. avium* representan potenciales antígenos para el desarrollo de una prueba antígeno anticuerpo. Debido a que *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y las micobacterias no tuberculosas comparten estas proteínas, podría ser necesario el uso parcial de estas o péptidos con la finalidad de seleccionar regiones específicas para obtener una sensibilidad y una especificidad óptimas.

El desarrollo de una prueba antígeno anticuerpo daría ciertas ventajas para un diagnóstico y tratamiento oportuno, como son: la rapidez en la que se obtiene los resultados, ya que no requiere el aislamiento y crecimiento del agente infeccioso para el desarrollo de la prueba sino únicamente la muestra de suero del paciente. Existen pruebas moleculares como AccuProbe de Gen-Probe® que permite la identificación de las micobacterias aisladas con mayor frecuencia, en las que se encuentra *M. avium*. Estas pruebas combinan la especificidad de las sondas de ADN con la hibridación y en sólo 50 minutos, una prueba de AccuProbe ofrece resultados definitivos y muy precisos, pero requieren previamente aislar y crecer a la micobacteria en medio sólido o líquido, lo cual alarga los tiempos para

dar un resultado diagnóstico, además de que los costos son más elevados ya que requieren equipo especializado.

Finalmente la proteómica e inmunoproteómica han sido fundamentales para la comprensión de la biología e inmunología del género *Mycobacterium* tanto en miembros del complejo *M. tuberculosis*, como en el actual trabajo con MNT en particular *M. avium*. Este trabajo complementa los estudios previos realizados de genómica, de transcripción, fisiológicos e inmunológicos, lo que permitirá a futuro el desarrollo de un método diagnóstico más efectivo que permita un adecuado control de la enfermedad pulmonar debida a *M. avium*.

VII. CONCLUSIONES

- Se logró definir el patrón de las proteínas antigénicas del extracto celular de *M. avium* y *M. bovis* BCG México.
- El análisis comparativo entre la inmunodetección por los sueros de sujetos con TB, MNT, PPD+ y PPD- entre las cepas *M. bovis* BCG México y *M. avium* M7 permitió la identificación de proteínas antigénicas comunes y únicas para cada uno de los tipos de sueros utilizados.
- En *M. avium* M7 se encontraron cuatro proteínas antigénicas al suero de enfermedad pulmonar por *M. avium*, las cuales no se reconocieron por ningún otro suero utilizado y no estuvieron presentes en el inmunoproteoma de *M. bovis* BCG México, por lo cual son candidatas para diferenciar entre la enfermedad pulmonar por *M. avium* de enfermedad pulmonar por *M. tuberculosis* y la vacunación por *M. bovis* BCG.

VIII. REFERENCIAS

1. **Hartmans J, Stackebrandt E.** The Genus *mycobacterium*-Nonmedical. In: Dworkin M SF, Rosenberg E, Heinz-Schleifer K, Stackebrandt E, ed. The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, 3th ed, 2006:889-918.
2. **Leao A, Mejía G, Palomino J, Robledo R.** Fundamental aspects of mycobacteria identification: introduction. In: Broele V, ed. Handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria, 2004:17-26.
3. **Pfyffer E, Brown-Elliott A. and Wallace R.** *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures. 8th ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2003: 115-144.
4. **Brands S.** The Taxonomicon. Universal Taxonomic Services. Zwaag, The Netherlands. 1989-present.
5. **Hussain T.** Leprosy and tuberculosis: an insight-review. Crit Rev Microbiol 2007;33(1):15-66.
6. **Stackebrandt E, and Ward-Rainey N.** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. International Journal of Systematic Bacteriology 1997;47(2):479-91.
7. **Buchanan R.** Studies in the Nomenclature and Classification of Bacteria: The Problem of Bacterial Nomenclature. J Bacteriol 1916;1(6):591-6.
8. **Chester F.** Report of mycologist: bacteriological work. Delaware agricultural Experiment Station Bulletin 1897;9:38-145.
9. **Lehmann K, Ban R.** Atlas und Grundriss der Bacteriologie und Lehrbuch der speziellen bacteriologischen Diagnostik, 1st edn. Munchen: J. F. Lehmann, 1896.
10. **Ghosh J, Larsson P, Singh B, Pettersson B, Islam N, Sarkar S, Dasgupta S, Kirsebom L.** Sporulation in mycobacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106(26):10781-6.
11. **Augustus B.** Wadsworth Center. Albany, New York, 1901-present.
12. **Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffe M.** Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. J Bacteriol 2008;190(16):5672-80.
13. **Ahmed N, Dobrindt U, Hacker J, Hasnain S.** Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. Nat Rev Microbiol 2008;6(5):387-94.
14. **Gorocica P.** Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2005;18(2).
15. **Riley L.** Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. J Clin Invest 2006;116(6):1475-8.
16. **Pinner M.** Atypical acid-fast microorganisms. III. Chromogenic acid-fast bacilli from human beings. IV. Smooth growing bacilli. Am Rev Tuberc, 1935;32:424-45.
17. **Katoch V.** Infections due to non tuberculosis mycobacteria (NTM). Indian J Med Res 2004;120:290-304.
18. **Griffith D, Aksamit T, Brown-Elliott B.** An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 2007;175(4):367-416.
19. **Brown-Elliott B, Wallace R. Jr.** Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Rev 2002;15(4):716-46.
20. **Falkinham J.** The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. Can J Infect Dis 2003;14(5):281-6.
21. **Pellicic V, Reyrat J, Gicquel B.** Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. Mol Microbiol 1998;28(3):413-20.
22. **Dolin P, Raviglione M, Kochi A.** Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull World Health Organ 1994;72(2):213-20.

