

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"CARACTERIZACION ANTIGENICA DE LA ESPECIE  
*Mycobacterium tuberculosis*"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

PRESENTA

MARIO HUESCA CONTRERAS

1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Esta tesis se desarrollo bajo la dirección  
del Dr. Federico Goodsaid en el Instituto  
de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

Mi agradecimiento y admiración a las cualidades científicas y humanas del Dr. Federico Goodsaid.

También, gracias, a todos mis compañeros de laboratorio.

Este trabajo de tesis lo dedico a Silvia y a  
mis hijos Eduardo León y Mariana.

## RESUMEN

En el transcurso de este trabajo enfocamos nuestra atención a 3 aspectos relacionados a la caracterización antigénica de la especie -- Mycobacterium tuberculosis. El primero de ellos encaminado a la Investigación de variedades de esta especie bacteriana que puedan estar involucradas en formas clínicas particulares de tuberculosis y con diferentes -- características de virulencia. El segundo aspecto consistió en la identificación de los antígenos micobacterianos reconocidos por el sistema inmune de pacientes con tuberculosis y finalmente caracterizamos un grupo de antígenos de M. tuberculosis aislados de complejos inmunes circulantes -- aislados de sueros de enfermos con tuberculosis. Los resultados obtenidos pueden representar una evidencia sobre la presencia de diferentes -- variedades en la especie Mycobacterium tuberculosis; identificamos además a los componentes contra los cuales el sistema inmunocompetente de los -- pacientes, responde inmunológicamente y por último caracterizamos algunos de estos antígenos, los cuales permanecen en circulación formando complejos antígeno-anticuerpo.

## INDICE

	Pág.
<u>INTRODUCCION</u>	1
- Diagnóstico de la Tuberculosis	1
- Identificación y purificación de antígenos de <u>Mycobacterium tuberculosis</u>	2
- Complejos Inmunes Circulantes en Tuberculosis	5
- Utilización de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y la Inmuno-electrotransferencia en el análisis de proteínas bacterianas.	6
<u>OBJETIVOS</u>	8
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	10
III. Análisis Intraespecífico de proteínas de <u>Mycobacterium tuberculosis</u>	10
1. Cultivos bacterianos y preparación de los extractos de proteínas	10
2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio	12
3. Selección de picos densitométricos para el análisis y agrupación de los patrones electroforéticos	13
a) Control de variación debida a inestabilidad de proteínas	13
b) Control de variación experimental	13
4. Análisis y agrupación de electroferogramas por taxonomía numérica	14

	Pág.
II. Antígenos más Frecuentemente Reconocidos por Anticuerpos de Pacientes con Tuberculosis	16
1. Selección de pacientes	16
2. Inmunolectrotransferencia	17
III. Antígenos de <u>Mycobacterium tuberculosis</u> que Forman Complejos Inmunes Circulantes	18
1. Precipitación de complejos inmunes circulantes de sueros de pacientes con tuberculosis	18
2. Obtención de un suero hiperinmune anti- <u>M. tuberculosis</u>	19
3. Caracterización de antígenos en complejos inmunes por inmunolectrotransferencia	19
4. Demostración de la especificidad de la reacción con el suero hiperinmune	19
5. Separación, disociación e identificación de los componentes de los complejos inmunes.	20
<u>RESULTADOS</u>	22
I. Análisis Intraespecífico de Proteínas de <u>Mycobacterium tuberculosis</u>	22
1. Cultivos bacterianos	22
2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de DSS	22
3. Selección de picos densitométricos para el análisis y agrupación de los patrones electroforéticos	22
4. Análisis y agrupación de electroferogramas por taxonomía numérica	27

	Pág.
II. Antígenos mas Frecuentemente Reconocidos por Pacientes con Tuberculosis	29
III. Antígenos de <u>Mycobacterium tuberculosis</u> que forman Complejos Inmunes Circulantes	35
1. Caracterización de antígenos en complejos inmunes por inmunoelectrotransferencia	35
2. Demostración de la especificidad de la reacción con el suero hiperinmune	38
3. Separación, disociación e identificación de los componentes de los complejos inmunes	38
<u>DISCUSSION</u>	41
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</u>	51

## INTRODUCCION

### Diagnóstico de la Tuberculosis

La tuberculosis sigue representando un problema de salud pública a nivel mundial. En la actualidad se estima que la padecen 30 millones de seres humanos, siendo la incidencia anual de 8 millones (38); si bien este padecimiento muestra predominio pulmonar, existen diversas formas clínicas que afectan diferentes tejidos del organismo (42). El diagnóstico tradicional de esta enfermedad se realiza por métodos clínicos, radiológicos y bacteriológicos; los cuadros clínicos y radiológicos no son específicos de tuberculosis, por lo que es esencial la comprobación de Mycobacterium tuberculosis (el agente causal). El método bacteriológico más utilizado en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar es la baciloscopia, consistente en la identificación de bacilos ácido alcohol resistentes en frotis de muestras provenientes del paciente sospecho de padecer la enfermedad este método tiene una sensibilidad del 75% en esta forma clínica en particular (21), siendo aún más baja en otras infecciones como la pleuritis y meningitis tuberculosas (19). El aislamiento e identificación de Mycobacterium tuberculosis por cultivo en medios específicos, es un procedimiento tedioso y lento; por lo general transcurren entre 6 y 12 semanas para su aislamiento y tipificación, además de que se requiere de personal y laboratorios especializados (34). La prueba de la tuberculina, desarrollada por Koch desde 1881 y consistente en la aplicación intradérmica de proteínas hidrosolubles obtenidas a partir de cultivos de M. tuberculosis, sigue utilizandose como método diagnóstico en algunos paí

ses. En países como México donde existe una alta prevalencia de tuberculosis (31) y donde se sigue utilizando la vacuna BCG, la prueba de la tuberculina ha perdido su utilidad como método diagnóstico, ya que un resultado positivo demuestra contacto con el bacilo de la tuberculosis, más no necesariamente implica una infección activa.

Se han reportado diferentes intentos para desarrollar métodos inmunodiagnósticos (2,18), algunos de ellos han demostrado la utilidad de la detección de anticuerpos específicos contra M. tuberculosis para el diagnóstico de la tuberculosis, utilizando métodos como ELISA y radioinmunoensayo, sin embargo su aplicación práctica es cuestionable, debido a la alta frecuencia de reacciones cruzadas con otros microorganismos y a la presencia de anticuerpos antimicobacteria en la población general. Uno de los principales inconvenientes en todos estos métodos son las preparaciones antigénicas utilizadas, consistentes en extractos crudos de M. tuberculosis, por esta razón es deseable la identificación y caracterización de antígenos que puedan ser usados en sistemas inmunodiagnósticos que no presenten las limitaciones mencionadas anteriormente.

#### Identificación y Purificación de Antígenos de Mycobacterium tuberculosis

Knicker y Laborde (22) obtuvieron diferentes fracciones al separar los componentes de cultivos de M. tuberculosis por cromatografía de intercambio iónico. Estos autores demostraron la presencia de una gran variedad de antígenos, algunos especie-específicos y otros compartidos por otras especies e incluso por diferentes géneros bacterianos. En un intento por uniformizar los criterios de clasificación de estos antígenos

nos Daniel, Affronti y otros grupos de investigación ( 1 ), propusieron a la inmunoelectroforesis (IEF) como método analítico: enfrentaron preparaciones de M. tuberculosis con sueros hiperinmunes de referencia; así clasificaron los antígenos a partir de células bacterianas y de filtrados de cultivos, en II bandas con diferente movilidad electroforética -- ( 9 ).

La IEF utilizando los mismos sueros de referencia, ha sido -- utilizada en numerosos laboratorios en todo el mundo, con propósitos principalmente, de identificación durante el aislamiento de diferentes antígenos, los cuales se han aplicado en el desarrollo de métodos diagnósticos con una mayor especificidad. Se han publicado una gran cantidad de trabajos sobre separación, identificación y aislamiento de antígenos derivados de M. tuberculosis (Tabla I). El desarrollo de métodos con una mayor sensibilidad, como es el caso de la electroforesis en una y dos dimensiones ( 10 ) y la inmunoelectroforesis en cohete (Rocket), ha demostrado una -- gran cantidad de componentes antigénicos en los extractos de M. tuberculosis.

Recientemente Young y cols. ( 42 ) y Thole y cols. ( 36 ) utilizando la clonación molecular del DNA de cepas de esta especie bacteriana, lograron aislar algunos antígenos incorporados y expresados en el genoma -- de clonas de Escherichia coli.

La posibilidad de existencia de heterogeneidad antigénica en -- diversas especies bacterianas patógenas del hombre incluía M. tuberculosis complica aún más la búsqueda de antígenos para el desarrollo de métodos Inmunodiagnósticos; tal es el caso de especies como Neisseria meningitidis, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, etc. ( 16 ). En el caso del géne-

TABLA I

ANTECEDENTES SOBRE LA PURIFICACION DE ANTIGENOS  
MICOBACTERIANOS POR DIFERENTES METODOS FISICOQUIMICOS

---

Investigador	Método
- Seiberth	Precipitación con etanol-ácido acético
- Kniker y La Borde	Cromatografía de intercambio iónico
- Baer y Chaparas	Cromatografía por exclusión molecular
- Janicki y cols.	Electroforesis en papel
- Roszman y cols. Minden y Far	Electroforesis en geles de poli acrilamida
- Yoneda y Fukui; Daniel y Ferguson; Kuwabara	Precipitación con sulfato de amonio, filtración en geles, cromatografía de intercambio iónico y electroforesis.
- Azuma y cols; Yamamura y cols; Misaki y cols.	Extracciones alcalinas, precipitación con etanol y cromatografía de intercambio iónico
- Daniel	Cromatografía de afinidad con Concanavalina A
- Daniel y Anderson	Cromatografía de afinidad inmu-noabsorbente

---

Referencias tomadas de Mycobacterium Antigens (10)

ro Mycobacterium, se ha demostrado la existencia de variantes antigénicas en las especies Mycobacterium avium, y Mycobacterium kansasii (34). En referencia a la especie M. tuberculosis, no hay reportes en la literatura sobre la comprobación de subespecies; sin embargo Coates y cols. (6) -- demostraron diversidad antigénica en esta especie bacteriana, al enfren-- tar extractos de diferentes cepas de M. tuberculosis con una serie de anticuerpos monoclonales por el método de ELISA.

#### Complejos Inmunes Circulantes en Tuberculosis

Se han encontrado componentes antigénicos de M. tuberculosis formando complejos inmunes circulantes (CIC) en sueros de pacientes infectados con esta especie bacteriana. Carr y cols., cuantificando CIC en pacientes con tuberculosis pulmonar, por la fijación a  $C_{1q}$ , demostraron que las concentraciones de estos complejos inmunes disminuía durante el tratamiento de estos enfermos (5). May y cols. aislaron y purificaron CIC de 6 pacientes con tuberculosis pulmonar, mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna con conglutinina y demostraron la presencia de antígenos micobacterianos, en 5 de los 6 CIC estudiados por el método de Outcherlony, usando un suero anti BCG de conejo (27).

Samuel y cols. (35) después de disociar CI obtenidos de pacientes con tuberculosis, demostraron la presencia de antígenos de M. tuberculosis por medio de radioinmunoensayo, además observaron diferencias en las concentraciones de antígenos en los CI entre pacientes que respondían al tratamiento y pacientes que no mostraban mejoría. Estos antecedentes apuntan hacia la posible relación de la presencia de antígenos de

M. tuberculosis en circulación con el desarrollo de esta enfermedad.

Por otra parte, se han relacionado a los complejos inmunes en general con efectos reguladores de la respuesta inmune (13) Hobbs y cols. han identificado a fragmentos del Fc del anticuerpo presente en el CI, -- los cuales son responsables de la estimulación tanto de la respuesta inmune celular como de la respuesta inmune humoral (15). Al parecer la estimulación o supresión de la respuesta inmune puede depender de la propor-- ción entre las concentraciones relativas de anticuerpos y antígenos y/o de la naturaleza del antígeno presentes en el complejo inmune. . . .

