

24. 47

2009 DE JULY 1983
VOLUMEN 11 N. 1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales ZARAGOZA

Caracterización de Antígenos de M. tuberculosis en pacientes con tuberculosis meníngea y pleural por el método de Inmunolectrotransferencia.

T E S I S

Que para obtener el título de QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

MARTHA TORRES ROJAS



México, D. F.

Febrero 1988

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

CONTENIDO

		Hoja
1	INTRODUCCION	1
2	Planteamiento del Problema	9
3	Fundamentacion de la Elección del tema	10
4	Objetivos	13
5	Hipotesis	14
6	Material y Métodos	15
7	Resultados	34
8	Discusion de Resultados	43
9	Conclusiones	47
10	Apendice	48
11	Bibliografia	52

Abreviaturas

Ac.	Anticuerpo
Ag.	Antígeno
Albumina Egg	Albumina de huevo
BSA	Albumina serica bovina
D.O.	Densidad Optica
ELISA	Inmuno-Ensayo-Enzimatico
IEF	Inmuno-electroforesis
IET	Inmuno-Electrotransferencia ó Western Blotting
Kd	Kilo dalton
LCR	Líquido Cefalo Ráquideo
PBS	Solución salina de fosfatos
PBST	Solución salina de fosfatos-Tween
PBY	Medio de cultivo Proskawer, Beck y Youmans
PM	Peso Molecular
PMSF	Phenyl metyl sulfonil fluoride
Rf	Movilidad relativa
RIA	Radio-Inmuno-Análisis
Tb	tuberculosis
TBM	Tuberculosis meníngea.

I. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES

La tuberculosis continúa representando un problema de salud pública en México, ocupando el 11 lugar de mortalidad en nuestro país (20). En la actualidad se estima que la padecen 30 millones de seres humanos, siendo la incidencia anual de 8 millones en el mundo (28); si bien este padecimiento muestra predominio pulmonar, existen diversas formas clínicas que afectan diferentes tejidos del organismo (18). Entre ellas la tuberculosis meningea (TBM) y pleural.

La tuberculosis meningea es una de las formas clínicas más grave de la tuberculosis. Además de su elevado índice de mortalidad, cuando no se identifica oportunamente para su tratamiento medicamentoso, en los pacientes que sobreviven deja graves secuelas de tipo mental, motriz y sensorial que son incapacitantes para una vida productiva e independiente por lo que este problema adquiere una enorme trascendencia socioeconómica, sobre todo considerando que se trata de una enfermedad que afecta preponderantemente a la infancia, adolescencia y adultos jóvenes.

La tuberculosis meníngea (TBM) ha sido clasificada entre las meningitis crónicas pero no es raro encontrar cuadros de inicio de evolución agudos que provocan una seria dificultad -- en el diagnóstico diferencial con otras infecciones del Sistema Nervioso Central SNC; bacterianas, micóticas, virales y parasitarias cuya incidencia también es alta en nuestro medio.

Por otra parte la identificación bacteriológica del germen causal (Mycobacterium tuberculosis ó Mycobacterium bovis), es muy difícil de comprobar en los LCR a través de los cultivos en medios especiales y observación en frotis teñidos.

Esta dificultad hace que frecuentemente se retrasen las medidas terapéuticas indispensables o que se decida administrar tratamientos antifímicos específicos en casos no comprobados. Recientemente han sido introducidos algunos métodos - inmunológicos para detectar antígenos microbianos.

En tuberculosis meníngea, los métodos que hasta ahora se han usado son los inmunoenzimáticos con técnicas de ELISA directa e indirecta, Radioinmunoanálisis y Latex, en 1983, se publicó uno de los primeros trabajos en que realmente se demostraba la utilidad de técnicas rápidas, como el método - de ELISA para la detección de antígenos micobacterianos usando un anticuerpo anti BCG en el cual se obtuvieron resultados

con una sensibilidad del 81% y una especificidad del 95% (2). Estos resultados han sido confirmados por otros grupos (11).

Utilizando otras técnicas también se ha demostrado la presencia de antígenos micobacterianos en Líquido Cefalo---Raquídeo de sujetos con tuberculosis meníngea. Krambovitis y col., usando el método Latex, detectaron antígenos micobacterianos en Líquido Cefalo Raquídeo de pacientes con TBM obteniendo una sensibilidad del 94% y una especificidad del 99%. Debido a la sencillez y la facilidad de realizarlo en cualquier laboratorio, aún en países en desarrollo probablemente constituya el método de elección para el diagnóstico de tuberculosis meningea.

La técnica de Radioinmunoanálisis tiene una sensibilidad del 82% y una especificidad del 90% para la detección de antígenos micobacterianos presentes en muestras clínicas como; suero, LCR, resultados muy similares a los obtenidos por el método de ELISA (33).

Sin embargo, debido a que las técnicas de ELISA, RIA y Latex son técnicas cuantitativas y no cualitativas, se desconoce las características de los antígenos presentes en las muestras de LCR de pacientes con tuberculosis meningea, lo cual facilitaría el desarrollo de mejores técnicas de diagnóstico, así como un mejor entendimiento de la enfermedad

1.2 IDENTIFICACION Y PURIFICACION DE ANTIGENOS DE M.tuberculosis

Knicker y Laborde (15) 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 en otras especies e incluso en diferentes géneros bacterianos. En un intento para uniformizar los criterios de clasificación de estos antígenos Daniel, Affronti y otros grupos de investigación (1), propusieron la inmunolectroforesis (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 filtrado de cultivos, en 11 bandas con diferente movilidad electroforética.

La IEF utilizando los mismos sueros de referencia, ha sido empleada 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 # 1).

El desarrollo de métodos con una mayor sensibilidad, como es el caso de la electroforesis en una y dos dimensiones (23) y la inmunolectroforesis en cohete (Rocket); - ha demostrado una gran cantidad de componentes antigenicos en los extractos de M. tuberculosis.

Recientemente Young y col. (35) y Thole y cols. (30) utilizando la clonación molecular del DNA de cepas de esta especie bacteriana, lograron aislar algunos antígenos incorporados y expresados en el genoma de clones de E.coli.

La posibilidad de existencia de heterogeneidad antigenica en diversas especies bacterianas patógenas del hombre incluida M.tuberculosis complica aún más la búsqueda de antígenos para el desarrollo de métodos inmunodiagnósticos. En el caso del genero Mycobacterium, se ha demostrado la existencia de variantes antigenicas en las especies M. avium, M. kansasii. En referencia a la especie M. tuberculosis, ho hay reporte en la literatura de la comprobación de subespecies. Sin embargo, Coates y cols. (3) demostraron la diversidad antigenica de esta especie

TABLA I

ANTECEDENTES SOBRE LA PURIFICACION DE ANTIGENOS
MICOBACTERIANOS POR DIFERENTES METODOS FISICOQUIMICOS

Investigador	Métodos
- Seiberth	Precipitación con etanol-ác.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 poliacrilamida.
- Yoneda y Fukui; Daniel, Ferguson Kuwabara	Precipitación con sulfato de amonio, filtración en geles, cromatografía de intercambio iónico y electroforesis.
- Azuma y cols; Yumamura y cols. Misaki y cols.	Extracciones alcalinas, precipitación con etanol y cromatografía de intercambio iónico.
- Daniel	Cromatografía de afinidad con Conca navalina A
- Daniel; Anderson	Cromatografía de afinidad inmunoabsorbente.

bacteriana, al enfrentar extractos de diferentes cepas de M. tuberculosis con una serie de anticuerpos monoclonales por el método de ELISA.