23. **Kaufmann S.** Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2006;6(9):699-704.
24. **Brosch R, Gordon S, Marmiesse M.** A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(6):3684-9.
25. **Brosch R, Gordon S, Garnier T.** Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(13):5596-601.
26. **Andersen P.** Tuberculosis vaccines - an update. *Nat Rev Microbiol* 2007;5(7):484-7.
27. **Andersen P, Doherty T.** The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(8):656-62.
28. **Skeiky Y, Sadoff J.** Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(6):469-76.
29. **Vaerewijck M.** Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews* 2005; 29 911-34.
30. **Primm T, Lucero C, Falkinham J.** 3rd. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(1):98-106.
31. **Saviola W.** The genus *Mycobacterium* - Medical. *Prokariotes*, Vol. 3, 2006:919-33.
32. **Koh W, Kwon O, Lee K.** Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent patients. *Korean J Radiol* 2002;3(3):145-57.
33. **Piersimoni C, Scarparo C.** Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect Dis* 2008;8(5):323-34.
34. **Ben-Salah I, Adekambi T, Raoult D, Drancourt M.** rpoB sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species. *Microbiology* 2008;154(Pt 12):3715-23.
35. **Casal M.** Las micobacterias atípicas como patógenos emergentes. *Enf Emerg* 2000;2(4):220-30.
36. **Petrini B.** Non-tuberculous mycobacterial infections. *Scand J Infect Dis* 2006;38(4):246-55.
37. **Alvarado C, Garcia N, Carrero D, Enciso JA, Gurrola T, Portillo L, Rossau R, Mijs W.** Molecular analysis of *Mycobacterium* isolates from extrapulmonary specimens obtained from patients in Mexico. *BMC Clin Pathol* 2009;9:1.
38. **Martinez V.** Infección por *Mycobacterium marinum*. Presentación de un caso. *Centro Dermatológico Pascua* 2004;13(2):85-7.
39. **Perez I, Ponce A, Bobadilla M, Villegas N, Perez M, Sifuentes J, Gonzalez J, Estrada T.** A novel identification scheme for genus *Mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex, and seven mycobacteria species of human clinical impact. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27(6):451-9.
40. **Tortoli E, Rindi L, Garcia M.** Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54(Pt 4):1277-85.
41. **Murcia M, Tortoli E, Menendez M, Palenque E, Garcia M.** *Mycobacterium* colombiense sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56(Pt 9):2049-54.
42. **Ben I, Cayrou C, Raoult D, Drancourt M.** *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59(Pt 11):2803-8.
43. **Van J, Boeree M, Kusters K, Wieland A, Tortoli E, Dekhuijzen P, Van D.** Proposal to elevate *Mycobacterium avium* complex ITS sequevar MAC-Q to *Mycobacterium vulneris* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59(Pt 9):2277-82.
44. **Wayne L, Good R, Tsang A.** Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*: a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43(3):482-9.
45. **Thorel M, Krichevsky M, Levy-Frebault V.** Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40(3):254-60.