Sobre las propiedades inmunosupresoras de componentes de -- M. tuberculosis, existen diferentes reportes sobre la estimulación de células adherentes supresoras por pared celular y células completas de mico bacterias (3,4). Parra y cols. (32) en un intento por entender el posible papel inmunoregulador de los antígenos de M. tuberculosis, expusieron a extractos protéicos de cepas de esta especie bacteriana con células -- adherentes humanas y comprobaron que los sobrenadantes de los cultivos -- de estas células inhibían la estimulación de linfocitos T por diferentes lectinas.

Utilización de Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Presencia de Dodecil Sulfato de Sodio e Inmuno-electrotransferencia en el Análisis de -- Proteínas Bacterianas

El desarrollo de métodos como la electroforesis en geles de -- poliacrilamida en presencia de DSS (DSS-EGPA) (24) y la inmuno-electro--- transferencia (IET) (39) han abierto nuevas posibilidades analíticas de

los componentes antigénicos de especies bacterianas. La EGPA-DSS es un método electroforético con una gran sensibilidad, mediante el cual se pueden separar proteínas en base a sus características de peso molecular, además que pueden calcularse las concentraciones individuales de cada banda proteica utilizando métodos cuantitativos de tinción. Por las ventajas inherentes a este método, la electroforesis de proteínas (electroferogramas) actualmente es utilizada en el análisis de diferentes géneros y especies bacterianas (12,23). Debido a la complejidad de los patrones electroforéticos obtenidos se han implementado sistemas automatizados de análisis de patrones electroforéticos, mediante modelos computacionales. Kerster y Deley (20) desarrollaron sistemas de clasificación por taxonomía numérica, utilizando información densitométrica, resultante de electroferogramas de proteínas bacterianas. Este método consiste en la comparación cuantitativa de valores de densidad óptica obtenidos de patrones densitométricos, divididos en diferentes áreas, tomando como referencia la posición de proteínas con pesos moleculares conocidos. Mediante este sistema Kerst, Deley y otros grupos de investigación (20), lograron una gran reproducibilidad de resultados en diferentes clasificaciones intra e interespecíficas de bacterias, sin embargo se pierde la información resultante de la comparación individual de bandas. La IET combina la gran capacidad de resolución y caracterización fisicoquímica de la EGPA-DSS con métodos inmunoenzimáticos y radioinmunológicos. Este método ha llegado a ser un procedimiento rutinario para la caracterización bioquímica de macromoléculas (39). Consiste en la transferencia, por medio de un campo eléctrico de antígenos previamente separados por EGPA-DSS, del gel de poliacrilamida papel de nitrocelulosa, donde se llevan a cabo reacciones de detección de los distintos

componentes antigénicos por anticuerpos específicos.

### OBJETIVOS

En este trabajo analizamos los aspectos que nos permitan encontrar la respuesta a tres preguntas relacionadas con la caracterización antigénica de Mycobacterium tuberculosis.

- 1) ¿Qué tan homogéneas en cuanto a sus características antigénicas, -- son las cepas de M. tuberculosis aisladas de pacientes con diferentes formas clínicas de tuberculosis?, para ello nosotros desarrollamos un método de agrupación taxonómica mediante la comparación de -- valores de área provenientes de densitometrías de los patrones electroforéticos de extractos protéicos de dichas cepas bacterianas. El propósito de esta parte del trabajo fue el detectar variaciones intraespecíficas que se pudieran correlacionar a características como forma clínica de tuberculosis, virulencia, etc. Este análisis nos permitiría obtener un panorama general de las características antigénicas de diferentes miembros de la especie M. tuberculosis, además que serviría como un primer paso para la selección de proteínas representativas de las cepas causantes de las diferentes formas clínicas de tuberculosis.
- 2) ¿Cuáles son los antígenos reconocidos por el Sistema Inmunocompetente de pacientes con tuberculosis?

Si bien se han utilizado diversos métodos inmunológicos para el estudio de los antígenos de M. tuberculosis, con el propósito de la -- investigación de la antigenicidad de los componentes de esta especie

bacteriana, utilizando sueros hiperinmunes o anticuerpos monoclonales, no se han caracterizado aquellos contra los cuales los pacientes con tuberculosis responden inmunológicamente. La caracterización de estos antígenos podría servir de base para la selección de aquellos que puedan utilizarse con fines diagnósticos.

El objetivo de esta parte del trabajo fue la identificación de los antígenos reconocidos por sueros de pacientes con tuberculosis, mediante la inmunoelectrotransferencia, utilizando como antígenos un extracto de Mycobacterium tuberculosis, obtenido de la cepa H<sub>37</sub>Rv.

- 3) ¿Cuáles son las características fisicoquímicas de los antígenos presentes en complejos inmunes aislados de pacientes con esta enfermedad?

Existen reportes sobre la demostración de antígenos de M. tuberculosis formando CIC en el 70% de los pacientes estudiados (35). Se desconocen las características fisicoquímicas de estos antígenos. Su caracterización serviría de punto de partida en el conocimiento más extenso de sus propiedades inmunológicas y como otra posibilidad de diagnóstico de la enfermedad mediante la detección de antígenos en suero. Con estos objetivos aislamos CIC de sueros de pacientes con tuberculosis, por precipitación con polietilenglicol, para enfrentar los componentes de estos complejos inmunes previamente separados por EGPA-DSS y transferidos a una matriz de nitrocelulosa, con un suero hiperinmune anti M. tuberculosis; y de esta manera identificar componentes de dicha bacteria en los CIC.

## MATERIAL Y METODOS

### Análisis Intraespecífico de Proteínas de *Mycobacterium tuberculosis*

#### 1. Cultivos bacterianos y preparación de los extractos de proteínas.

Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes se obtuvieron de muestras de sujetos con diferentes formas clínicas de tuberculosis; fueron cultivadas en el medio de cultivo de Lowenstein-Jensen (L-J) y tipificadas por pruebas bioquímicas (34) en la Universidad de St. Louis Missouri (EUA) (6 cultivos), en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (4 cultivos), en el Laboratorio Central de la S.S. (2 cultivos). Se cultivaron además 3 cepas de referencia ( $H_{37}Rv$ ,  $H_{37}Ra$  y BCG) obtenidas en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN y en el Instituto Nacional de Higiene (Tabla II). Cada uno de los cultivos en L-J se reinocularon en el medio de cultivo de Proskauer, Beck y Youmans (PBY) (34) en matraces Erlenmeyer de 250 ml. conteniendo 100 ml de medio y se incubaron a 37°C hasta que alcanzaron la etapa estacionaria de crecimiento, esto es hasta que la superficie del medio PBY estuvo cubierta uniformemente (4-6 semanas). Los medios de cultivo se separaron de las masas bacterianas por filtración a través de un filtro Whatman # 3 (M and R Bolston Lim. England) y por filtraciones sucesivas por filtros microbiológicos de 0.45 y 0.22  $\mu m$  (Millipore Corp., Bedford, Mass). Las proteínas de los filtrados se aislaron por precipitación de 0.42 g de S.A.\* por ml. de filtrado. El precipitado se separó por centrifugación a 4°C por 30 minutos a 60,000 g en una centrífuga Beckman (J2-21 USA). El precipitado se solubilizó en 5 ml de solución salina 0.15 M amortiguada con fosfatos 0.01 M pH 7.4 (SSF) con 0.2 mg/ml de floruro de fenil metil sulfóxido (PMSF)

\* Sulfato de amonio

TABLA II

CULTIVOS DE Mycobacterium tuberculosis

Clave	Procedencia	Tipificación ( <u>M. tuberculosis</u> )	Forma clínica
H <sub>37</sub> Rv	Esc. Nal. C. Biol.	+	-
H <sub>37</sub> Rv	Esc. Nal. C. Biol.	+	-
BCG	Inst. Nal. Higiene	+	-
5983	U. de St. Louis	+	-
5482	U. de St. Louis	+	-
6582	U. de St. Louis	+	-
5382	U. de St. Louis	+	-
4382	U. de St. Louis	+	-
4482	U. de St. Louis	+	-
Gro2992	Lab. Central	+	Tb. pulmonar
NL1206	Lab. Central	+	Tb. pulmonar
524	I.N.E.R.	+	Tb. renal
104	I.N.E.R.	+	Tb. pulmonar
34	I.N.E.R.	+	Tb. meningea
50HGG	I.N.E.R.	+	TB. pleural

Esc. Nal. C. Biol. = Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.O.N.

U. de St. Louis = Universidad de St. Louis Missouri

I.N.E.R. = Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

- = Información clínica desconocida

Lab. Central = Laboratorio Central de la Campaña Nacional de Lucha contra la tuberculosis

(Sigma-Chemicals, St. Louis Missouri) como inhibidor de proteasas (14). El extracto obtenido se dializó extensivamente a 4°C contra 6 X 2 l de -- SSF. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry -- (26) ajustándose a una concentración de 6 mg/ml y distribuyéndose en alícuotas de 0.5 ml; los extractos se congelaron a -70°C.

2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (EGPA-DSS).

Los extractos obtenidos de los diferentes cultivos bacterianos se corrieron por electroforesis en geles de poliacrilamida en placa (14X 12X 0.15 cm) utilizando un aparato de electroforesis vertical (Hoefer

) con un gel concentrador al 3% de acrilamida con 2.7% de bis-acrilamida. Se mezclaron 60 ug de cada extracto con un volumen equivalente de una solución de 0.125 M de Tris-HCl pH = 6.8, 4% de SDS, 20% de glicerol y 10% de 2-mercaptoetanol con azul de bromofenol (mezcla digestora) y se hirvieron a 100°C en un baño de agua durante 5 minutos. La electroforesis de las muestras se realizó de acuerdo al método de Laemmli (24) a 30 mA por gel utilizando una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.375 M pH 8.8 con 0.1% de DSS con un sistema de refrigeración a 4°C. Al terminar la separación electroforética de las proteínas los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.125% con 50% de metanol y 10% de -- ácido acético. El exceso de colorante se eliminó destiñendo con ácido acético al 10%. Los geles se secaron en un secador de geles (Bio-Rad gel -- slab dryer modelo 224) utilizando en ambos lados del gel papel celofán.

Se realizaron densitometrías de los geles en un densitómetro Beckman modelo DU8B a una longitud de onda de 600 nm. Se seleccionaron los picos en forma manual y se calcularon las áreas bajo la curva de cada uno de ellos en forma automática.

3. Selección de picos densitométricos para el análisis y agrupación de los patrones electroforéticos.

Considerando la posibilidad de que existieran diferencias entre los patrones electroforéticos y densitométricos debidas a variaciones ajenas a las diferencias intraespecíficas, como podrían ser las causadas por hidrólisis de algunas proteínas o a variaciones experimentales, se seleccionaron picos densitométricos para su comparación entre los diferentes patrones, eliminando bandas en base a los siguientes criterios:

- a) Control de variación debida a inestabilidad de proteínas.

Se expusieron diferentes alícuotas de un extracto de M. tuberculosis H<sub>37</sub>Rv a temperaturas de 4°C y 37°C en intervalos de 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h y 12 h; se mezclaron cada uno de los extractos expuestos a estas condiciones con mezcla digestora, se procesaron como se mencionó anteriormente y se realizó una EGPA-DSS, cuantificando por densitometría las áreas bajo la curva de cada una de las bandas, con el objetivo de eliminar las bandas que se degradarán en las condiciones mencionadas.

- b) Control de variación experimental

Se separaron extractos de 5 cultivos independientes de M. tuberculosis H<sub>37</sub>Rv en idénticas condiciones el mismo día y se realizaron también densitometrías de los electroferogramas resultantes de la sepa

ración electroforética de cada uno de ellos, seleccionándose picos lo suficientemente separados para ser cuantificados. Se eliminaron aquellas bandas no reproducibles en el quintuplicado. Se calcularon los promedios y desviaciones estandar de las áreas de las bandas seleccionadas del quintuplicado y de los extractos de los diferentes cultivos de M. tuberculosis. Los valores de área de estos cultivos cuya desviación estandar fué menor o igual que los del quintuplicado, se tomaron como el valor promedio de las áreas de dicha banda en estos cultivos mientras que los valores de desviación estandar mayores que los del quintuplicado se incluyeron como tales en el análisis de agrupación. Los valores de área utilizados en la comparación cuantitativa se transformaron en valores de porcentaje en relación a la suma total de las áreas de las bandas seleccionadas en cada caso. (Tabla III).