1.3 UTILIZACION DE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO DE SODIO E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA EN EL ANALISIS DE PROTEINAS BACTERIANAS.

El desarrollo de métodos como la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio (PAGE-SDS) (7,17) y la Inmunoelectrotransferencia (IET) (31) han abierto nuevas posibilidades analíticas de los componentes antígenicos de especies bacterianas. La PAGE-SDS 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 actualmente se utiliza en el análisis de diferentes géneros y especies bacterianas (7).

La IET combina la gran capacidad de resolución y caracterización fisicoquímica de la PAGE-SDS con métodos -- inmunoenzimáticos y radioinmunológicos. Este método ha -- llegado a ser un procedimiento rutinario para la caracterización bioquímica de macromoléculas (13), consistente en la transferencia por medio de un campo eléctrico de antígenos previamente separados por PAGE-SDS, del gel de poliacrilamida a papel de Nitrocelulosa, donde se llevan a cabo reacciones de detección de los distintos componentes antígenicos por anticuerpos específicos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los proyectos del Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, comprende el desarrollo de técnicas inmunodiagnósticas que permitan establecer el diagnóstico de Tuberculosis. Es por ello que se pretende emplear la técnica de Inmunoelectrotransferencia ó Western Blotting, para identificar y caracterizar los antígenos proteícos de M. tuberculosis presentes en L.C.R.

La utilidad de la identificación de estos antígenos es el facilitar la producción de anticuerpos específicos ya sea monoclonales o policlonales, lo cual conduciría al desarrollo posterior de técnicas específicas para inmunodiagnóstico.

3. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

La tuberculosis ha representado un problema de salud pública desde hace muchos años. Aunque la mortalidad ha disminuido su incidencia es elevada y en años recientes la incidencia de la tuberculosis extrapulmonar se ha visto notablemente aumentada. En tanto que el método ideal para el diagnóstico de tuberculosis no ha sido descrito. Las formas tradicionales de diagnóstico comprenden:

- a) Métodos bacteriológicos
- b) Métodos clínicos y radiológicos
- c) Métodos inmunológicos

a) Métodos bacteriológicos:

1.- Baciloscopia:

El frotis para la búsqueda de bacilos ácido alcohol resistentes, es el método más usado para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Sin embargo, en series más recientes su sensibilidad fué de 75% con un 25% de falsas negativas (29). La sensibilidad de este procedimiento es aún más baja en infecciones como pleuritis y meningitis tuberculosa. (29).

2.- Cultivo del agente infeccioso:

El cultivo de micobacterias es lento y tedioso los resultados tardan de 2 a 4 semanas en ser conocidos, usando los métodos convencionales (29) y por lo tanto su resultado es de poco valor práctico para el manejo rutinario; además en nuestro país existen pocos laboratorios con las facilidades para el cultivo de micobacterias.

b) Métodos clínicos y radiológicos:

El cuadro clínico y radiológico no son específicos de la enfermedad pudiéndose presentar en otras diferentes a tuberculosis. (18)

c) Métodos Inmunológicos:

De los procedimientos serológicos existen algunos trabajos que han demostrado la utilidad de la detección de anticuerpos para el diagnóstico de tuberculosis. De ellos se han usado ELISA y Radioinmunoanálisis (2,11,33). Sin embargo, los resultados son poco útiles por la alta frecuencia de reacciones cruzadas con otros microorganismos y por la presencia de anticuerpos anti-micobacteria en la población general.

La prueba intradérmica utilizando PPD, que es un método de diagnóstico en algunos países, pierde su utilidad en México por el uso de BCG y la alta prevalencia de PPD positivo en la población general, además en algunos casos con infección activa, este puede ser negativo por factores inmunosupresores propios de la enfermedad (4]. Por todo lo anterior se hace necesario el desarrollo de pruebas inmunológicas rápidas y específicas para el diagnóstico de tuberculosis.

Mediante la técnica de ELISA (2,11), Radioinmunoanálisis (33) y más recientemente el uso de las pruebas de Latex (36) se han detectado antígenos solubles circulantes en suero y L.C.R. de pacientes con tuberculosis. Este hecho hace posible pensar en alguna técnica inmunológica lo suficientemente sensible para la detección y caracterización de antígenos micobacterianos, que permita el desarrollo de métodos de diagnóstico más específicos.

4. OBJETIVOS:

- Aplicar y estandarizar la técnica de Inmuno-electrotransferencia, en el análisis de proteínas antigénicas en L.C.R. de pacientes con tuberculosis meníngea.
- Caracterización de antígenos de M. tuberculosis en L.C.R. de pacientes con tuberculosis meníngea.

5. HIPOTESIS

Si la existencia de antígenos micobacterianos en suero y L.C.R. de pacientes con tuberculosis ha sido demostrada mediante técnicas como ELISA, RIA, y Latex, entonces usando la técnica de Inmunoelectrotransferencia, la cual es altamente sensible, será posible la separación e identificación de pequeñas cantidades de antígenos proteicos de M. tuberculosis en L.C.R. de pacientes con tuberculosis meníngea, lo cual sería de gran utilidad para el desarrollo de técnicas específicas para inmunodiagnóstico de tuberculosis.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 MATERIAL

6.1.1. REACTIVOS:

- Medio de cultivo PBV
- Sulfato de amonio
- PMSF Phenyl-sulfonil fluoride
- Sol. salina de fosfatos 0.01 M pH 7.2 (PBS)
- Fenol
- Hidroxido de aluminio
- Sol. amortiguadora de boratos
- Sol. salina de fosfatos 0.01 M pH 7.2-Tween 20 al 0.1%
- Anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa
- Sol. amortiguadora de citratos 0.01M pH 5
- o-Fenilendiamina
- H_2O_2 al 3%
- Sol. de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N
- Tartrato de sodio al 2%
- Sulfato de cobre al 1%
- Reactivo de folín Ciocalteau
- Sol. estandar de proteinas (albumina serica bovina 0.1mg/ml)
- Sol. monomera de acrilamida (sol. Stock)

- Sol. amortiguadora Tris-HCl 1.5M pH 8.8
- Sol. amortiguadora Tris-HCl 0.5M pH 6.8
- Dodecil sulfato de Sodio al 10% (SDS al 10%)
- Sol. amortiguadora 0.125M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol.
- Persulfato de amonio.
- TEMED N,N,N,N Tetrametilen-diamina.
- Azul de coomassie 0.125%, Metanol 50%, ácido acetico 10%
- Sol. amortiguadora de transferencia 0.25M Tris, 0.192M glicina, 20% Metanol.
- Albumina serica bovina al 3% en PBS-T 0.1%
- Marcadores de pesos moleculares
- Protefna A - Biotina
- Streptoavidin-Peroxidasa
- o-Cloro-Naftol
- papel de Nitrocelulosa 0.45um.