46. **Mijs W, de Haas P, Rossau R, Van der Laan T, Rigouts L, Portaels F, Van Soolingen D.** Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52(Pt 5):1505-18.
47. Torvinen E, Suomalainen S, Lehtola MJ, Miettinen IT, Zacheus O, Paulin L, Katila ML, Martikainen PJ. Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(4):1973-81.
48. **September S, Brozel V, Venter S.** Diversity of nontuberculoïd *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(12):7571-3.
49. **Biet F, Boschirolì M, Thorel M, Guilloteau L.** Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res* 2005;36(3):411-36.
50. **Harries A, Dye C.** Tuberculosis. *Ann Trop Med Parasitol* 2006;100(5-6):415-31.
51. **Castillejos M.** Implicaciones de los polimorfismos de un solo nucleótido en *Mycobacterium tuberculosis* y humanos en el manejo clínico de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2006;19(1):38-46.
52. **Laniado R.** No siempre una baciloscopía positiva indica tuberculosis. Otra razón para solicitar cultivos rutinariamente. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2005;18(4):286-9.
53. **Katoch V.** Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004;120(4):418-28.
54. **Garcia M.** Is tuberculin skin testing useful to diagnose latent tuberculosis in BCG - vaccinated children? *International Journal of Epidemiology* 2006;35:1447-54.
55. **Weir R, Black G, Nazareth B.** The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon-gamma response to bacille Calmette-Guerin vaccination in southern England and northern Malawi. *Clin Exp Immunol* 2006;146(3):390-9.
56. **Andersen P, Munk M, Pollock J, Doherty T.** Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000;356(9235):1099-104.
57. **Joos T, Miller W, Murdoch D.** Tuberculin reactivity in bacille Calmette-Guerin vaccinated populations: a compilation of international data. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10(8):883-91.
58. **Andersen P, Doherty T, Pai M, Weldingh K.** The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? *Trends Mol Med* 2007;13(5):175-82.
59. **Pai M.** New tools and emerging technologies for the diagnosis of Tuberculosis: Part 1. latent Tuberculosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2006;6(3):413-22.
60. **Rothel J, Andersen P.** Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005;3(6):981-93.
61. **Vordermeier H, Brown J, Cockle P.** Assessment of cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* and *M. kansasii* ESAT-6 and CFP-10 at the T-cell epitope level. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(9):1203-9.
62. **Washburn M, Yates J.** 3rd. Analysis of the microbial proteome. *Curr Opin Microbiol* 2000;3(3):292-7.
63. **Rodríguez-Álvarez M, Mendoza-Hernández G, Encarnacion S, Calva J, López-Vidal Y.** Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level. *Tuberculosis (Edinb)* 89: 126-135.
64. **Gorg A, Drews O, Luck C, Weiland F, Weiss W.** 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* 2009;30 Suppl 1:S122-32.
65. **Issaq H, Veenstra T.** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques* 2008;44(5):697-8, 700.
66. **Lilley K, Razaq A, Dupree P.** Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6(1):46-50.
67. **O'Farrell P.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250(10):4007-21.
68. **Hess J, Blazer L, Romer T, Faber L, Buller R, Boyle M.** Immunoproteomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;815(1-2):65-75.
69. **Cho D, Sung N, Collins M.** Identification of proteins of potential diagnostic value for bovine paratuberculosis. *Proteomics* 2006;6(21):5785-94.

70. **Bradford M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
71. **Voller A, Draper C, Bidwell D, Bartlett A.** Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for chagas' disease. *Lancet* 1975;1(7904):426-8.
72. **Voller A, Bartlett A, Bidwell D.** Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 1978;31(6):507-20.
73. **Burnette W.** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112(2):195-203.
74. **Hoffmann V.** Mass spectrometry: principles and applications, 3th edn, 2001.
75. **Molloy M, Brzezinski E, Hang J, McDowell M, VanBogelen R.** Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics* 2003;3(10):1912-9.
76. **Barral A.** Infection With the *Mycobacterium avium* Complex in Patients Without Predisposing Conditions. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2005;9(2):173-9.
77. **Martin N, Bahrmand A, Bennedsen J.** Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8(10):1186-93.
78. **Inderlied C, Kemper C, Bermudez L.** The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev* 1993;6(3):266-310.
79. **Le Dantec C, Duguet J, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V.** Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(11):5318-25.
80. **Jungblut P, Schaible U, Mollenkopf H.** Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol* 1999;33(6):1103-17.
81. **Venter C.** The Institute for Genomic Research. Rockville, Maryland., 1992-present.
82. **Li L, Bannantine J, Zhang Q.** The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(35):12344-9.
83. **Marsh J, Lebherz H.** Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. *Trends Biochem Sci* 1992;17(3):110-3.
84. **Morse D, Horecker B.** The mechanism of action of aldolases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1968;31:125-81.
85. **Dillon S, Bateman A.** The Hotdog fold: wrapping up a superfamily of thioesterases and dehydratases. *BMC Bioinformatics* 2004;5:109.
86. **Chatterjee D.** The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr Opin Chem Biol* 1997;1(4):579-88.
87. **Falkinham J, 3rd.** Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg Infect Dis* 2003;9(7):763-7.
88. **Poirier Y, Antonenkov V, Glumoff T, Hiltunen J.** Peroxisomal beta-oxidation-a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763(12):1413-26.