#### 4. Análisis y agrupación de electroferogramas por taxonomía numérica.

El análisis comparativo y agrupación de los diferentes patrones electroforéticos, se llevó a cabo mediante 3 métodos de taxonomía numérica (máximos, mínimos y promedios) utilizando los valores de porcentaje de área de los picos densitométricos seleccionados, para su comparación entre todos los cultivos de M. tuberculosis. Dada la complejidad de los cálculos y de los métodos de agrupación, el análisis comparativo se realizó con el programa Basic de computación desarrollado en una microcomputadora NEC/PC-8231A. (Nec. Home Electronics USA). El diagrama de flujo del programa que denominamos "Taxón" es el siguiente:

- Introducción de datos (% de áreas de trazos densitométricos de cada uno de los patrones electroforéticos.

TABLA III

CONTROL DE VARIACION EXPERIMENTAL: COMPARACION DE PROMEDIOS (p)  
Y DESVIACIONES ESTANDAR (d.s) DE LOS VALORES DE AREAS PARA  
CADA BANDA SELECCIONADA

No. Banda	Quintuplicado	Cultivos	Comparación	Interpretación
1	$p_{q1}; d.s._{q1}$	$p_{e1}; d.s._{e1}$	$d.s._{q1} = d.s._{e1}$	*Dispersión debida a variaciones experimentales entre quintuplicado.
			$d.s._{q1} \quad d.s._{e1}$	**Dispersión debida a diferencias intraespecíficas entre cultivos
2	$p_{q2}; d.s._{q2}$	$p_{e2}; d.s._{e2}$	"	" "
.			"	" "
.			"	" "
.			"	" "
n	$p_{qn}; d.s._{qn}$	$p_{en}; d.s._{en}$	"	" "
			"	" "

\* Se tomó el valor promedio de las áreas de la banda en cuestión de todos los cultivos.

\*\* Se tomó el valor real de la banda en cada uno de los cultivos.

- Cálculo del coeficiente de correlación ( $r$ ), por medio de la comparación por parejas de todos los grupos de valores.
  - Generación de una matriz de correlación con los valores de " $r$ " resultantes de la comparación de todos los cultivos bacterianos.
  - Cálculo inverso de la tangente hiperbólica (i.t.h.) de cada valor de " $r$ " y generación de una matriz con estos valores (matriz de Fisher) (20).
  - Agrupación de los valores de la i.t.h. de " $r$ " por taxonomía numérica por los métodos de mínimos, máximos y promedios (36).
  - Reconversión de los valores de agrupación de la i.t.h. en valores de " $r$ " nuevamente.
  - Generación de una matriz de agrupación para cada uno de los métodos de taxonomía numérica utilizados.
  - Esquematización de los dendogramas resultantes de los métodos de agrupación, este paso se realizó en forma manual. El método global de agrupación es una modificación del método de Sokal et al (20).
- II. Antígenos más Frecuentemente Reconocidos por Anticuerpos de Pacientes con Tuberculosis

1. Selección de pacientes:

Se estudiaron 48 pacientes con diagnóstico de tuberculosis (38 sin tratamiento y 10 con tratamiento) del Instituto Nacional de Enfermedades

des Respiratorias, todos ellos con baciloscopías positivas, confirmadas con cultivos positivos para Mycobacterium tuberculosis. Se incluyeron en el estudio a 21 sujetos sanos (11 PPD + y 10 PPD -) 10 con Histoplasma capsulatum, y 2 con Nocardia. Se tomaron muestras de sangre de todos los sujetos en estudio y se congelaron los sueros a -70°C.

## 2. Inmunoelectrotransferencia:

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida-DSS como se describió anteriormente, de un extracto de M. tuberculosis H<sub>37</sub>Rv. Posteriormente se transfirieron las proteínas separadas por este método a papel de nitrocelulosa (NC) (Scheleicher and Schuell Keen NH, BA 0.45  $\mu$ m de diámetro de poro) por el método de Towin (39) en una cámara de transferencia Bio-Rad a 2 A por 1 h a 4°C utilizando un amortiguador de Tris-clicina (0.025 M-0.192 M) pH 8.3 con 20% v/v de metanol.

Una vez transferidas las proteínas, el papel de NC se incubó toda la noche con una solución bloqueadora de albúmina sérica bovina (Sigma) al 3% en SSF con Tween 20 (39) al 0.1% (SSF-T) en agitación constante y a 4°C. Al día siguiente el papel de NC se lavó a temperatura ambiente con SSF-T durante 15 minutos con 4 cambios, para eliminar el exceso de la solución de albúmina. El papel de NC se cortó en tiras verticales de 0.5 cm y se incubó cada una con suero diferente proveniente de los sujetos estudiados, diluïdos 1:50 con SSF-T durante 3 horas a temperatura ambiente y agitación constante. Después de lavar nuevamente con la solución de SSF-T las tiras de NC se incubaron con un suero anti IgG humana de conejo con biotina acoplada covalentemente (Amersham) a una dilución -

1:2000 durante 60 minutos; las tiras de NC se lavaron nuevamente con SSF-T y se incubaron con un complejo formado con estreptavidina-biotina marcado con peroxidasa (Amersham) en una dilución 1:400 con SSF-T; se lavaron nuevamente y se revelaron con el substrato que es peróxido de hidrógeno al 0.025% en metanol-SSF al 20% \*v/v) con 0.05% (p/v) de 4 cloro 1 naftol (Sigma, St. Louis, Mo.).

### III. Antígenos de Mycobacterium tuberculosis que Forman Complejos Inmunes Circulantes

La caracterización de antígenos de Mycobacterium tuberculosis se realizó en complejos inmunes circulantes (CIC) obtenidos de sueros de 14 pacientes con diagnóstico de tuberculosis, confirmado por baciloscopías y cultivos, utilizando como controles 8 sueros provenientes de 2 enfermos con lupus eritematoso sistémico, uno con artritis reumatoide, uno con -- alveolitis alérgica, uno con neumonía enterobacteriana, uno con histoplasmosis y dos de individuos sanos.

#### 1. Precipitación de complejos inmunes circulantes de sueros de pacientes con tuberculosis

El método de obtención de los complejos inmunes fué el descrito por Creigh y cols. (27) y consistió en diluir los sueros 1:10 con -- amortiguador de boratos 0.1M pH 8.4 y posteriormente se añadió polietilenglicol al 8% hasta obtener una concentración del 4%. El precipitado formado se lavó con PEG al 4% y se suspendió con 0.5 ml de SSF, dializando -- extensivamente con el mismo amortiguador. Los CIC obtenidos se congelaron a -20°C.

2. Obtención de un suero hiperinmune anti-M. tuberculosis

Se inmunizaron semanalmente a conejos Nueva Zelanda adultos, hembras, durante 5 semanas inyectándoles intramuscularmente 3.3 mg de -- extracto de M. tuberculosis H<sub>37</sub>Rv, (con 5 mg de las mismas bacterias -- muertas por calor, en 1 ml de hidróxido de aluminio). Se sangraron los conejos de las orejas y se separaron y probaron los sueros obtenidos por inmunolectroforesis contra un extracto de M.T. H<sub>37</sub>Rv hasta demostrar el máximo de bandas por este método según Daniel ( 9 ).

Los sueros se dividieron en alícuotas de 1 ml y se congelaron a -20°C. El suero obtenido de la sangre de conejos antes de la primera inmunización se utilizó como control.

3. Caracterización de antígenos en complejos inmunes por inmunolectrotransferencia

Se mezclaron 50 ul de cada solución de CIC con el mismo volumen de mezcla digestora. Se realizó una EGPA-DSS y los componentes de -- los CIC, así separados se enfrentaron con el suero hiperinmune por inmunolectrotransferencia, solo que en esta ocasión se utilizó proteína-A-Biotina más el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa, para revelar finalmente con el substrato mencionado la presencia de IgG unida a las diferentes bandas protéicas en el papel de NC.

4. Demostración de la especificidad de la reacción con el suero hiperinmune

Con el objetivo de demostrar que el material identificado en

las tiras de NC correspondía a antígenos micobacterianos y no eran producto de una reacción inespecífica, se realizó un bloqueo de anticuerpos específicos, en el cual se hizo reaccionar 0.5 ml de suero hiperimmune anti-M. tuberculosis con 2 mg de extracto de Mt. H<sub>37</sub>Rv y se incubaron toda la noche a 4°C. El precipitado formado se separó por centrifugación y el sobrenadante se utilizó como prueba en la inmunolectrotransferencia, comparando este suero con anticuerpos bloqueados con una alícuota del mismo suero sin bloquear, a una dilución de 1:240 (dilución en la cual se comprobó el bloqueo) en ambos casos, enfrentándolos con una muestra positiva para complejos inmunes proveniente de un paciente con tuberculosis.

5. Separación, disociación e identificación de los componentes de los complejos inmunes.

Se realizaron una serie de experimentos para disociar e identificar los componentes de los complejos inmunes aislados de pacientes con tuberculosis. La purificación del CIC se llevó a cabo mediante una modificación del método de Virella y cols. (40) y consistió en utilizar 7 ml de suero de un paciente con tuberculosis, en el cual se había demostrado una reacción fuertemente positiva para antígenos de M. tuberculosis por inmunolectrotransferencia, se precipitó con PEG al 4%, como se describió anteriormente, se resuspendió en SSF y se dializó. La muestra se introdujo en una columna de 1.5 X 10 cm de proteína A-sefarosa (Pharmacia fine Chemicals) y se incubó durante una hora a 4°C, se eluyó con SSF y se lavó extensivamente con el mismo amortiguador (con un volumen de 100 veces el volumen de la columna) las fracciones obtenidas se leyeron a 280 nm, eluyéndose el material unido a la proteína A con un amortiguador de glicina-

HCl 0.2 M pH 3.

Para la separación de antígenos y anticuerpos del CI, la muestra obtenida por elución en condiciones de disociación a pH ácido, se dializó contra el mismo amortiguador pH 2.8 y se introdujo a una columna de 1.5 x 25 cm con sefadex G-200 (Pharmacia fine Chemicals) equilibrada con glicina-HCl pH 2.8. Las fracciones obtenidas se neutralizaron con un buffer Tris-HCl 0.1M, se concentraron y se enfrentaron a un suero anti-M.T. H<sub>37</sub>Rv por inmunoelectrotransferencia para demostrar la presencia de antígenos micobacterianos. La primera fracción colectada se hizo reaccionar contra un extracto de M.T. H<sub>37</sub>Rv también por IET para demostrar actividad de anticuerpo.

## RESULTADOS

### I. Análisis Intraespecífico de Proteínas de Mycobacterium tuberculosis

#### 1. Cultivos bacterianos:

Los diferentes cultivos de M. tuberculosis inoculados en el medio de PBY, alcanzaron su máximo crecimiento en tiempos que variaron de 5 a 9 semanas.

#### 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de D.S.S.

Los patrones electroforéticos obtenidos mostraron de 35 a 45 bandas teñidas con azul de Coomassie; de pesos moleculares entre 20 y 104 KD. Las diferencias observadas por la comparación visual de los electroferogramas se localizaron, principalmente en zonas de pesos moleculares mayores, a 92 KD, de 48 a 52 KD y de 27 a 35 KD (Figura 1). Seleccionamos 29 bandas, las cuales representaron trazos densitométricos claramente diferenciables, para su cuantificación por el cálculo del área bajo la curva de cada uno de ellos (Figura 2).