6.1.2 EQUIPO:

- Incubadora a 37°C
- Campana extractora de alta seguridad LABCOM patógenos
- Balanza analitica Sartorius
- Centrifuga refrigerada Beeckman
- Agitador magnetico SOLBAT
- Refrigerador 4°y 20°C American
- Revco -70°C.
- Bomba de vacio Feli-Welch modelo 1400 doble sello
- Espectrofotometro Beeckman
- Lector de ELISA Dynatech
- Protean II Slab Cell Bio-Rad Laboratories
- Fuente de poder electronica VIMAR
- Baño enfriador CIUNAM
- Trans-Blot Cell Bio-Rad Laboratories

6.1.3. MATERIAL:

- Matraces Erlenmeyer 250 ml.
- Asa bacteriológica
- Probeta graduada de 50, 100, 1000 ml.
- Equipo de filtración de 300 ml Millipore
- Membranas microbiológicas de 0.8, 0.45 μ m tipo HA y 0.22 μ m tipo GS Millipore Corporation Bedford
- pipetas serológicas 1, 5 y 10 ml.
- Placas de ELISA Dynatech Immunolon II 96 pozos
- Micropipetas 50, 250, 1000 μ l.
- Recipientes PyroRey
- Barras magnéticas
- Papel watman # 1 y 3.

6.1.4. MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepa H₃₇RV de Mycobacterium tuberculosis obtenida del laboratorio clínico del INER. -
- Conejos Nueva Zelanda procedentes del Lab. de Salubridad
- Se estudiaron 18 LCR*de pacientes con diagnóstico de tuberculosis meníngea, 3 de los mismos asociados a SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida). -

Como controles se estudiaron 2 LCR de pacientes con Lupus eritematoso, y 5 LCR de sujetos sanos.

*Los LCR se obtuvieron de los Institutos Nacionales de Neurología, Enfermedades Respiratorias y Nutrición. -

6.2 METODOS

6.2.1. Obtención del extracto antigenico *M. tuberculosis* H₃₇RV

La cepa de *M.tuberculosis* H₃₇rv fue sembrada en el medio de cultivo de Proskawer, Beck y Youmans (PBY) en matraces Erlenmeyer de 250 ml. conteniendo 100 ml de medio, e incubada a 37°C hasta que se alcanzo la fase estacionaria de crecimiento, esto es, hasta que la superficie del medio PBY estuvo cubierta uniformemente por una capa de masa bacteriana. El medio de cultivo se separó de la masa bacteriana por filtraciones sucesivas a través de filtros microbiológicos de 0.8, 0.45 y 0.22 um. Las proteínas del filtrado libre de bacterias fueron precipitadas con Sulfato de Amonio al 60%, con agitación constante y a una temperatura de 4°C durante 30 minutos a 10000 RPM. El precipitado se solubilizó en 2 ml de PBS 0.01 M pH 7.2 en presencia de PMSF como inhibidor de proteasas. El extracto así obtenido fue dializado exhaustivamente a 4°C contra PBS, se determinó concentración de proteínas por el método de Lowry y se guardó en alícuotas a -70°C.

Después de determinar proteínas al extracto de *M. tuberculosis*, el mismo fue usado en la producción del suero hiperinmune en conejos, así como en la separación electroforética usándolo como control antigénico.

6.2.2 Producción del suero hiperinmune.

Se emplearon conejos Nueva Zelanda adultos jóvenes (4) - a los que se sangró previo a la inmunización, y este suero -- se usó como suero normal control.

A cada conejo se le administró vía intramuscular; 3 mg - de extracto proteico, 5 mg de bacterias muertas por calor y - 1 ml de hidróxido de aluminio como adyuvante, una vez a la se mana durante seis semanas; al cabo de éste periodo se sangró - a los conejos y determinó el título de anticuerpos por el mé- todo de ELISA, considerándose como adecuados títulos superio- res a 1/4000, y en los casos en los que fueron menores, fue - necesario reinmunizar.

Posteriormente éste suero hiperinmune se utilizó como -- control para evidenciar el total de proteínas presentes en el extracto antigénico, así como en la detección de antígenos mi cobacterianos presentes en LCR y líquidos pleurales de pacien tes con tuberculosis por la técnica de inmunolectrotransfe-- rencia.

6.2.3 Título de anticuerpos por el método de ELISA

Está técnica fue empleada para evaluar la potencia del suero hiperinmune producido en conejo.

Se sensibilizaron placas de ELISA con 100ug/ml del extracto proteico de M. tuberculosis, haciendo la dilución en sol. amortiguadora de Carbonatos a 4°C durante toda la noche. El exceso de extracto se elimino lavando con PBS-T 0.05% después la placa se incubo durante 2hr a 37°C con BSA 1% - - PBS-T 0.05%, una vez bloqueada la placa se incubo con diluciones seriadas del suero hiperinmune anti M. tuberculosis (1:100, 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:16000; 1:32000;1:64000 en PBS-T-BSA 1% durante 1hr a 37°C, el exceso de anticuerpo - se elimino lavando con PBS-T 0.05%, por último se incubo con anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa dil. 1:500 en PBS-T BSA 1% 1hr a 37°C , se lavo con PBST 0.05% y como sustrato se utilizo o-fenilendiamino-H₂O₂ (4g de o-fenilendiamino, 5 ml - H₂O₂ en 10 ml de sol. amortiguadora de citratos), se espero el desarrollo de color durante 15 minutos y efectuaron las lecturas de densidad optica (DO) en un lector de ELISA Dynatech.

Dilución	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
D.O.	0.77	0.71	0.53	0.44	0.23	0.11

6.2.4. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) en un sistema discontinuo.

El sistema de gel discontinuo consiste de un gel separador y un gel concentrador; el gel concentrador actúa concentrando grandes volúmenes de muestra obteniendo así una mejor resolución de banda, las moléculas son entonces completamente separadas en el gel separador (17).

Se ensamblaron los vidrios del aparato de electroforesis Proteam II Slab Cell Bio-Rad, formando un sandwich de las dimensiones de 16 x 20cm, utilizando separadores de 1.5mm de grosor. Por separado en un matraz kitazato se mezclaron las siguientes soluciones para preparar el gel separador:

Gel separador : Acrilamida 10%, Tris 0.375M

Solución	Volumen
Sol. stock de Acrilamida	11.7 ml
Sol. amortiguadora Tris-HCl 1.5M pH 8.8	8.8 ml
SDS al 10%	0.35 "
Agua destilada	14 "
Persulfato de Amonio	0.3 "
TEMED	0.01 "

Utilizando vacío y agitación se eliminó el aire presente en el matraz, con el fin de obtener una mejor polimerización - con ayuda de una pipeta serológica se vertieron 31.5ml de - la mezcla entre las placas de vidrio evitando la formación de burbujas.

Después de transcurridos 30 min se eliminó el exceso de agua de la superficie del gel ya formado y coloqué un peine de teflón 1 cm por encima del mismo.