IX. ANEXOS

IX.1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Reactivo de Bradford (50 mL)

CBB G-250	50 mg
Alcohol etílico absoluto	25 mL
Ácido fosfórico	50 mL
H ₂ O _d	cbp 500 mL
Almacenar a 4° C y cubrir de la luz.	

Buffer de equilibrio

Urea	6 M
Glicerol	30% v/v
Tres pH 8.8	50 mM
SDS	2% w/v
Azul de bromofenol	0.002%

Acrilamida/bis-acrilamida 30.1%

Acrilamida (para electroforesis)	29.1 g
Bis-acrilamida	0.9 g
H ₂ O _d	cbp 100 mL
Desgasificar 30 minutos al vacío.	
Filtrar con papel Whatman #1.	
Conservar a 4° C y cubrir de la luz.	

Tris 1.5 M pH 8.8

Tris base (para electroforesis)	25 g
H ₂ Od	cbp 150 mL

Ajustar a pH 8.8 y filtrar con papel Whatman #1.

Conservar a 4° C y cubrir de la luz.

Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%

SDS	10 g
H ₂ Od	cbp 100 mL

Filtrar con papel Whatman #1.

Conservar a temperatura ambiente.

Persulfato de amonio (APS) 10%

APS	0.75 g
H ₂ Od	7.5 mL

Guardar a -70° C.

Agarosa para sellar

Agarosa	0.5% w/v
Buffer de corrida 5X	10 mL
Azul de bromofenol	0.002% w/v
H ₂ Od	40 mL

Buffer de corrida 5X

Glicina	192 mM
Tris base	25 mM
SDS	0.1%
H ₂ Od	cbp 1L

Filtrar con papel Whatman #1.

Almacenar a 4° C.

Solución de fijación

Etanol	40%
Ácido acético	10%
H ₂ O	50%

Solución de lavado

Alcohol etílico	30%
-----------------	-----

Solución de pre-tratamiento

Tiosulfato de sodio pentahidratado	0.2 g/L
------------------------------------	---------

Solución de impregnación

Nitrato de plata	2 g/L
Formaldehído	0.75 mL
H ₂ O	cbp 1 L

Solución de revelado

Carbonato de sodio	60 g/L
Formaldehído 37%	0.5 mL
Tiosulfato de sodio pentahidratado	4 mg/L
H ₂ O	cbp 1L

Solución de paro

Ácido acético	5%
---------------	----

Buffer de transferencia

Alcohol metílico	20%
Tris	48 mM
Glicina	39 mM

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

NaH ₂ PO ₄ anhidrido	0.23 g
Na ₂ HPO ₄ anhidrido	1.15 g
NaCl	9 g
H ₂ O	cbp 1L
Ajustar el pH a 7.2-7.4.	

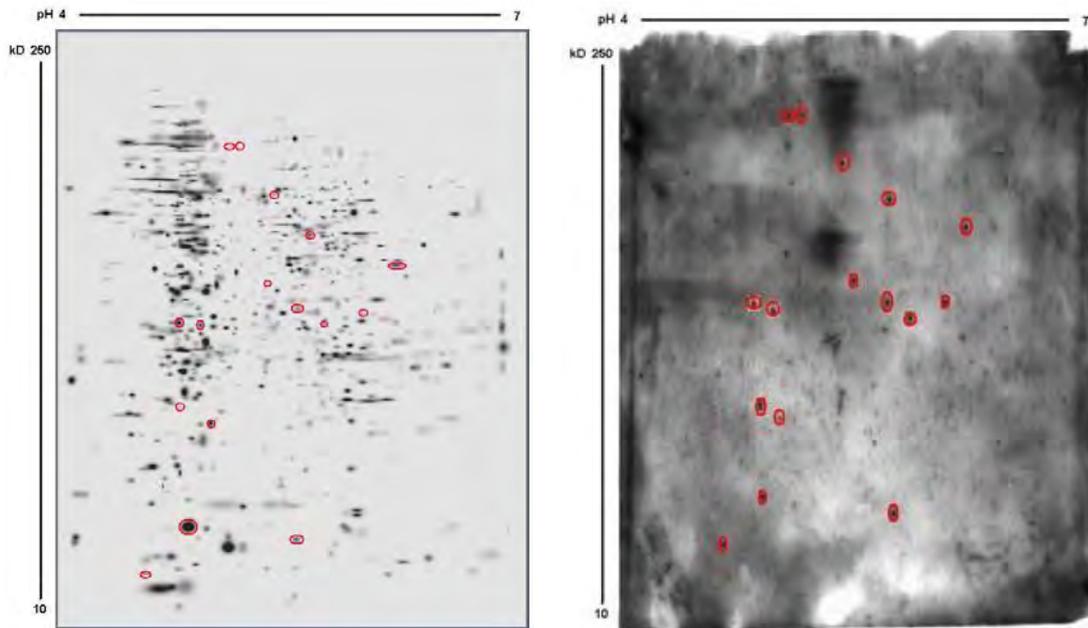
Solución amortiguadora de bicarbonatos

Carbonato de sodio	0.159 g
Bicarbonato de sodio	0.293 g
H ₂ O	cbp 100 mL
Ajustar el pH a 9.6.	