#### 3. Selección de picos densitométricos para el análisis y agrupación de los patrones electroforéticos

Los experimentos de exposición de extractos de M. tuberculosis H<sub>37</sub>Rv a temperatura de 4°C y 37°C, mostraron la desaparición progresiva, en los diferentes intervalos de tiempo de 3 bandas de pesos moleculares aproximados de 102, 87.8 y 86.1 KD, respectivamente. El resto de las 29

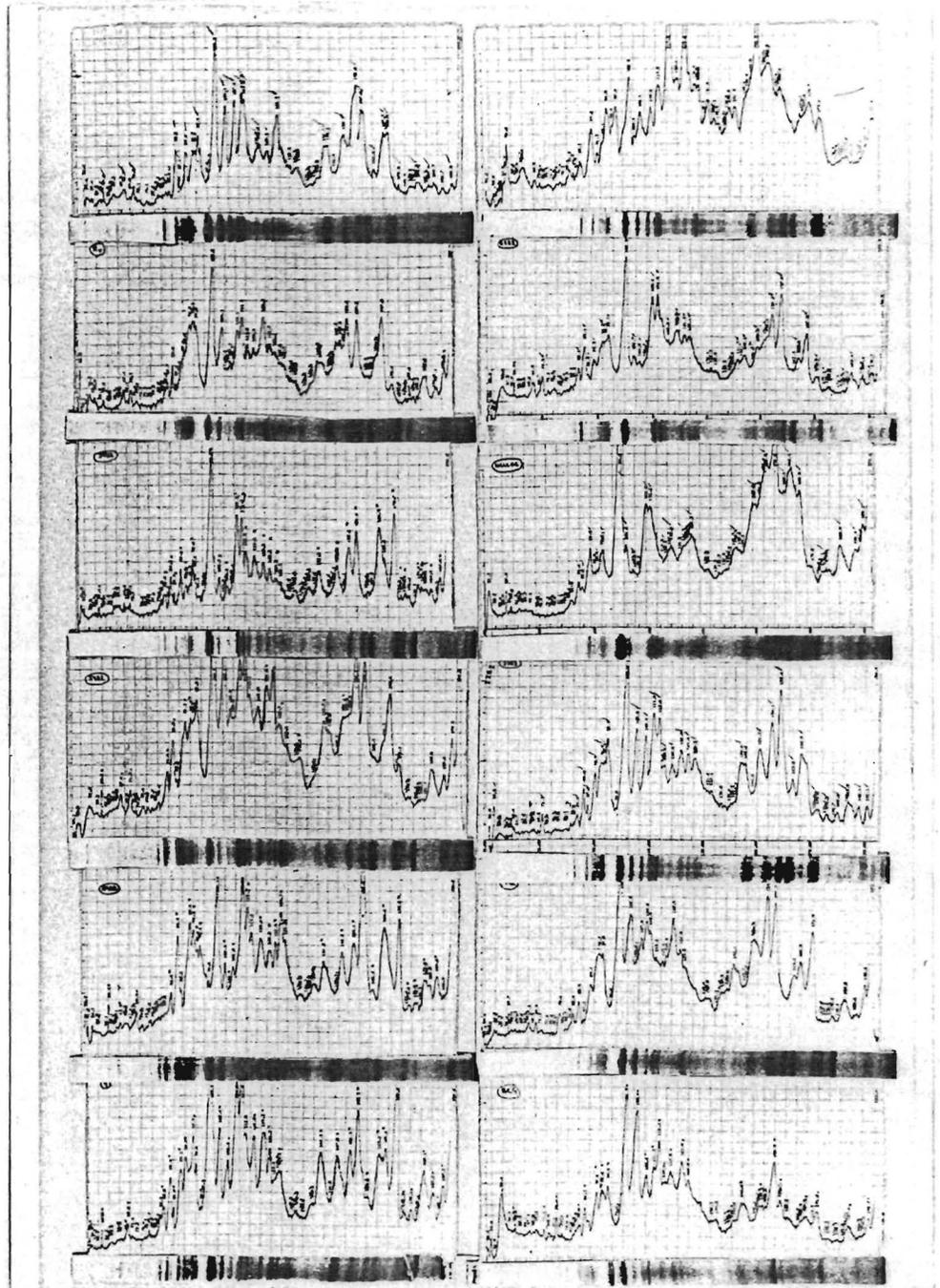


Figura 1. Electroferogramas de algunos de los extractos obtenidos de diferentes cultivos de *M. tuberculosis*. Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie. La gráfica situada en la parte superior de cada electroferograma corresponde a la densitometría de cada patrón electroforético.

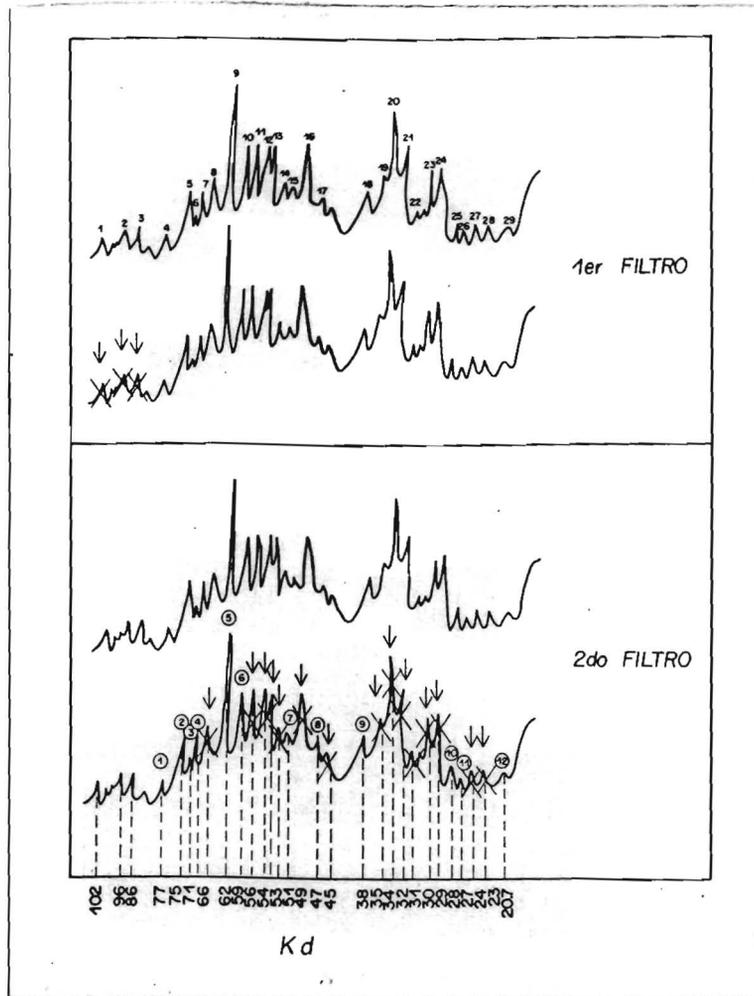


Figura 2. Esquematización de las bandas densitométricas eliminadas mediante los experimentos de control de inestabilidad de proteínas (1er. filtro) y control debido a variaciones experimentales (2o. filtro). En el esquema inferior se señalan las 12 bandas finalmente seleccionadas para el análisis comparativo de los diferentes cultivos de M. tuberculosis.

bandas seleccionadas del patrón electroforético característico, no mostró ninguna variación apreciable. Estos resultados fueron confirmados por la comparación cuantitativa de las áreas de los respectivos trazos densitométricos. Estas 3 bandas de proteínas degradables a 4°C y 37°C fueron excluidas del análisis comparativo de los diferentes cultivos (1er. "filtro", Figura 2).

a) Control debido a variaciones entre cultivos

De las 26 bandas restantes eliminamos 11 bandas por no ser reproducibles en los electroferogramas resultantes de los cultivos por quintuplicado de M. tuberculosis H<sub>37</sub>Rv y 3 bandas más por no ser comparativo los valores de área de dichas bandas en el cultivo experimental de la cepa H<sub>37</sub>Rv con los valores de las bandas homólogas en el quintuplicado de la misma cepa. (2° "filtro", Figura 2).

En un intento por distinguir las diferencias en valores de área de las 12 bandas seleccionadas resultantes de variaciones entre cultivos, de las verdaderas diferencias intraespecíficas, comparamos la dispersión estadística de cada una de las bandas en el quintuplicado con la de las bandas equivalentes en los cultivos.

Los resultados obtenidos en la comparación de los valores de desviación estandar se pueden observar en la Tabla III. Cuatro bandas mostraron valores de dispersión mayores en el quintuplicado en comparación con los cultivos por lo que las diferencias en las concentraciones de dichas bandas en las cepas se consideraron productos de variaciones experi-

TABLA IV. COMPARACION DE DESVIACIONES ESTANDAR DE LAS AREAS DE 12 BANDAS SELECCIONADAS ENTRE 15 CULTIVOS DE M. tuberculosis AISLADOS DE PACIENTES Y 5 CULTIVOS DE LA CEPA H<sub>37</sub>RV

P.M. KD	CULTIVOS EXPERIMENTALES			QUINTUPLICADO H <sub>37</sub> Rv		
	$\bar{X}$	d.s		$\bar{X}$	d.s	
1	76.9	1.27	± 0.520	1.79	± .655*	
2	74.6	2.66	± 2.176	2.664	± .894	
3	70.7	3.89	± 2.90	4.14	± 1.31	
4	67.8	5.34	± 2.31	10.14	± 2.82 *	
5	66.8	4.58	± 1.74	5.68	± 1.730	
6	61.6	13.32	± 2.24	13.22	± 3.21 *	
7	58.5	4.80	± 4.22	4.408	± 7.30 *	
8	50.7	4.26	± 2.53	2.25	± 1.21	
9	45.9	3.05	± 2.62	1.31	± .597	
10	28.8	7.27	± 4.14	9.11	± 2.61	
11	26.8	4.31	± 3.475	1.439	± 1.022	
12	20.7	1.86	± 1.78	3.45	± 1.60	

mentales. La forma de controlar este tipo de diferencias, fue el tomar como valor del área el promedio de las áreas de dichas bandas en todos los cultivos. Los valores en forma de porcentaje, de las áreas de las 12 bandas, modificadas de esta manera fueron los utilizados en la comparación de los diferentes cultivos por el programa "Taxón".

#### 4. Análisis y agrupación de electroferogramas, por Taxonomía numérica:

Como puede observarse en la Figura 3 las agrupaciones por taxonomía numérica realizadas por el programa "Taxón" generaron 3 matrices de conectividad. En las matrices superiores se encuentran los valores de "4" resultantes de la agrupación de los cultivos por cada uno de los métodos de taxonomía numérica mencionados. Las esquematizaciones de los valores de agrupación de las diferentes matrices generan los respectivos dendogramas, que se muestran en la misma figura.

El dendograma obtenido por el método de agrupación por "mayores" dió lugar a la formación de 2 grupos. El grupo 1-2-3 esta formado por el 85% de los cultivos incluidos en el análisis de agrupación en valores mayores a 0.80 de coeficiente de correlación. El grupo número 4, lo constituyen únicamente 2 cultivos con las claves 34 y 50 HGG. Los cuales se diferencian en forma notable de los demás cultivos estudiados ( $R = 0.50$ ).

En el dendograma obtenido por la agrupación por el método de "promedios" se puede observar la formación de 4 grupos (1,2,3 y 4), agrupados en valores superiores a 0.60 de "r". Los grupos 1, 2 y 3 se interrelacionan con valores entre 0.53 y 0.55 de "r", mientras que el grupo 4



se conecta con los demás grupos con un valor de 0.28 de "r". Es interesante hacer notar que las cepas de referencia H<sub>37</sub>Ra y BCG, (avirulentas se encuentran en un grupo diferente (# 1) al de la cepa virulenta H<sub>37</sub>Rv (# 2) y que los cultivos 54 y 50 HGG, se obtuvieron de pacientes con tuberculosis extrapulmonares.

La agrupación por "menores" dió lugar a una distribución similar a la del método por promedios, con diferente localización de los grupos 2 y 3.