Para la preparación del gel concentrador se mezclaron en un matraz kitazato las soluciones siguientes:

Gel concentrador 4% Tris 0.125M

Solución	volumen
Sol. stock de acrilamida	0.78 ml
Sol. amortiguadora Tris-HCl 0.5M pH6.8	1.5 ml
SDS al 10%	0.06 "
Agua destilada	3.66 "
Persulfato de amonio	0.03 "
TEMED	0.003"

Se eliminó el aire de la mezcla con vacío y agitación durante 1 min, y vertió entre las placas de vidrio sobre el gel separador evitando la formación de burbujas; se permitió la polimerización durante 30 min y eliminó el agua excedente procurando dejar perfectamente secos los pozos formados -

con el peine donde se colocan las muestras para ser separadas electroforéticamente.

Las muestras fueron preparadas antes de someterlas a electroforesis mezclandolas con sol. amortiguadora: 0.125M Tris-HCl- pH 6.8, 4% SDS, 20% Glicerol, 10% 2-mercaptoetanol y 0.01% de azul de bromofenol y calentando a 92°C en un baño de agua -- durante 5min.

Muestra	volumen
Líquido CefaloRáquideo	60ul + 60ul sol. amortiguadora.
Líquido pleural	30ul dil 1:5 + 30ul sol. amortiguadora.
Extracto antigenico	Vol. de acuerdo a la - conc. de proteínas (60- ug/pozo).

La separación electroforética de las muestras se realizo a una corriente constante de 30mA por gel con incremento gradual del voltaje de 100-400v. durante aproximadamente 4hr; en presencia de una sol. amortiguadora de Tris 0.025M, Glicina 0.192M, -- SDS 0.1% pH 8.3, la temperatura se regulo con un sistema en---friador a 4°C.

6.2.5. Tinción con azul de Coomassie.

Al terminar la electroforesis los geles fueron separados de las placas de vidrio y teñidos con azul de coomassie con el fin de tener el patrón electroforetico de las protef-
nas separadas, cuando estas no se transferian; también des-
pués de la transferencia se tiñeron los geles como control
de una buena electrotransferencia.

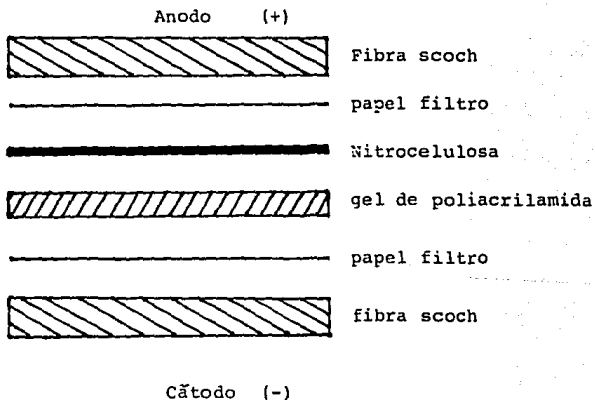
Utilizando guantes los geles de poliacrilamida se colo-
caron en refractarios y cubrieron totalmente con una sol. de
azul de coomassie al 0.125%, metanol 50% y ác. acetico al -
10%, se dejo teñir toda la noche con agitación lenta.
El exceso de colorante se elimino efectuando cambios sucesi-
vos de solución decoloradora; Metanol al 50%, ácido acetico
al 10%.

6.2.6 Inmunolectrotransferencia.

Al término del corrimiento electroforético, los geles de poliacrilamida se separaron de las placas de vidrio y estabilizados durante 30 min en la sol. amortiguadora de transferencia; Tris 0.025M , Glicina 0.192M, Metanol 20%.

Por otro lado se cortaron tiras de Nitrocelulosa de 12x12cm e incubaron con la misma solución amortiguadora durante 30 min, las fibras scoch y papel filtro se saturaron de la misma manera previo a la transferencia.

Diagrama



Una vez preparado el sistema se introdujo en la cámara y --
efectuó la transferencia durante hora y media a corriente -
constante 1A, y utilizando un baño enfriador para mantener
la temperatura a 4°C.

Inmediatamente después de la transferencia las tiras de Ni-
trocelulosa se bloquearon con BSA 3% PBST 0.1% durante
toda la noche a 4°C. Después de lo cual se lavaron exten-
sivamente efectuando 5 cambios de PBST 0.1% e incubaron --
con suero hiperinmune anti M. tuberculosis dilución 1:200
en PBST 0.1%-BSA 1% ó bien en el caso de controles con -
suero normal de conejo a la misma dilución en PBST 0.1%-
BSA 1%, durante toda la noche a 4°C, ó 3 hr a 37°C.

El exceso de anticuerpo se eliminó lavando con PBST 0.1%--
(5 cambios 10' c/u). Las tiras entonces fueron incubadas
con proteína A-Biotina dilución 1:400 en PBST 0.1%-BSA 1%
durante 1 hr a temperatura ambiente, efectuando 5 cambios
de PBST 0.1% de 10 min c/u para eliminar el exceso de -
proteína A - Biotina, e incubando con Estreptoavidin -Pe-
roxidasa dilución 1:400 en PBST 0.1%-BSA 1% 1 hora a tem-
peratura ambiente, las tiras fueron lavadas con PBST 0.1%
4 cambios 10 min c/u, y un último lavado con PBS antes de
poner en evidencia la reacción antígeno-anticuerpo, para
lo cual se utilizó como sustrato O-Cloronaftol-H₂O₂; se -

disolvieron 30mg de o-Cloronaftol en 10 ml de Metanol y adic--
ciono 50 ml de PBS, 50 ul de H₂O₂ al 30%. En ésta solución -
se colocaron las tiras de Nitrocelulosa durante aproximada--
mente 15 min ó hasta que se observaban bandas de color vio--
leta sobre las tiras, la reacción se detuvo con PBST seguido
de lavado exhaustivo con agua corriente durante toda la --
noche.

Representación esquemática del método de
Western Blotting.

L . C . R .

L. pleural.

Electroforesis en Geles de poliacrilamida al 10%
en presencia de SDS (PAGE).

Electrotransferencia a papel de Nitrocelulosa.

Bloqueo con BSA al 3% en PBST 0.1% toda la
noche a 4°C.

Incubación durante toda la noche a 4°C con anti
M. tuberculosis dilución 1:200 en PBST 0.1%---
BSA 1%.

1 hora de incubación a 37°C con proteína A Bio-
tina 1:400 en PBS-T 0.1% BSA 1%.

1 hora de incubación con Estreptoavidin-Peroxida
sa 1:400 en PBST 0.1% BSA 1%

Observación de antígenos con o-Cloronaftol.

6.2.7. Tinción con tinta china.

Al finalizar la electrotransferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la Nitrocelulosa, se cortó una tira de extracto de aprox. 1 x 12 cm de largo y se efectuó la tinción con tinta china al 1% durante 1 hora, ó bien - hasta que las bandas fueron evidentes. Esta tinción se utilizó como control de la transferencia en el papel de Nitrocelulosa, y también para teñir los marcadores de peso molecular.

6.2.8. Determinación de peso molecular de las proteínas antigenicas de M. tuberculosis detectadas en - Líquidos CefaloRáquideos.

Al mismo tiempo que se electrotransfirieron a papel - de Nitrocelulosa las muestras de LCR separadas electroforeticamente, se electrotransfirieron proteínas puras de peso molecular conocido que se utilizaron como marcadores de - peso molecular.