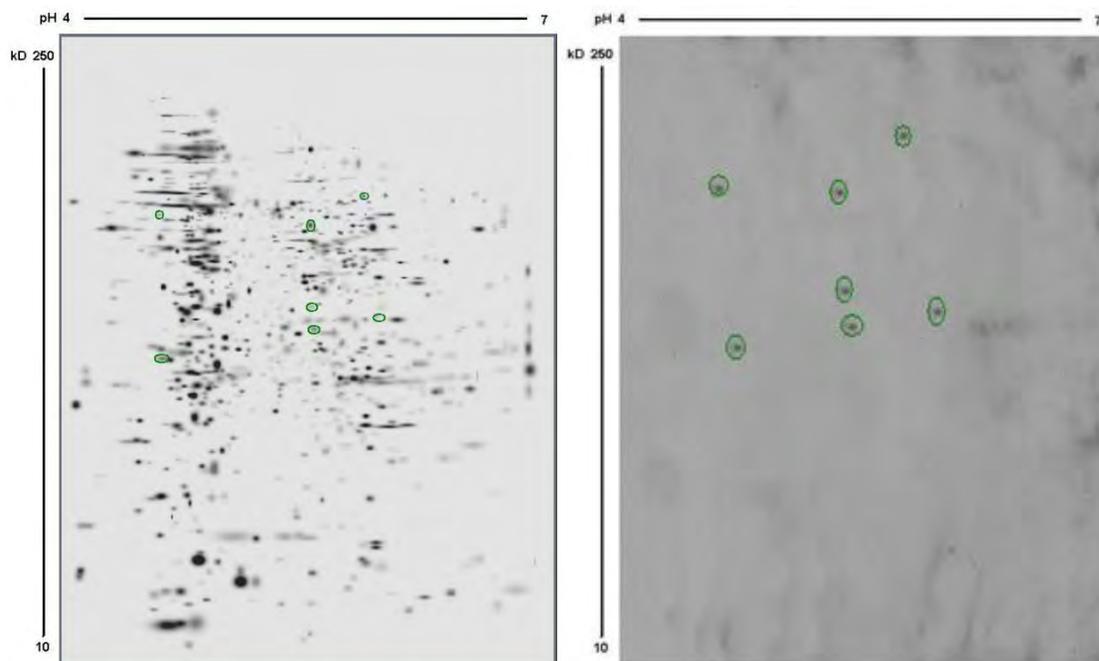
Solución amortiguadora de citratos

Ácido cítrico	0.730 g
Fosfato ácido de sodio	1.180 g
H ₂ O	cbp 100 mL
Ajustar el pH a 5.5.	
Conservar a 4° C.	

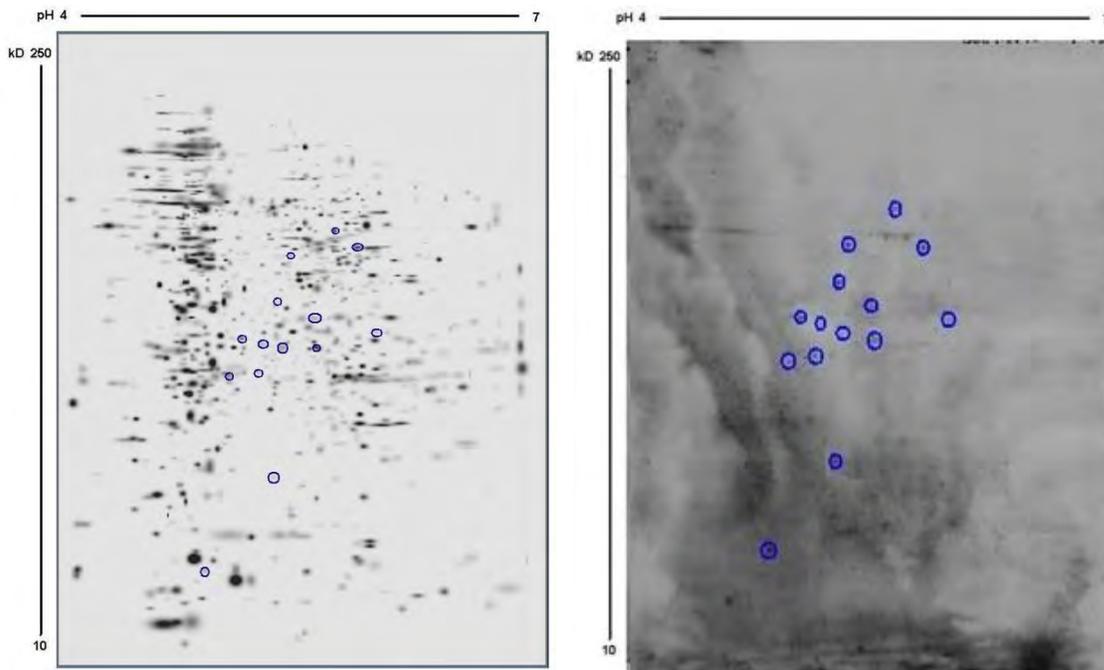
IX.2. INMUNO BLOT PARA *M. bovis* BCG MÉXICO