## II. Antígenos más Frecuentemente Reconocidos por Anticuerpos de Pacientes con tuberculosis

Los resultados obtenidos al enfrentar los sueros de pacientes con tuberculosis, con el extracto de M. T. H<sub>37</sub>Rv, por inmunoelectrotransferencia, mostraron en conjunto el reconocimiento de cerca de 70 -- bandas antigénicas, detectadas en el papel de nitrocelulosa con proteína A-biotina como "segundo-anticuerpo". (Figura 4). El patrón de reconocimiento de los diferentes sueros de enfermos con tuberculosis fué muy heterogéna. En la Figura 5 se muestra un histograma de reconocimiento de los antígenos en forma individual por los sueros de pacientes con tuberculosis sin tratamiento. Los valores mayores, en frecuencia de reconocimiento, los presentaron 4 antígenos con pesos moleculares de 73, 70, 53 y 48 KD respectivamente.

Los resultados, en cuanto al reconocimiento de dichos antígenos por pacientes sin tratamiento y controles sanos y con histoplasmosis se pueden observar en los respectivos histogramas, en las figura 6 y

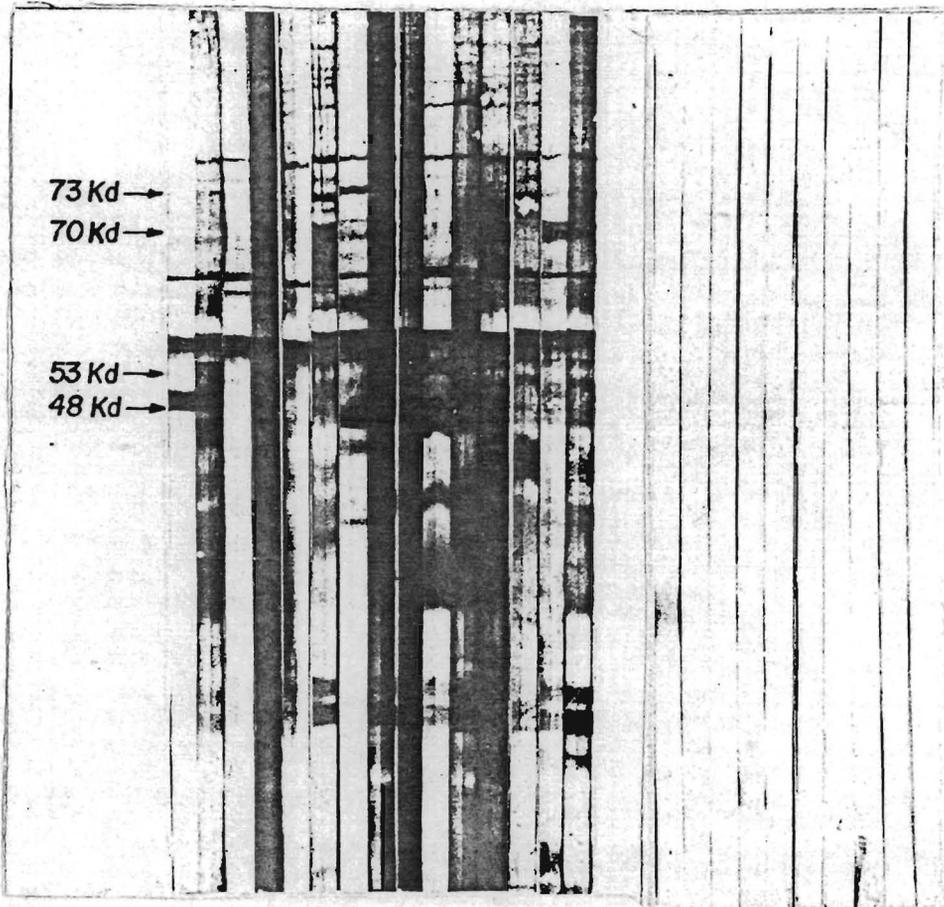


Figura 4. Immunolectrotransferencia de antígenos de M. tuberculosis reconocidos por sueros de pacientes con esta enfermedad y sueros de sujetos sanos. Las flechas señalan los pesos moleculares y la posición de los antígenos más comúnmente reconocidos por pacientes con tuberculosis.

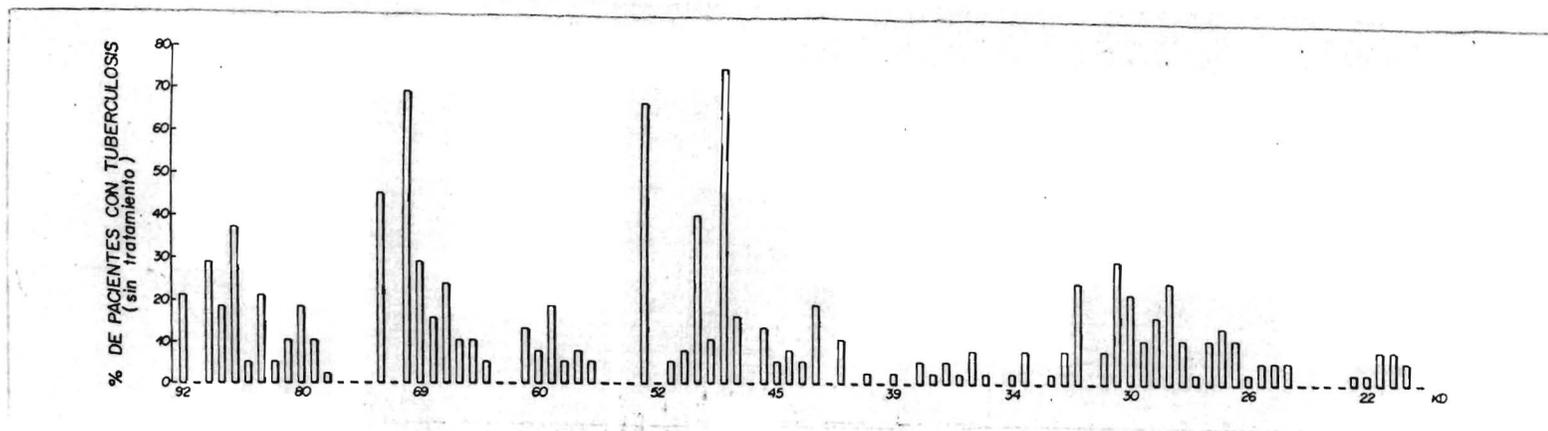


Figura 5. Histograma de frecuencias de reconocimiento de los antígenos de M. tuberculosis por sueros de pacientes.

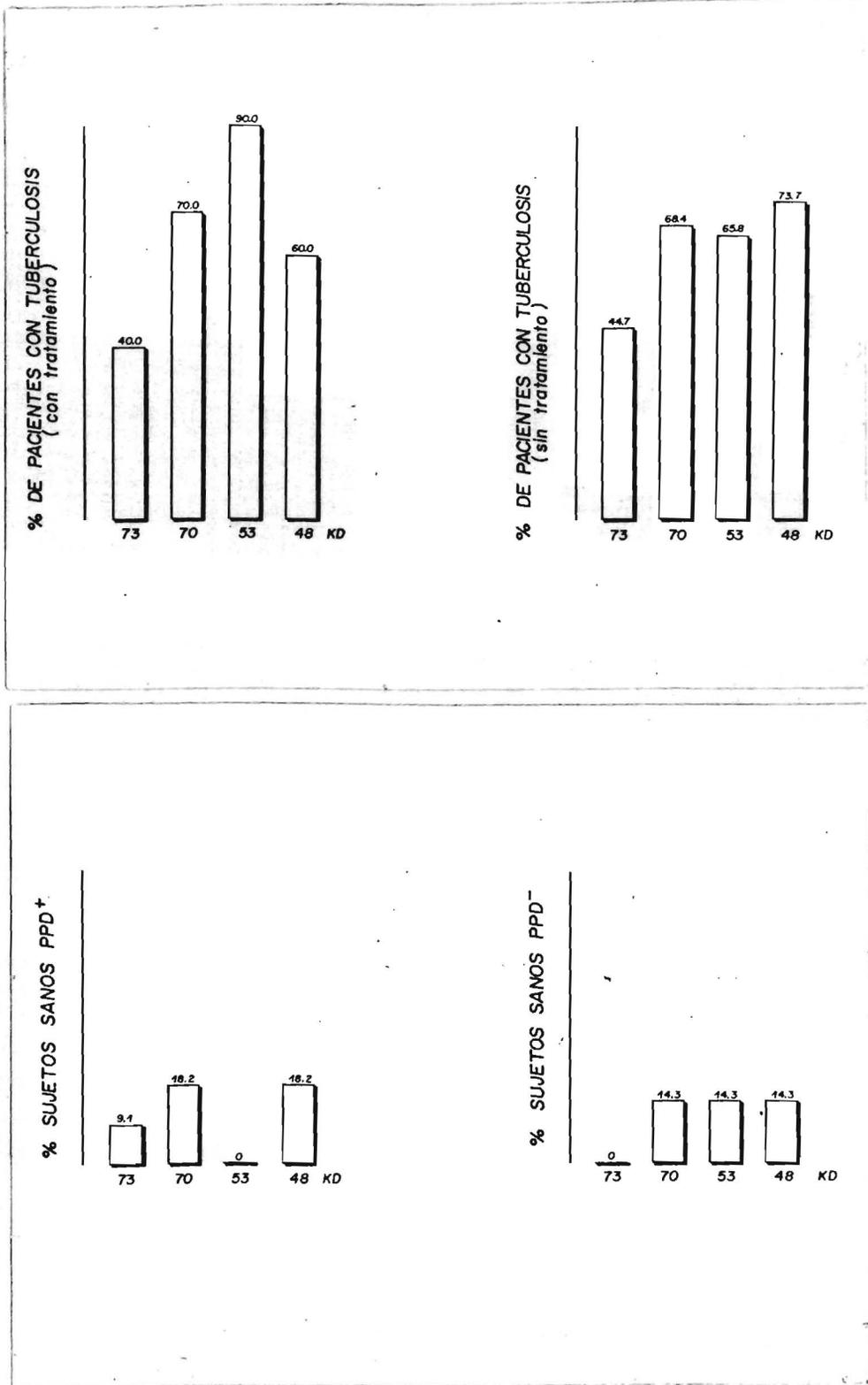


Figura 6. Histogramas de los 4 antígenos más frecuentemente reconocidos por pacientes con tuberculosis (con tratamiento y sin tratamiento) y frecuencia de reconocimiento de los mismos, por sujetos sanos.

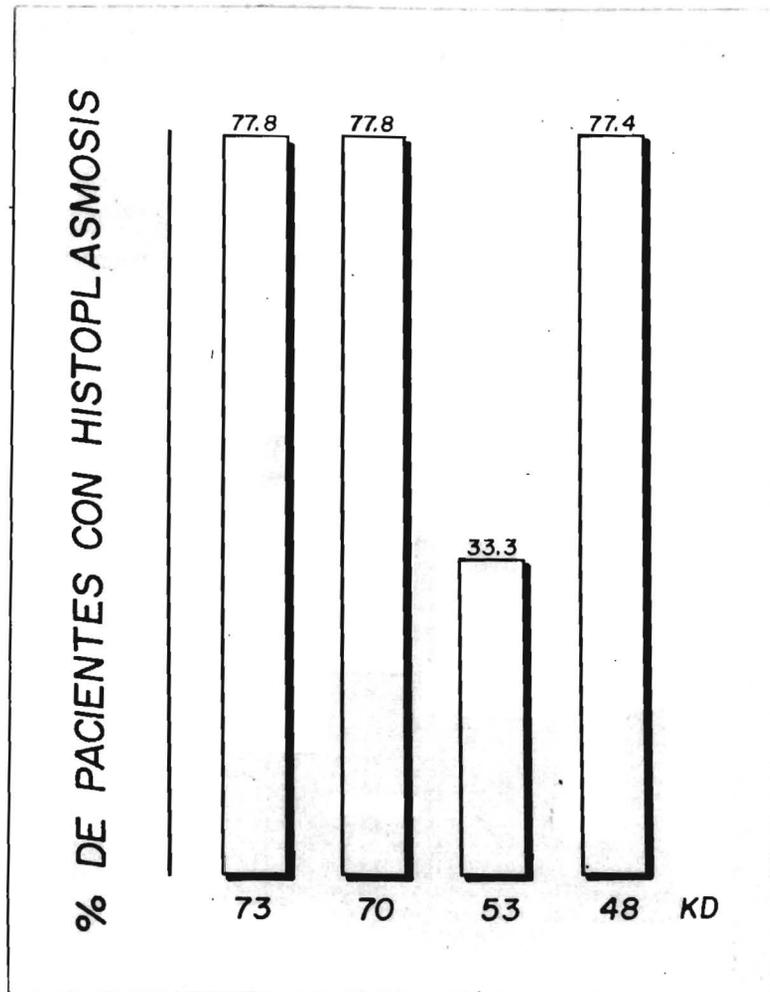


Figura 7. Reconocimiento por los sueros de individuos con histoplasmosis de los antígenos de M. tuberculosis más frecuentemente reconocidos por sueros de pacientes con tuberculosis.