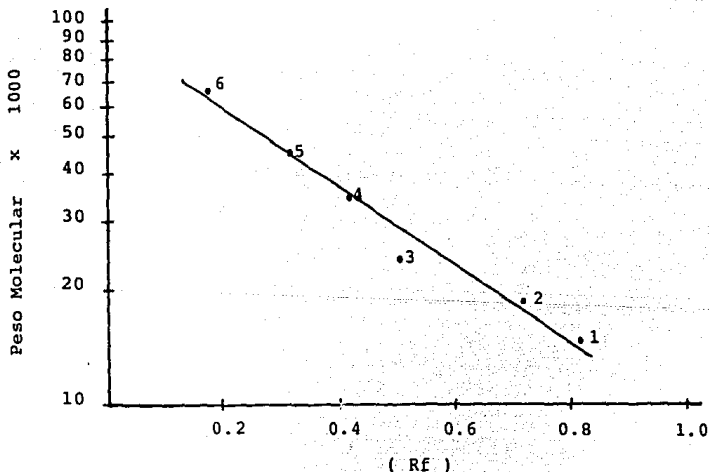
Las tiras de Nitrocelulosa en que se transfirieron los mar cadores de peso molecular fueron teñidas con tinta china - hasta que fueron evidentes, se identifico cada una de las bandas observables y calculo la distancia recorrida, así como el valor de Rf el cual se grafico contra el logaritmo de peso molecular.

Rf = Distancia recorrida por la protefna
Distancia total recorrida.

No.	Protefna	Peso molecular Kd.
1	Lisozima	14,300
2	Lactoalbumina	18,400
3	Tripsinogeno	24,000
4	Pepsina	34,700
5	Albumina Egg	45,000
6	Albumina Bovina	66,000

La grafica fue linealizada, utilizando la fórmula anterior - se calculo el Rf de las proteínas observadas al incubar con suero hiperinmune anti M. tuberculosis, el valor de Rf se - interpolo en la grafica correspondiente y de esta forma se determinaron los pesos moleculares de las proteínas antigeni cas de M. tuberculosis identificadas en el Immunoblot.

CURVA DE CALIBRACION DE PESOS MOLECULARES



7. RESULTADOS

7.1 Extracto antigenico y suero hiperinmune:

Los extractos antigenicos de Mycobacterium tuberculosis cepa H₃₇RV fueron separados electroforeticamente en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, obteniendose aproximadamente 42 bandas de peso molecular entre 96-14 Kd.

Perfectamente distinguibles por tinción con azul de Coomassie como se observa en la fig. 1

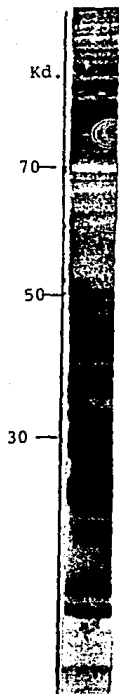


Fig. 1

Análisis del total de proteínas -
presentes en el extracto antigenico de -
M. tuberculosis cepa H₃₇RV criada en -
medio de cultivo PB_Y, y analizando por
electroforesis en geles de poliacrilami-
da al 10% en presencia de SDS.

7.2. Detección de antígenos de M. tuberculosis en L.C.R.

En los LCR de pacientes con tuberculosis meníngea por el método de Inmunolectrotransferencia usando un suero hiperinmune anti M. tuberculosis se reconocieron 5 bandas antigénicas de peso molecular de 70,65, 58,40, 38Kd Fig. 3,4,5 Estas bandas antigénicas son comparables con proteínas de peso molecular equivalente, presentes en un extracto de M. tuberculosis cepa H₃₇RV, reconocidas por el mismo suero hiperinmune.

Los antígenos de peso molecular de 70, 65 y 58 Kd -- fueron reconocidos en LCR de sujetos controles.

Además de las bandas mencionadas se reconocieron dos -- mas, una de peso molecular de 50Kd y otra de 23Kd, las cuales de acuerdo a las características de revelado y peso molecular corresponden a cadena pesada y ligera de Inmunoglobulinas respectivamente.

El extracto antigenico de M. tuberculosis cepa H₃₇RV fue transferido a papel de Nitrocelulosa e incubando con suero hiperinmune anti M. tuberculosis (título superior a 16000 por el método de ELISA), a una dilución 1:200. Reconociendo-se aproximadamente 46 bandas antigenicas con pesos moleculares entre 96-14 Kd. Fig. 2

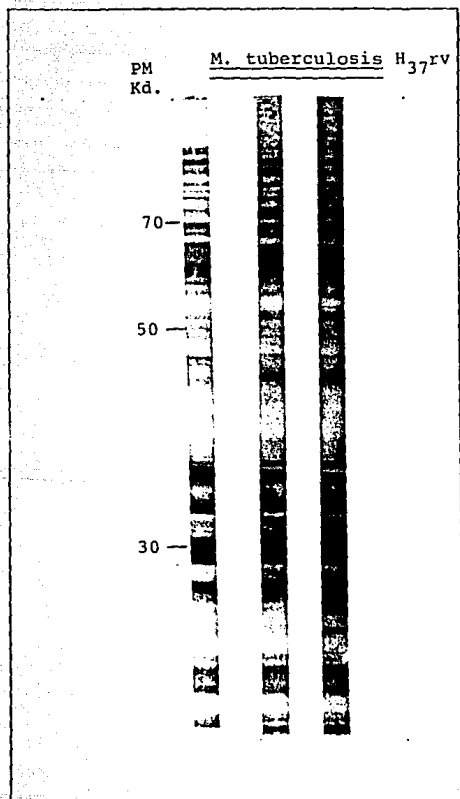


Fig. 2 Bandas antigenicas del extracto de M. tuberculosis cepa H₃₇RV reconocidas por un suero hiperinmune anti M. tuberculosis dil. 1:200 por el método de Inmunoelctrotransferencia.

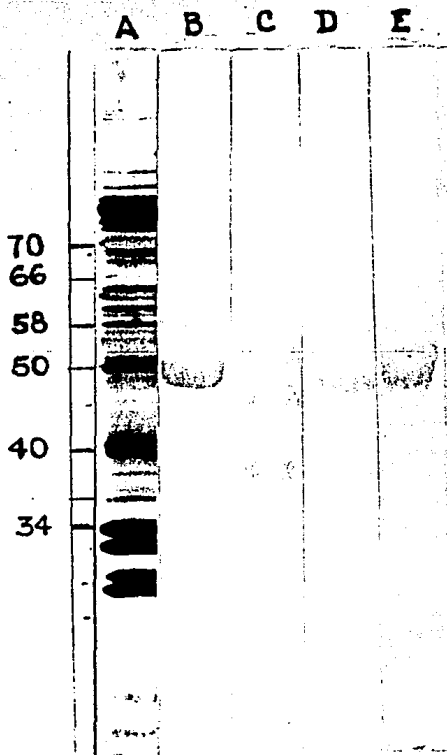


Fig. 3 Inmunoelectrotransferencia de LCR de pacientes con tuberculosis meníngea y revelados con suero hiperinmune anti M. tuberculosis cepa H₃₇RV. A=extracto de M. tuberculosis vs suero hiperinmune, B,C,D= LCR de - pacientes con TB meníngea, E= LCR control.