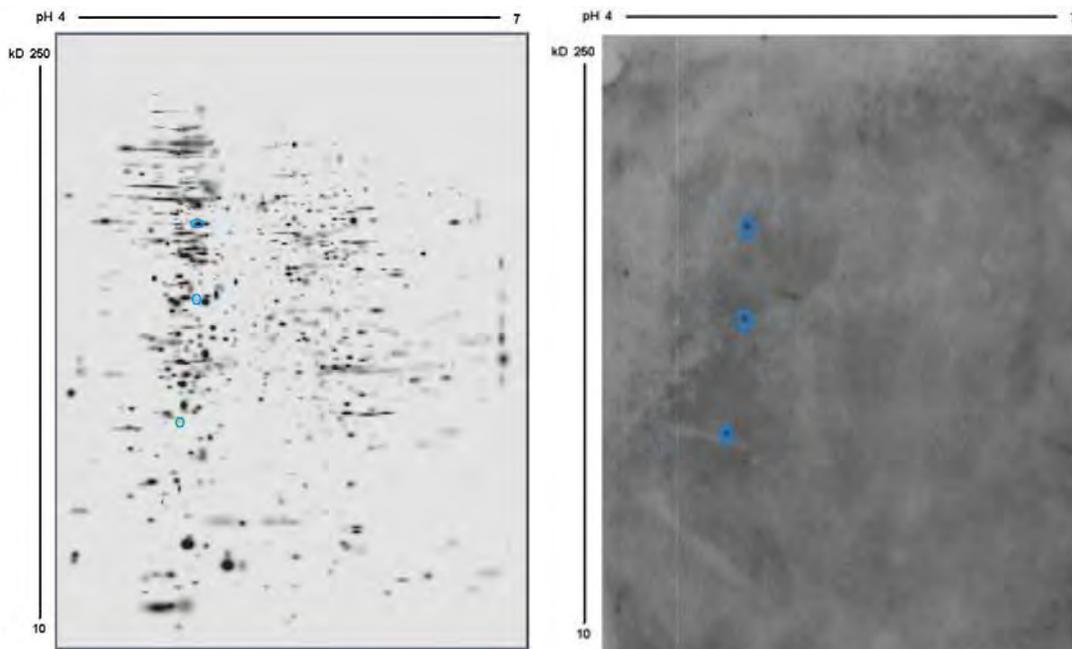
Ubicación de las proteínas antigénicas del suero de TB en el film y proteóma.



Ubicación de las proteínas antigénicas del suero de MNT en el film y proteóma.