TABLA V

FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO DE LOS ANTIGENOS DE M. tuberculosis de 73, 70, 53 y 48 Kd POR ENFERMOS CON TUBERCULOSIS

Peso molecular (k.d)	T	T.T	PPD <sup>+</sup>	PPD <sup>-</sup>	Histo
73	44.7%	40.0%	9.1%	0.0%	77.8%
70	68.4%	70.0%	18.2%	14.3%	77.8%
53	65.8%	90.0%	0.0%	14.3%	33.3%
48	73.7%	60.0%	18.2%	14.3%	77.8

T - Enfermos sin tratamiento

TT - Enfermos con tratamiento

PPD<sup>+</sup> Sanos PPD<sup>+</sup>

PPD<sup>-</sup> Sanos PPD<sup>-</sup>

Histo - Enfermos con histoplasmosis

7. Los sueros de pacientes con nocardiasis no mostraron reconocimiento de ninguno de estos antígenos.

III. Antígenos de Mycobacterium tuberculosis que Forman Complejos Inmunes circulantes.

Los resultados obtenidos en la caracterización de los antígenos presentes en complejos inmunes de pacientes con tuberculosis, mediante la inmunoelectrotransferencia, demostraron la presencia de 3 bandas reconocidas por un suero hiperinmune anti-M. tuberculosis, de pesos moleculares de 61.6, 58.5 y 56.2 KD, en 11 de 14 pacientes (78%) (Figura 8). Estos antígenos fueron consistentes con 3 proteínas de pesos moleculares equivalentes, presentes en un extracto de M. tuberculosis H<sub>37</sub>R<sub>V</sub>, reconocidos por el mismo suero hiperinmune (Figura 9). Como puede observarse en la misma figura, además de las bandas mencionadas se revelaron otras 2 de pesos moleculares de 50 y 25 KD, respectivamente, cuando se hicieron reaccionar los complejos inmunes con el suero hiperinmune, y con un suero normal de conejo. Por estos resultados y por sus características de peso molecular, consideramos que estas 2 bandas correspondían a cadenas pesadas y ligeras de IgG, hecho que confirmamos al enfrentar dichos complejos inmunes con un suero anti-IgG, y al aparecer las bandas mencionadas, junto con otras provenientes de fracciones de IgG producto de diferentes grados de reducción de las moléculas de dicho anticuerpo (Figura 9).

Las bandas antigénicas, presumiblemente correspondientes a antígenos de M. tuberculosis aparecieron también en 2 sueros controles, obtenidos de un sujeto sano y de un paciente con Lupus eritematoso, sin evidencia alguna de padecer tuberculosis (C3 y C4; Figura 8). El resto de --

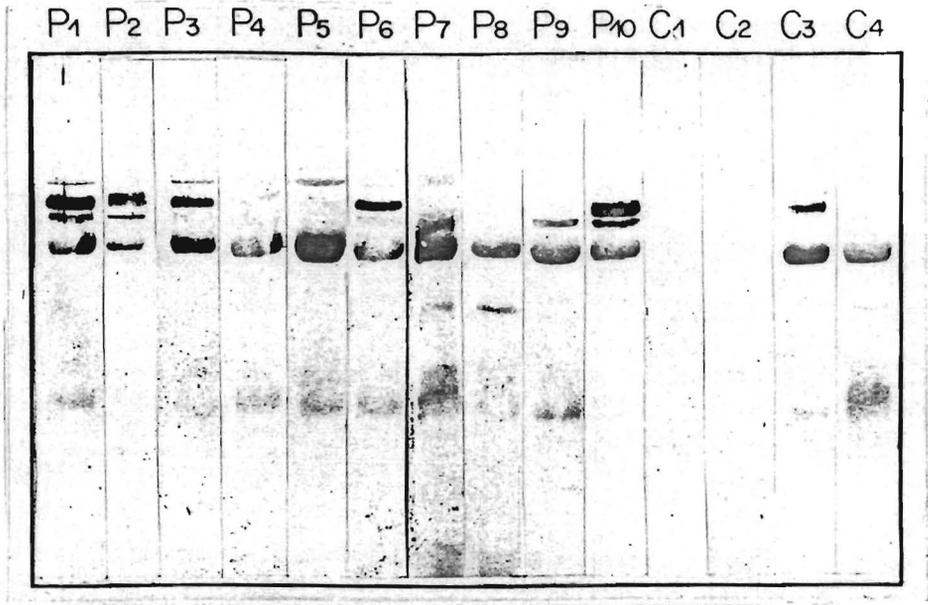


Figura 8. Complejos inmunes aislados de pacientes con tuberculosis (P1-P10), de sujetos sanos -- (C1 y C3) de enfermos con Lupus eritematosos sistémico (C4) y con artritis reumatoide -- (C2).

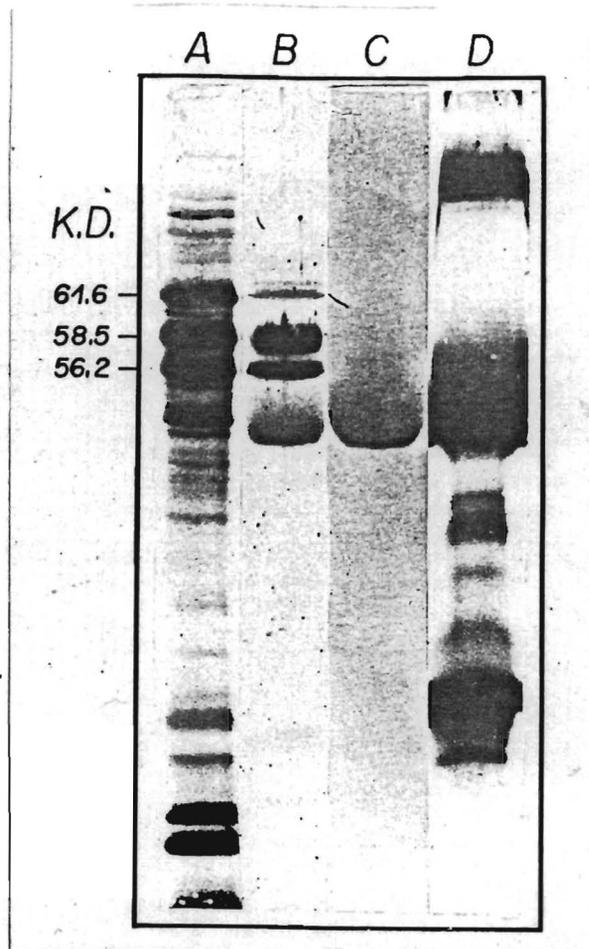


Figura 9. Immuno-electrotransferencia de complejos inmunes --  
aislados de pacientes con tuberculosis y revelados -  
con un suero hiperimmune anti *M. tuberculosis*. A =  
Extracto de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>RV vs suero hiperimmu-  
ne. B = Complejos inmunes de un paciente con tuber-  
culosis vs suero hiperimmune. C = Los mismos comple-  
jos inmunes vs suero normal de conejo, D = Los mis-  
mos complejos inmunes vs suero anti IgG de conejo.

los sueros control, fueron negativos en cuanto a la presencia de las bandas mencionadas.

2. Demostración de la especificidad de la reacción con el suero hiper--  
inmune

En esta serie de experimentos, los anticuerpos anti-M. tuberculosis presentes en el suero hiperinmune, se precipitaron, con antígenos de un extracto M. T. H<sub>37</sub>Rv. El suero hiperinmune, depletado, de esta manera de anticuerpos libres lo utilizamos como prueba en la inmunoelectrotransferencia, utilizando complejos inmunes de un paciente con tuberculosis, en los cuales habíamos demostrado la presencia de las bandas antigénicas mencionadas anteriormente.

En la Figura 10 se puede observar la desaparición de las bandas de 61.6, 58.5 y 56.2 KD al enfrentar los complejos inmunes mencionados con el suero hiperinmune bloqueado. (A), en comparación con el mismo suero sin bloquear (B).

Es interesante hacer notar que en el carril A de la misma figura, la banda de 25 KD de peso molecular, la cual consideramos que correspondía a cadenas ligeras de IgG se vuelve menos prominente (carril A) lo cual sugiere la presencia de algún antígeno no detectado en experimentos previos.

3. Separación, disociación e identificación de los componentes de los --  
complejos inmunes.

Por medio de la utilización de los diferentes métodos de puri

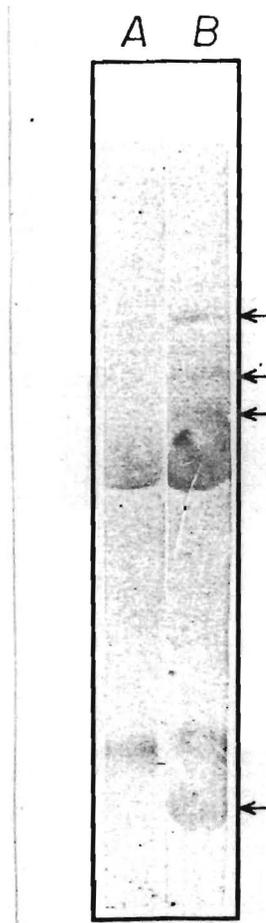
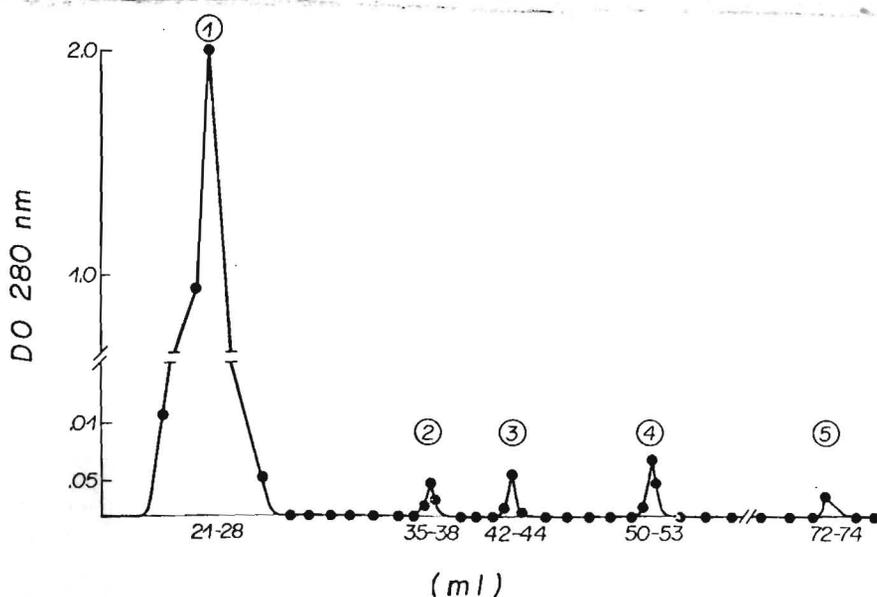


Figura 10. Immunoelectrotransferencia enfrentando complejos -  
inmunes con antígenos de M. tuberculosis con: A.  
Un suero hiperinmune depletado de anticuerpos espe-  
cíficos. B. El mismo suero hiperinmune completo.

ficación y disociación de los complejos inmunes (precipitación con PEG, -- cromatografía en columna de Sefarosa-proteína A y Sefadex G-200 en condiciones de disociación de Ag-Ac a pH ácido) logramos la separación de 5 -- fracciones (Figura 11), las cuales hicimos reaccionar contra antígenos -- del extracto de M.T. H<sub>37</sub>Rv por inmunoelectrotransferencia. En la fracción 1, demostramos la presencia de anticuerpos contra diferentes antígenos de M. tuberculosis, presentes en el extracto, incluidas las bandas identificadas en los complejos inmunes de pacientes con tuberculosis.