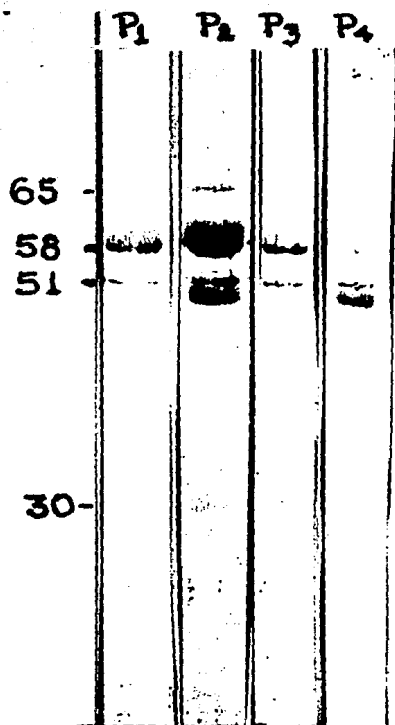


Fig. 4 Inmunoelectrotransferencia de LCR de pa-
cientes con tuberculosis meningea y revelados -
con suero hiperinmune anti M. tuberculosis -
P₁-P₄ LCR de pacientes con TB meningea.

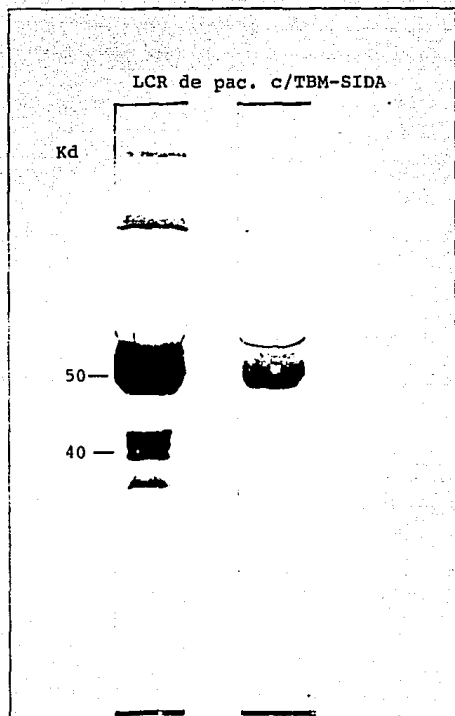


Fig. 5 Inmunoelctrotransferencia de LCR de --
pacientes con tuberculosis meníngea-asociado a
SIDA, y revelados con suero hiperinmune anti ---
M. tuberculosis.

7.3 Frecuencia de antígenos de M. tuberculosis en LCR

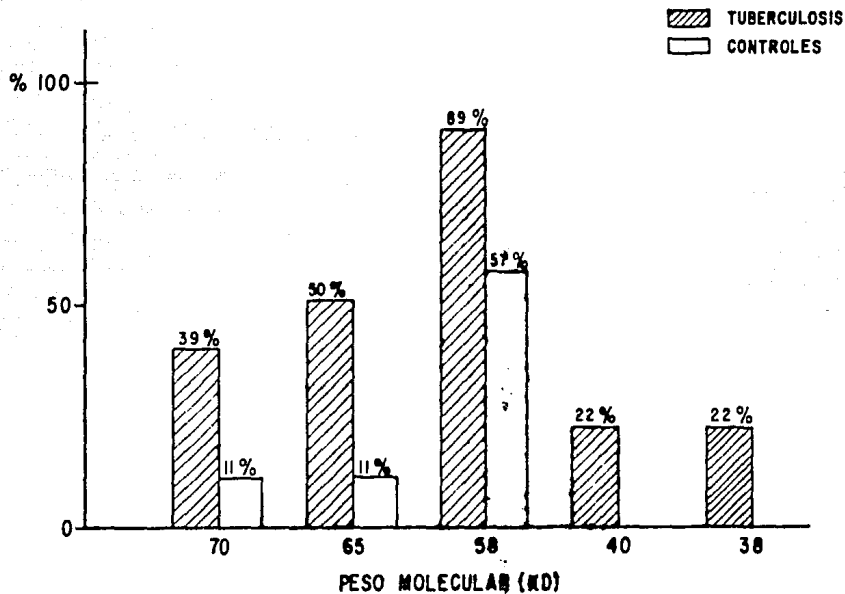
Los antígenos presentes en líquido Cefalo Ráquideo más frecuentemente reconocidos por un suero hiperinmune anti -- M. tuberculosis son los de peso molecular de 70,65 y 58 Kd -- con una frecuencia del 39%, 50% y 89% respectivamente en -- LCR de pacientes con TB meningea, y en un 11%, 11% y 57% en los LCR de sujetos controles. Los antígenos de peso molecu-- lar de 40 y 38 Kd se detectaron tan sólo en 4 LCR que proce-- dian de pacientes con diagnóstico de TB meningea asociado a SIDA (frecuencia del 22%). En la tabla y gráfica No. 1 se -- muestra la frecuencia de reconocimiento de los antígenos pr-- sentes en LCR.

Tabla No. 1

Frecuencia de antígenos reconocidos por
un suero hiperinmune anti M.tuberculosis
en L.C.R.

PM (Kd) antígeno	LCR de pac. - c/TB meníngea	L.C.R. control	% pac. TB	% control
70	7/18	1/7	39	14
65	9/18	1/7	50	14
58	16/18	4/7	89	57
40	4/18	-	22	-
38	4/18	-	22	-

FRECUENCIA DE ANTIGENOS DE M. tuberculosis RECONOCIDOS
POR ANTISUERO ANTI-Hsr RV. en L. C. R.



8. DISCUSION DE RESULTADOS

Por diversas técnicas inmunodiagnósticas como; ELISA, -- RIA y Latex se ha demostrado la existencia de antígenos micobacterianos en muestras de Líquido Cefalo Ráquideo de pacientes con tuberculosis meningea. (12,36).

Sin embargo, se desconocían las características de estos antígenos micobacterianos, por lo cual se empleo la técnica de inmunoelectrotransferencia para la caracterización de los mismos, obteniendo como resultado el reconocimiento de 5 bandas antigenicas de peso molecular de; 70, 65,58, 40 y 38 Kd, al usar un suero hiperinmune anti M. tuberculosis.

La frecuencia de hallazgo de estos antígenos en las - muestras de Líquido Cefalo Ráquideo (graf. No. 1), no permite establecer diferencias entre los dos grupos de estudio, - pero si permite establecer diferencias dentro del grupo de - pacientes con TB meningea, puesto que de los 18 LCR estudiados de pacientes con TB meningea 4 de ellos además tenían - diagnóstico de SIDA, y es en estos LCR donde se reconocieron los antígenos de peso molecular de 40 y 38Kd, que no fueron detectados en las demás muestras de LCR de ambos grupos de - estudio, lo cuál indica que estos antígenos son altamente -

específicos.