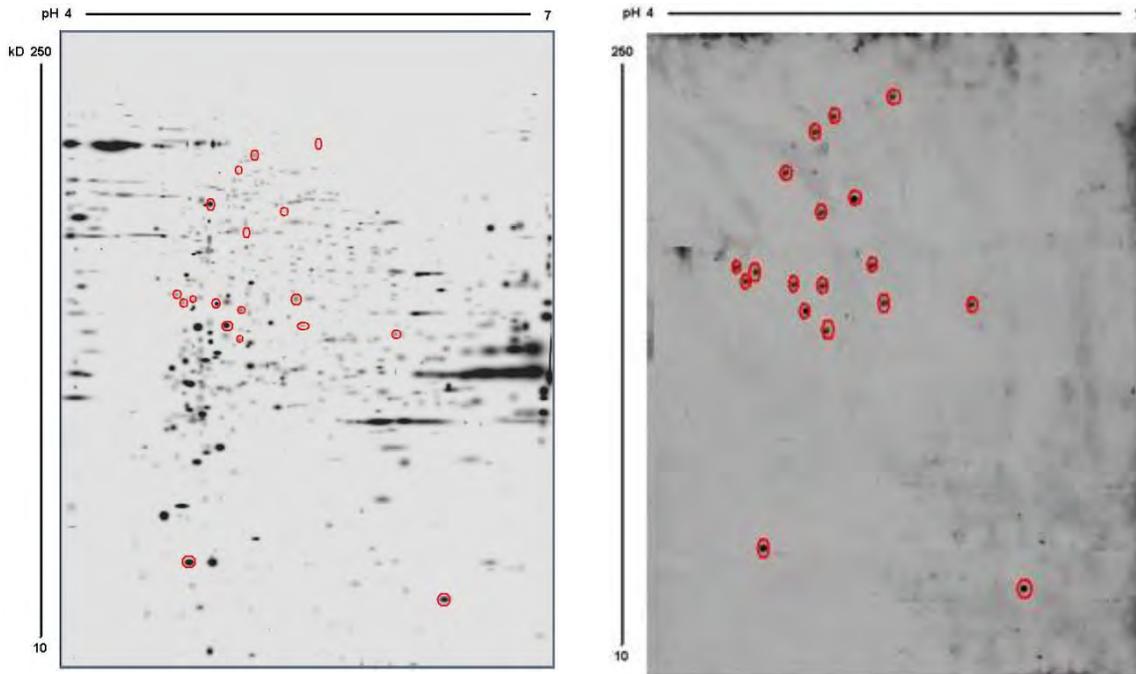


Ubicación de las proteínas antigénicas del suero de PPD positivo en el film y proteóma.

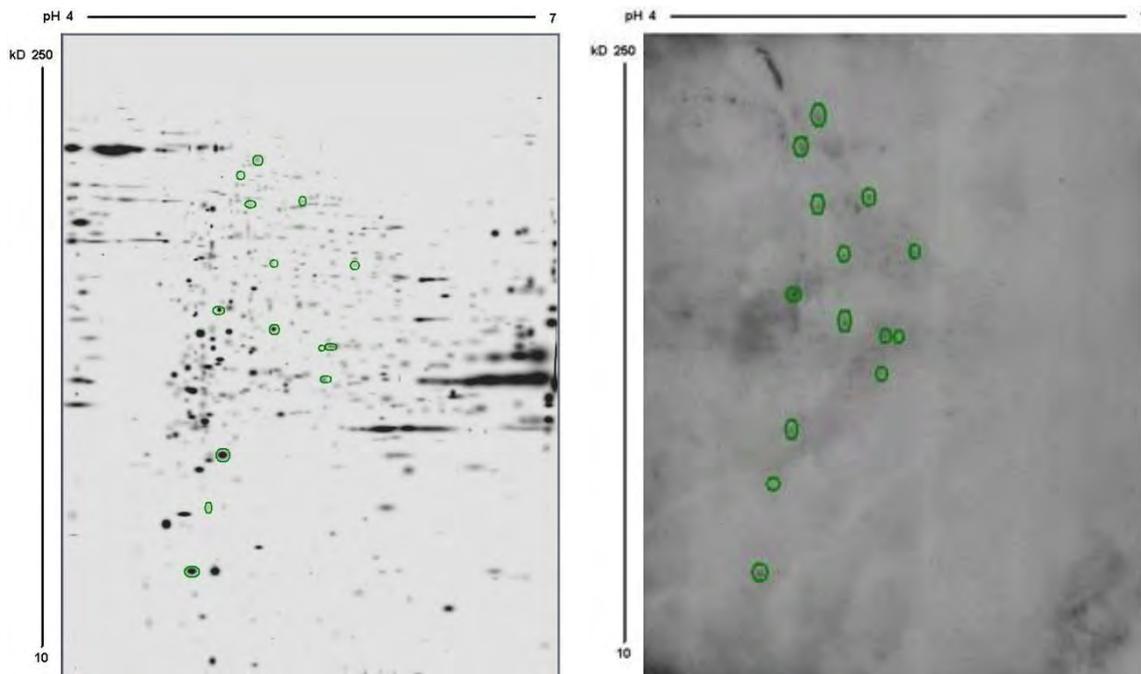


Ubicación de las proteínas antigénicas del suero de PPD negativo en el film y proteóma.