Por otro lado, las mismas fracciones se separaron por electroforesis y se transfirieron a papel de nitrocelulosa, para posteriormente enfrentarlás al suero hiperinmune anti M. tuberculosis, con el fin de -- identificar los componentes antigénicos del complejo inmune. Por los resultados obtenidos demostramos 5 bandas de pesos moleculares aproximados de 61, 58, 56, 23 y 20 KD en las fracciones 2, 3 y 4 resultantes de la separación cromatográfica.



## DISCUSION

En este trabajo abarcamos 3 aspectos relacionados a la caracterización de los antígenos de la especie Mycobacterium tuberculosis. En el primero de ellos comparamos las concentraciones relativas de proteínas, -- separadas por EGPA-DSS de 15 cultivos pertenecientes a esta especie bacteriana. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo sugieren la existencia de variedades o subespecies de M. tuberculosis, las cuales pueden estar relacionadas a características de virulencia y/o diferentes formas clínicas.

Sobre los antecedentes relacionados a la comprobación de subespecies, dentro del género Mycobacterium, está ampliamente demostrada la existencia de diversos serotipos en las especies M. avium y M. Kansasii -- (34 ). En referencia a la especie M. tuberculosis, no hay reportes previos sobre la existencia de subespecies; sin embargo Coates y cols. ( 6 ) demostraron diversidad antigénica en esta especie bacteriana, al enfrentar extractos de diferentes cepas de M. tuberculosis y M. bovis con una serie de anticuerpos monoclonales por el método de ELISA.

La notable diferenciación de las cepas bacterianas aisladas de enfermos con tuberculosis meníngea y pleural, por todos los métodos de agrupación utilizados, pueden representar una evidencia a favor de que estas formas extrapulmonares, sean producidas por variedades diferentes a las causantes de otras formas clínicas de tuberculosis, incluidas las formas pulmonares y renales. Estos resultados podrían explicar las marcadas

diferencias en la presentación de las diversas formas clínicas de tuberculosis, en particular en lo que respecta a la localización de la infección. Podría pensarse por ejemplo en la presencia de componentes de la cepa infectante de M. tuberculosis, que permitan su establecimiento en determinados tejidos del organismo y que estos constituyentes difieran estructuralmente en las distintas subespecies, de tal manera que estas variedades -- presentan diferentes afinidades por tejidos; por lo tanto dependería la forma clínica de tuberculosis de la variedad infectante. Este mecanismo hipotético de establecimiento de la infección por M. tuberculosis, será -- similar al encontrado en algunas cepas patógenas de Escherichia coli; en las cuales se ha demostrado la presencia de factores de colonización --- (CFAI y CFAII) que permiten su establecimiento en estructuras específicas del intestino delgado (16). La presencia de estos componentes se ha -- correlacionado con la tipificación de serotipos con una mayor virulencia. Existen otros ejemplos de variaciones intraespecíficos; en Haemophilus influenzae, se ha demostrado heterogeneidad antigénica en lipopolisacáridos y proteínas externas de membrana (28), involucrandose a determinadas variedades de especie con formas clínicas de infección específicas y con diferentes características de virulencia (29). Otros ejemplos los constituyen Neisseria gonorrhoea (16) y algunas especies de Salmonella.

Existen otros aspectos interesantes que se desprenden de las agrupaciones por los métodos de taxonomía numérica por promedios y mínimos, como es el hecho de que los cultivos H<sub>37</sub>Ra y BCG (cepas avirulentas) se agruparon en el mismo conjunto (grupo # 1) mientras que la cepa virulenta H<sub>37</sub>Rv formó parte con el cultivo # 104 de un grupo diferente (grupo # 2).

Esta forma de agrupación sugiere la presencia en las micobacterias de factores relacionados a virulencia, que pueden ser detectados o incluso caracterizados mediante estos métodos taxonómicos. Esta hipótesis se apoya además en el hecho de que el cultivo 524, el cual forma parte también del grupo # 1, fué aislado de una paciente de edad muy avanzada, con una tuberculosis renal con poca sintomatología clínica, colateral a otros padecimientos; por otro lado el cultivo 104, fué obtenido de un paciente hospitalizado en el INER, con tuberculosis pulmonar muy avanzada, sin evidencia alguna de mejoría con el tratamiento antifímico.

Estos supuestos factores de virulencia en M. tuberculosis, podrían ser los mismos componentes responsables del establecimiento de estas bacterias en diferentes tejidos o bien ser componentes independientes. En el primer caso las características de adhesividad a tejidos del organismo serían los factores determinantes de la patogenicidad de estas bacterias, como es el caso de Escherichia coli enterotoxinogénico, de forma tal que estas propiedades de adherencia le permitiera a las bacterias sobrevivir y establecerse en tejidos con los cuales presente mayor afinidad. un antecedente interesante lo constituyen los trabajos de Collin y Montalbine ( ), los cuales comprobaron fenómenos de adaptación pulmonar de la cepa H<sub>37</sub>Rv de M. tuberculosis al administrar por vía intravenosa una suspensión de bacterias de esta cepa, aisladas previamente de pulmones de otros ratones infectados. Este fenómeno que Collins y Montalbine describieron como "adaptación", consistió en que estas células bacterianas provenientes de pulmones, al ser reinoculados a otros ratones se establecieron en su mayoría en los mismos órganos. Estas bacterias "adaptadas" a pulmones mostraron una mayor virulencia al ser inoculados nuevamente a lotes de ratones. Una explicación alterna de estos resultados serían la in-

terpretación no como un fenómeno de adaptación de las células de M. tuberculosis sino de selección de una variedad de la cepa H<sub>37</sub>Rv con mayor afinidad a tejido pulmonar por la presencia de algún factor de colonización y - que este supuesto factor de colonización fuera además un factor de virulencia.

Otra posibilidad de interpretación de los resultados de nuestro trabajo, sería la presencia de factores independientes de colonización y virulencia. Una de las formas de diferenciar e identificar estos factores en los patrones electroforéticos, sería alterando los valores de Concentraciones relativas de proteínas en diferentes zonas electroforéticas, de tal manera que lográramos un desplazamiento de los cultivos pertenecientes a un grupo hacia otro.

Otro resultado interesante fué el obtenido mediante la comparación del cultivo de BCG con los demás cultivos incluidos en este trabajo. El BCG se agrupo con valores relativamente altos de similitud con el 46% - de los cultivos incluidos en este trabajo. Este resultado sugiere que esta cepa bacteriana, utilizada comunmente como vacuna contra la tuberculosis, muestra diferencias antigénicas considerables con más de la mitad de las - cepas de M. tuberculosis, infectantes del hombre. Esto podría ser un factor importante, en la falta de eficacia de la vacuna BCG. La falla de esta vacuna podría deberse a que el BCG estimulara la respuesta inmune dirigida solamente contra determinadas variedades antigénicas con las cuales compartiera componentes determinantes del establecimiento de la enfermedad, una situación parecida a la observada en haemophilus influenzae en la que se demostró la ineficacia de una vacuna preparada contra la variedad "B" de

esta especie en infecciones producidas por otras variedades (16).

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo; son preli-  
minares dado el limitado número de cultivos estudiados provenientes de pa-  
cientes con formas extrapulmonares de tuberculosis y la falta de informa-  
ción clínica de los pacientes de los cuales se obtuvieron dichos cultivos.  
De ser corroborados estos resultados, la presencia de variedades de ---  
M. tuberculosis y de factores estructurales determinantes del estableci-  
miento de la infección por esta especie bacteriana, surgirían nuevas posi-  
bilidades del desarrollo de métodos diagnósticos mas específicos y de va-  
cunas con una mayor eficacia y especificidad.

En el segundo aspecto sobre el reconocimiento de antígenos de  
M. tuberculosis por anticuerpos de pacientes con esta enfermedad, enfren-  
tamos sueros de estos enfermos contra un extracto de la cepa H<sub>37</sub>Rv de --  
M. tuberculosis por inmunoelectrotransferencia. Los sueros de pacientes  
en su conjunto reconocieron una gran cantidad de componentes antigénicos  
en el extracto de M.T. H<sub>37</sub>Rv (aproximadamente 70 bandas); el reconocimien-  
to de estos antígenos en los pacientes con tuberculosis fue muy heterogé-  
neo (no se encontraron patrones idénticos entre ninguno de los pacientes).  
Estos resultados apoyan a los obtenidos en la primera parte de este traba-  
jo, sobre la heterogeneidad de la especie M. tuberculosis, ya que el encon-  
trar patrones de identificación antigénica tan diversos en los sueros de -  
pacientes infectados con esta especie bacteriana, podría deberse a una he-

terogeneidad antigénica en las cepas infectantes, por supuesto que no podemos descartar como posible explicación de estos resultados que esta heterogeneidad en el reconocimiento antigénico se deba a variabilidad de la respuesta inmune de los pacientes debida a factores biológicos relacionados con dicha respuesta, sin embargo estas 2 posibilidades no son excluyentes una de la otra. Una evidencia en contra de la primera posibilidad fue que esta diversidad del reconocimiento se observó incluso entre pacientes con la misma forma clínica de tuberculosis. Por supuesto que -- habría de corroborarse esta afirmación con un tipo de análisis como el -- resultado en la comparación de las cepas de M. tuberculosis, ya que incluso en el análisis visual de los electroferogramas de las distintas cepas no se logró definir ningún tipo de agrupación.

De la gran variedad de antígenos detectados por los pacientes 4 de ellos mostraron una mayor frecuencia de reconocimiento por dichos -- sueros y una baja frecuencia de reconocimiento por los sueros y una baja frecuencia de reconocimiento por los sueros de sujetos sanos y de los en-

fermos con nocardiosis (menor de 20%), sin embargo los sueros obtenidos de pacientes con histoplasmosis mostraron una alta frecuencia de reacción con dichos antígenos (mayor al 70% en algunos casos). La interpretación de estos resultados resulta difícil, dado el hecho de que los géneros *Mycobacterium* e *Histoplasma* no presentan una gran semejanza, en cuanto a su constitución antigénica, en cambio la pared celular del género nocardia presenta características estructurales muy semejantes a las del género *Mycobacterium* ( 7 ).

Podría ser que aunque no exista una gran reactividad cruzada entre estas especies, utilizando métodos cuantitativos, existen determinantes antigénicos de histoplasma compartidos con el género *Mycobacterium*, de tal manera que estos epitopes estuvieran presentes en diferentes proteínas de este género bacteriano, más aún, que diferentes bandas observadas en la I.E.T. puedan ser parte de una misma proteína original con determinantes antigénicos repetidos a lo largo de esta supuesta proteína precursora de dichas bandas. Esto explicaría el alto grado de reconocimiento de diversas bandas antigénicas por sueros de pacientes con histoplasmosis, sin que exista una correlación de estos resultados con una reacción cruzada, cuantitativamente similar entre ambas especies. Estos resultados pueden representar un inconveniente, en lo que respecta a la utilización de estos antígenos para el desarrollo de un inmunodiagnóstico, sin embargo queda la posibilidad de una diferenciación cuantitativa de las reacciones entre sueros de pacientes con histoplasmosis y con tuberculosis, lo cual evitaría este tipo de reacciones falsas positivas. Esto se podría realizar aislando estos antígenos, y utilizándolo en métodos cuan-

titativos como ELISA y radioinmunoensayo. Otra posibilidad en la implementación de un inmunodiagnóstico con estos antígenos y utilizándolos en métodos cuantitativos como ELISA y radioinmunoensayo. Otra posibilidad en la implementación de un inmunodiagnóstico con estos antígenos e incluso - también con algunos otros con frecuencia más baja de reconocimiento por el suero de pacientes, sería investigar diferentes combinaciones de antígenos en relación a su frecuencia de reconocimiento por los anticuerpos de - pacientes, en este caso el método diagnóstico podría ser la misma IET.