El hecho de que los pacientes con SIDA que tienen una inmunodeficiencia celular presenten antígenos diferentes a los observados en sujetos sin inmunodeficiencias, sugieren una posible depuración de antígenos de M. tuberculosis en Líquido Cefalo Raquídeo. Las implicaciones pronósticas de este hallazgo no pueden ser evaluadas por el diseño y limitaciones de este estudio.

Los resultados obtenidos por el método de Inmunolectrotransferencia en la identificación y caracterización de antígenos micobacterianos presentes en LCR de pacientes con TB meníngea en los que se obtuvo muy baja sensibilidad específica, no parecen tener relación con la detección de antígenos usando otra metodología como ELISA, RIA y Latex puesto que con estos métodos altamente sensibles se obtiene una sensibilidad hasta del 98% (36,37) y una especificidad del 99%.

Las explicaciones posibles serían que:

- 1.- Por el método de Inmunolectrotransferencia, sólo se detectan antígenos proteícos y se excluyen antígenos, tales como los polisacáridos; arabinomananos y arabinogalactanos que si son detectados por métodos como los mencionados, y que al parecer desempeñan importantes papeles inmunológicos. (24,3).

2.- La discrepancia de especificidad puede deberse a que el método de IET es altamente sensible por lo cual se detectan proteínas de reacción cruzada mismas que al utilizar un método cuantitativo como ELISA y RIA ó bien, un método menos sensible como Latex no son detectadas.

Ahora bien, se ha demostrado en algunos trabajos (38) la existencia de reacciones cruzadas entre los antígenos de Mycobacterium tuberculosis y proteínas propias del huésped, lo cual quedó demostrado experimentalmente al desaparecer las bandas antigénicas identificadas con suero hiperinmune anti M. tuberculosis en L.C.R. al ser incubados con suero normal de conejo.

El papel biológico de los antígenos detectados se desconoce. Sin embargo, se sospecha que puedan tener alguna actividad inmunológica como; supresión inmunológica local, ya que se ha demostrado en otros trabajos que algunos antígenos de M. tuberculosis tienen una acción supresora (21).

Otro aspecto sería que estos antígenos tuvieran algún papel en la reacción inflamatoria local como; inducción de vasculitis, la que es muy frecuente en sujetos con TBM -- (18) , ya sea por la presencia del antígeno mismo ó por la formación de complejos inmunes locales puesto que se ha - demostrado que sujetos con tuberculosis meníngea tienen - anticuerpos detectables en Líquido Cefalo Raquídeo (37).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

9. CONCLUSIONES

- I Con el sistema de Western Blotting usando anticuerpos anti M. tuberculosis se detectaron antígenos proteícos de peso molecular entre: 70-30 Kd. en L.C.R. de pacientes con tuberculosis meningea.

- II Los antígenos de 38 y 40 Kd sólo se detectaron en líquidos de pacientes con tuberculosis meningea asociado a SIDA, mientras que los antígenos de PM: 70, 65 y 58 se detectaron tanto en líquidos de pacientes con TBM como en los controles.

- III La presencia de antígenos en sujetos no tuberculosos sugiere que existen reacciones cruzadas con proteínas diferentes a las de Mycobacterium tuberculosis.

- IV El conocer las características de los antígenos presentes en L.C.R. de pacientes con tuberculosis meningea, permitira el desarrollo de mejores técnicas diagnósticas.

APENDICE

1) Solución salina de Fosfatos (PBS) 0.01M pH 7.2

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2M sol. A

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ----- 27.2g
aforar a 1 litro con agua destilada.

Na_2HPO_4 0.2M sol. B

Na_2HPO_4 anhidro----- 28.4g
aforar a 1 litro con agua destilada.

Mezclar:

sol. A ----- 140 ml

sol. B ----- 360 ml

NaCl ----- 74 g

ajustar pH 7.2 y aforar a 1 litro con agua destilada.

100 ml de la solución anterior aforar a 1 litro.

2) Medio de cultivo Voges-Proskaver and Becks modificado por Youmans.

Asparagina Difco ----- 5g

Fosfato monobásico de Potasio --- 5g

Sulfato de potasio ----- 0.5g

Citrato de Sodio ----- 0.6g

Cloruro de Magnesio ----- 0.2g

Glicerol ----- 50 ml

Ajustar a pH 6.8 y aforar a 1 litro con agua destilada --

esterilizar 15 min a 10 lbs.

- 3) Monomero de Acrilamida sol. stock: 30% Acrilamida
0.8% bis-Acrilamida

Acrilamida Bio-Rad ----- 30g
Bis acrilamida Bio-Rad ----- 0.8g

llevar a 100ml con agua destilada, aforar hasta que la --
solución este a temperatura ambiente, filtrar usando mem-
brana Millipore 0.42um Conservar a 4°C.

- 4) Dodecil Sulfato de Sodio al 10%

SDS Bio-Rad ----- 10 g

llevar a 100 ml con agua destilada, filtrar y guardar a -
temperatura ambiente.

- 5) Buffer Tris-HCl 1.5M pH 8.8 (sol. amortiguadora)

Tris Bio-Rad ----- 18.17g
H₂O destilada ----- c.b.p.

Ajustar pH a 8.8 con HCl cocentrado, aforar a 100ml , --
filtrar y conservar a 4°C

- 6) Sol. amortiguadora Tris-HCl 0.5M pH 6.8

Tris ----- 6.07 g
H₂O destilada ----- c.b.p.

Ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado, aforar a 100 ml --
filtrar y conservar a 4°C.

- 7) Sol. amortiguadora de corrida Electroforesis

Tris 0.025M, Glicina 0.19mM, SDS 0.1%

Tris ----- 12 g
Glicina ----- 57.6g
SDS ----- 40 ml al 10%
H₂O DESTILADA ----- c.b.p.

ajustar el pH a 8.3, aforar a 4 litros, filtrar y conservar
a 4°C.

8) Sol. tratamiento de la muestra (coctail)

Tris 0.125M, SDS 4%, Glicerol 20%, 2-Mercaptoetanol 1%,
azúl de bromofenol 0.1%.

Glicerol	-----	2ml
Tris	-----	2ml de Tris 0.5M pH 6.8
SDS	-----	2ml al 10%
2-Mercaptoetanol	-----	100ul
Azúl de bromofenol	-----	1ml al 1%
H ₂ O destilada	-----	2.9ml

Aforar a 10ml , congelar a -20°C y centrifugar antes de
usar.

9) Sol. amortiguadora de Transferencia

Tris 0.025M, Glicina 0.19M, Metanol 20%

Tris	-----	12g
Glicina	-----	57.6g
Metanol	-----	800ml
H ₂ O destilada	-----	c.b.p.

ajustar a pH8.3, aforar a 4 litros, filtrar y conservar a
a 4°C.

10) Tinción con azúl de Coomassie

Azúl de Coomassie 0.125%, Metanol 50%, Ac. acético 10%

SOL. I

Azúl de Coomassie R-250	-----	2.0g
H ₂ O destilada	-----	200ml

Sol II

Azúl de Coomassie	-----	62.5ml de sol.I
Metanol	-----	250ml
Ac. acético	-----	50ml
H ₂ O destilada c.b.p.	-----	500ml

11) Sol. decoloradora Metanol 50%, Ac. acético 10%

Metanol	-----	500ml
Ac, acético	-----	100ml
H ₂ O destilada c.b.p.	---	1000ml.