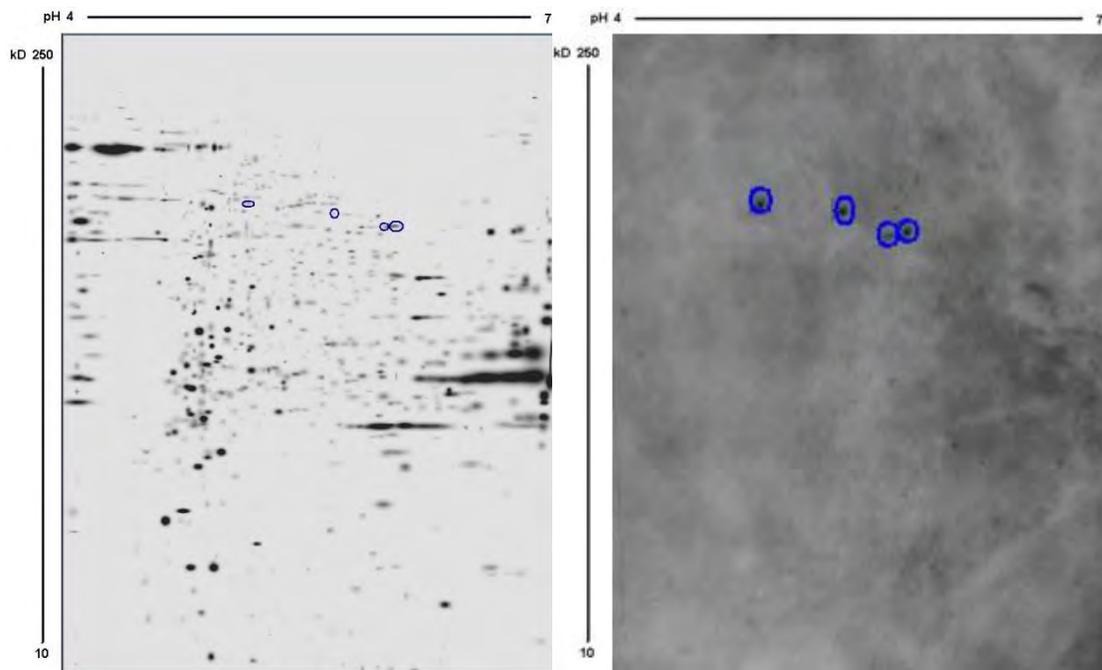
IX.3. PLACAS DE INMUNO BLOT PARA *M. avium* M7



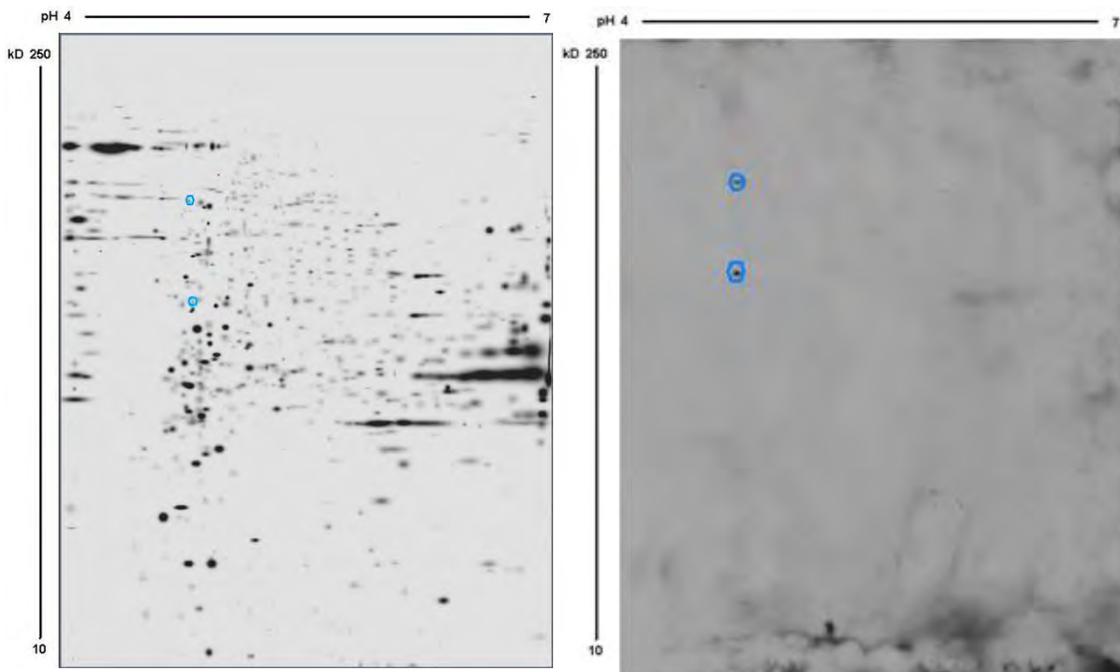
Ubicación de las proteínas del suero de TB en el film y proteóma.



Ubicación de las proteínas del suero de MNT en el film y proteóma.



Ubicación de las proteínas del suero de PPD positivo en el film y proteóma.



Ubicación de las proteínas del suero de PPD negativo en el film y proteóma.