Una de las ventajas que ofrece la IET sobre estos métodos inmunológicos utilizados anteriormente en la tuberculosis con fines diagnósticos es precisamente el poder realizar análisis individuales de una gran cantidad de antígenos presentes en una misma preparación antigénica, de - tal manera que los resultados obtenidos se pueden utilizar de diversas -- maneras.

Finalmente logramos identificar un grupo de antígenos de -- M. tuberculosis presentes en complejos inmunes circulantes en el 78% de - los pacientes con tuberculosis estudiados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Carr ( 5 ) y Samuel ( 35 ). Estos autores encontraron concentraciones elevadas de CIC en el 68% y 70% de los pacientes con tuberculosis activa utilizando fijación a  $C_{1q}$  y aglutinación en latex, -- respectivamente. La utilización de la IET nos permitió identificar a 3 - bandas antigénicas de pesos moleculares de 61.6, 58.5 y 56.2 KD y 2 más de pesos moleculares cercanos a 25 KD. en dichos complejos inmunes, sin embargo en CIC de dos sujetos control identificamos los mismos antígenos re

conocidos también por un suero hiperinmune anti-M. tuberculosis mediante una serie de experimentos de bloqueo de anticuerpos específicos anti-M. tuberculosis en el suero hiperinmune y de disociación e identificación de los componentes de los CIC, demostramos que los resultados obtenidos no eran producto de una reacción inespecífica. May y cols. (27) reportaron el reconocimiento por un suero anti-BCG por el método de Outcherlony, de CIC aislados de sueros de sujetos normales. Estos autores interpretaron estos resultados como una reacción cruzada entre los componentes de estos CIC con antígenos microbianos. Si bien, la posibilidad de la presencia de antígenos de otras especies bacteriana que compartan determinantes antígenos con M. tuberculosis, no puede ser descartada, el hecho de que los antígenos identificados en los CIC de los sujetos control tengan los mismos pasos moleculares que los de los pacientes con tuberculosis y que correspondan a bandas similares presentes en el extracto de M. tuberculosis analizado, nos hacen pensar que estos antígenos realmente provienen de bacterias de esta especie. Una pregunta que surja al analizar las características de los CIC de los individuos utilizados como controles, es si realmente estos sujetos están exentos de tener una infección por M. tuberculosis. Uno de estos individuos considerado como sano, presentó una reacción fuertemente positiva al PPD; radiográficamente se observó una lesión pulmonar valorada como primo-infección reciente, además que este individuo trabaja en un laboratorio dedicado al aislamiento de Mycobacterium. Por estos antecedentes sospechamos que pueda tener una tuberculosis pulmonar subclínica, es decir sin las manifestaciones características de esta enfermedad. Otro de los individuos control en el cual demostramos dichos antígenos en CIC circulantes, fue un paciente con lupus eritematoso, enfermedad autoinmune en

la cual el sistema inmunocompetente se encuentra comprometido, además que el tratamiento utilizado en este padecimiento consiste en la administración de medicamentos inmunosupresores, por lo que no sería raro que en estas condiciones existiera una infección tuberculosa que no provocara aún la sintomatología clínica característica de esta enfermedad. Otra posibilidad de interpretación de estos resultados puede ser la posibilidad de que sin existir una infección reciente por M. tuberculosis, persistan antígenos circulantes provenientes de contactos antiguos con esta bacteria. La posibilidad de detectar antígenos de micobacterias en sueros de pacientes con tuberculosis y su potencial para el diagnóstico de esta importante enfermedad son obvios. Los resultados sobre la caracterización de los antígenos presentes en CIC de pacientes con tuberculosis pueden representar un primer paso para el desarrollo de un nuevo método diagnóstico de la tuberculosis mediante la detección de estos antígenos en sangre, además de abrir nuevas posibilidades sobre la investigación del papel que puedan jugar en la patogenia de esta enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Anonymous. An evaluation of a reference system for antigens of *Mycobacterium tuberculosis*.  
Am. Rev. Res. Dis. 106: 142-147, 1972.
2. Benjamin R.G. and Daniel T.M.; Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme linked immunosorbent assay of antibody to mycobacterium tuberculosis antigens.  
Am. Rev. Res. Dis. 1982 126: 1013-1016.
3. Bennett J.A. Rao V.S. and Mitchell M.S.  
Systemic bacillus calmette-Guerin. (BCG) activators natural supressor cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5142-5144 1978.
4. Bona C.F. Andebert, Jay D. and Inedid L.  
Cell supression in PPD-induced blast specific response of human periph<sub>er</sub>al blood lymphocytes.  
Clin. Exp. Imm. 26: 258-266 1976.
5. Carr R.I.; Beunda M.J., et al.  
Immune complexas and antibodies to BCG in sera from patients with mycobacterial infections.  
Clin. Exp. Immunol. 39: 562-569, 1980.
6. Coates A.R.M.; Hewitt J. Allen B.W. Ivanyl J and Mitchison D.A.  
Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies.  
Lancet July 25; 167-169 1981.
7. Cummins, C. Chemical and antigenic studies on cell walls of *Micobacteria*, *Corynebacteria* and *Nocardias*.  
Am. Rev. Res. Dis. 92: 63-71, 1965.

8. Chaparas S.D.  
Immunity in tuberculosis  
WHO 60(4): 447-462 1982.
  
9. Daniel T.M., Good R.C. and Janicki B.W.  
Immunoelectrophoresis of Mycobacterium tuberculosis antigens.  
Comparative analysis of cell extract and culture filtrate antigens.  
Am. Rev. Res. Dis. 112: 639-644 1975.
  
10. Daniel T.M. and Janicki B.W.  
Mycobacterial antigens: A review of their isolation, chemistry and immunological properties microbiol.  
Rev. 42: 84-113 1978.
  
11. Engers H.D., Bloom R. and Godal T.  
Monoclonal antibodies against mycobacterial antigens immunology.  
Toda 6(12): 345-376 1985.
  
12. Ferro G. and Ames L.  
Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs.  
J. Bacter. Chem. 249(2): 634-644, 1974.
  
13. Ganczakowski M. and Leslie G.Q.  
The binding of rabbit IgG and its enzymatically derived fragments to homologous peritoneal macrophages.  
Immunology 36: 487-494 1979.
  
14. Gold A.M. and Fahrney  
The mechanism of reactivation of phenylmethrane-sulfonyl-a-chemotrypsin  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 10: 55-59 1963.

15. Hobbs M.V. Morgan E.L. and Schener W.V. Weigle W.O.  
Binding and processing of immunostimulatory Fc fragments by the murine  
Macrophage Cell Line P388D<sub>1</sub>.  
Cell. Immunol. 90: 74-84 1985.
16. Jackson G.G. and H. Thomas Ed. The Pathogenesis of Bacterial  
Infectious Bayer-Symposium VIII Springer, Verlag-Heidelberg (Germany)  
1985.
17. Johnson N.M., McNicol M.W., Burton-Ree E.J. and Nowbray J.F.  
Circulating immune complexes in tuberculosis.  
Thorax 36: 610-617 1981.
18. Kalish S.B., Rodin R.C., Phair J. P. et al.;  
Use of enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential  
diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans.  
J. Infect. Dis. 147: 523 1980.
19. Kennedy P.H., Fallon R.S.  
Tuberculosis meningites  
JAMA 241: 264-268 1979.
20. Kersters K. and De Ley J.  
Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of  
their electrophoretic protein patterns.  
J. Gen. Microbiol. 87: 333-342 1975.
21. Kim T.C., Blackman R.S.  
Heatwdekmatal acid fast in asputum smears of patients with pulmonary  
tuberculosis.  
Am. Rev. Res. Dis 129: 264 1984.

22. Kniker W.T. and La Borde J.B.  
The separation of mycobacterial antigens by ion-exchange chromatography.  
Am. Rev. Res. Dis. 89: 29-40 1964.
23. Kobak B.M. and Yotis W.W.  
Solubilization and electrophoretic analysis of Staphylococcus aureus membrane proteins.  
Biochem. Bioph. Acta 687: 238-246 1982.
24. Laemmli V.K.  
Leavage of structural proteins during assembly at the head of bacteriophage T<sub>4</sub>.  
Nature (Lond) 227: 680-685 1970.
25. Lenzini L., Roltoli P. and Roltoli L.  
The spectrum of human tuberculosis.  
Clin. Exp. Immunol. 22: 230 1977.
26. Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.  
Protein measurement with folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193: 265-275 1951.
27. May L.J., Katelus J., Henson P. and Dreisen R.  
The purification of circulating immune complexes in tuberculosis.  
Am. Rev. Res. Dis. 128: 920-925 1983.
28. Murphy T., Dudas K., Mylotte J.M. and Apicella M.A.  
A subtyping system for nontypable haemophilus influenzae based on outer - membrane proteins.  
J. Inf. Dis. 147(5): 838, May 1983.

29. Murphy T. and Apicella M.  
Antigenic heterogeneity of outer membrane proteins of nontypable haemophilus influenzae is a basis for a serotyping system.  
Infect. Immun. 50(1): 15-21 Oct. 1985.
30. Nustafa A.S. and Godal T.  
BCG-induced suppressor T cells optimal conditions for "in vitro" induction and mode of action.  
Clin. Exp. Immunol. 62: 474-481 1985.
31. Pacheco C., Olvera R., Herrera M.  
Panorama epidemiológico y control de la tuberculosis en la República Mexicana.  
Sal. Pub. Mex. 23: 25-259 1980.
32. Parra C., Montañó L.F., Huesca M., Rayon I., Willms K. and Goodsaid F.  
Inhibition of mitogenesis induced by phytohemagglutinin and lens culinaris in adherent-cell supernatants treated with protein extract of Mycobacterium tuberculosis.  
Infect. Immun. 52(1) 309-313 1986.
33. Roberts D.B., Wright G.L. et al.  
Characterization and comparison of mycobacterial antigens by two-dimensional immunoelectrophoresis.  
Infect. Immun. 6: 564-573 1972.
34. Ratledge C. and Standford J.  
The Biology of the Mycobacteria, Physiology, Identification and Classification. Vol. 1. Academic Press Inc. (London) LTD. 1982.
35. Samuel A., Ashtekar M. and Gamatra R.D.  
Significance of circulating immune complexis in pulmonary tuberculosis.  
Clin. Exp. Immunol. 58: 317-324 1984.

36. Sneath P.H.A. and Sokal R.R.  
"Numerical Taxonomy" Freeman San Francisco 1973.
37. Ihole J.E., Dawerse H.G., Das p.K. et al.  
Cloning of Mycobacterium bovis BCG DNA and expression of antigens in Escherichia coli.  
Infect. Immun. 50: 800-806 Dec. 1985.
38. Styblo K. and Ravillon A.  
II. Stimated global incidence of smear positive pulmonary tuberculosis un realiability of officially reported figures on tuberculosis.  
Union Againsth Tuberc. 56: 118-126 1981.
39. Towbin H., Stenelin T. and Gordon J.  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sneets: Procedure and some applications.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4350-4354 1970.
40. Virella G., Kilpatrick J.M., et al.  
Isolation of soluble immune complexes from human serum.  
Methods in Enzymology 74: 644-663 1981.
41. Winters D.W. and Cox R.A.  
Serodiagnosis of tuberculosis by radioimmunoassay.  
Am. Rev. Resp. Dis. 124: 582-585 1981.
42. Youmans G.P. Ed. Tuberculosis. W.B. Saunders Company 1979.
43. Young R.A., Bloom B.R. et al.  
Dissection of Mycobacterium tuberculosis antigens using recombinant DNA.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2583-2587 May 1985.