12) Determinación de Proteínas por el método de Lowry

Sol. de Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1N

Sol. A: 50ml de la sol. Na₂CO₃, 0.5ml de Tartrato de Sodio al 2%, 0.5 ml de CuSO₄ al 1%

Sol. B: Reactivo de Folin-Ciocalteau diluido 1:2

Sol Estandar de Proteínas: BSA 0.1mg/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA 0.1mg/ml	0ml	0.2ml	0.4ml	0.6ml	0.8ml	1ml	-	-
ug/proteína	0	20	40	60	80	100	-	-
H ₂ O	1"	0.8"	0.6"	0.4"	0.2"	-	-	-
Sol.problema	-	-	-	-	-	-	1	1
Sol. A	3"	3"	3"	3"	3"	3"	3"	3ml
Sol. B (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Mezclar y dejar que reaccione de 30min-2horas y leer a una D.O. de 500nm.								
D.O.	0.04	0.09	0.14	0.2	0.25			

11 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.- Coates A.R.M.; Hewitt J.; Allen B.W.; Ivanyi and Mitchison Antigenic diversity of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis detected by means of monoclonal -- antibodies. Lancet 2: 167-169 1981.
- 4.- Chaparas S.D. Immunity in tuberculosis WHO 60 (4): 447-462 1982.
- 5.- Daniel T.M.; Janicki B.W. Mycobacterial antigens: A review of their isolation, chemistry and immunological microbiol. Rev. 42:84-113 1978.
- 6.- Daniel T.M.; Good R.C. and Janicki B.W. Immunoelectrophoresis of Mycobacterium tuberculosis antigens. Comparative - analysis of cell extrac and culture filtrate antigens. - Am. Rev. Res. Dis. 112: 639-644 1975.
- 7.- Ferro G. and Ames L. Resolution of bacterial proteins by polyacrilamide gel electrophoresis on slabs. J. Bacter. - Chem. 249 (2): 634-644, 1974.
- 8.- Gold A.M. and Fahrney. The mechanism of reactivation of - phenylmethrane-sulfonyl -a chemotrypsin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 10: 55-59, 1963.

- 9.- Huesca M., Sada E., Goodsaid F. Detection of M.tuberculosis antigens in immune complexes isolated from patients with - pulmonary tuberculosis. 6th International Congress of - Immunology, Toronto Canada 1986.
- 10.- Johnson N.M., McNicol M.W., Burton- Ree E.J. and Nowbray
Circulating immune complexes in tuberculosis. Thorax -
36: 610-617, 1981.
- 11.- 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.
- 12.- Kennedy P.H., Fallon R.S. Tuberculosis meningitis -
JAMA 241: 264- 268 1979.
- 13.- 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.
- 14.- Kim T.C., Blackman R.S
Acid fast in sputum smears of patients with pulmonary -
tuberculosis.
Am. Rev. Res. Dis. 129:264,1984.
- 15.- Kniker N.T. and La Borde J.B.
The separation of mycobacterial antigens by ion-exchange
chromatography. Am. Rev. Res. Dis. 89:29-40 1964.
- 16.- Kobak B.M. and Yotis W.W.
Solubilization and electrophoretic analysis of -----
Staphylococcus aureus membrane proteins.
Biochem. Bioph. Acta 687:238-264,1982.
- 17.- Laemmli V.K. Cleavage of structural proteins during assembly
at the head of bacteriophage T4.
Nature (Lond) 227:680-685 1970.

- 18.- Lenzini L., Roltoli P., and Roltoli L. The Spectrum of human tuberculosis.
Clin. Exp. Immunol. 22:230 1977.
- 19.- 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.
- 20.- Pacheco C., Olvera R., Herrera M. Panorama epidemiológico y control de la tuberculosis en la República Mexicana.
Sal Pub. Mex. 23:25-259,1980.
- 21.- Parra C., Montañó L.F., Huesca M., Rayon I., Willms K., -- Goodsaid inhibition of mitogenesis induced by phytohemagglutinin and lens culinaris in adherenc-cell supernatans treated with - protein extract of M.tuberculosis.
Infect. Immun. 52:309-313 1986.
- 22.- Ratledge C. and Standford J. The Biology of the Mycobacterial, Physiology, identification and classification. Vol. I Academic Press INc (London) LTD.1982.
- 23.- Roberts D.B.,Wright G.L. et al. Characterization and comparison of micobacterial antigens by two dimensional immunoelectrophoresis
Infect. Immun. 6:564-573 1972.
- 24.- Sadanobu Niguchi, Moritaka Suga, Artur M. Dannenberg, J.R. - Persistence of protein, carbohydrate and Wax somponents of - tubercle Bacilli in Dermal BCG Lesions.
Am Rev Respir Dis 1981;123:397-401
- 25.- Reinhard Ruchel, Y. Peng Loh, an Harold Ganer. Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
Principles, Techniques, and Micromethods, cap.4 N
- 26.- Samuel A., Ashtekar M. and Gamatra R.D. Significance of --- circulating immune complexis in pulmonary tuberculosis.
Clin. Exp. Immunol. 58:317-324 1984.
- 27.- Sneath P.H.A. and sokal R.R.
"Numerical Taxonomy" Freeman San Francisco 1973.

- 28.- Styblo K. and Ravillon A. Stimated global incidence of smear positive pulmonary tuberculosis unreability of - officially reported figures on tuberculosis. - - Union Against Tuberc. 56: 118-126 1981.
- 29.- Supplement on future Research in Tuberculosis Am. Rev. Resp. Dis.; 13: 401-423.
- 30.- Thole J.E., Dawerse H.G., Das p.k. et al. Cloning of - Mycobacterium bovis BCG DNA and expression of antigens in Escherichia coli. Infect. Inmu. 50:800-806 1985.
- 31.- Towbin H., Stenelin T. and Gordon J. Electrophoretic - transfer of proteins from polyacrylamide gels to - - nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4350-4354 1970.
- 32.- Virella G., Kilpatrick J.M., et al. Isolation of - - soluble immune complexes from human serum. Methods in Enzymology 74: 644-663. 1981
- 33.- Winters D.W. and Cox R.A. Serodiagnosis of tuberculosis by radioimmunoassay. Am. Rev. Dis. 124: 582-585 1981
- 34.- Youmans G.P. Ed. Tuberculosis. W.B. Saunders Company - 1979.
- 35.- Young R.A., Bloom B.R. et al. Dissection of M.tuberculosis antigens using recombinant DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2583-2587 May 1985.
- 36.- Sada E., Ruiz P., López V., Ponce de León S. Deteccion of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of - patients with tuberculous meningitis by enzyme linked immunosorbent assay. Lancet 2; 2: 1163, 1983.

- 37.- Strauss E. Radioimmunoassay of tuberculoprotein in sputum and cerebrospinal fluid; Clinical Research Abstract --- 31: 1050- 1056 1983.
- 38.- Thorn C., Morris J. Common epitopes between mycobacterial and certain host tissue antigen. Clin. Exp. Immunol. - 65: 323-328. 1985.