



40
2 g.

Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES ZARAGOZA

CARACTERIZACION DE ANTIGENOS DE
M. Tuberculosis Y DE ANTICUERPOS
DIRIGIDOS CONTRA ESTOS EN LAVADOS
BRONQUIOLOALVEOLARES (LBA) DE
PACIENTES CON TUBERCULOSIS MILIAR

T E S I S

Que para obtener el Título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ANGELICA ARACELI RAMOS ECHEVARRIA

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1989



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.

A B R E V I A T U R A S

- TB - Tuberculosis
- LBA - Lavado bronquioloalveolar
- IET - Inmunoelctrotransferencia
- Kd - Kilodalton
- SDS - Dodecil sulfato de sodio
- PBS - Buffer de fosfatos salino
- PBS-T- Buffer de fosfatos salino - Tween

I N D I C E

	Página
INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
OBJETIVOS	10
HIPOTESIS	11
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	30
ANALISIS DE RESULTADOS	48
CONCLUSIONES	51
ANEXO	52
BIBLIOGRAFIA	56

1. INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa, generalmente de curso subagudo o crónico, que involucra diversos órganos o tejidos, principalmente a nivel pulmonar.

En México continúa siendo un problema de salud pública y ocupa el tercer lugar entre las enfermedades de mayor mortalidad en América Latina. (19)

La enfermedad es generalmente causada por M. tuberculosis que es un bacilo ácido alcohol resistente, inmóvil, no esporulado, de 2 a 4 μm de longitud y de 0.2 a 0.5 μm de ancho. Es aerobio estricto de lento crecimiento. (13)

1.1 Antigenicidad de Mycobacteria

Los componentes antigénicos se han encontrado en pared celular y citoplasma, la inmunorreactividad se ha demostrado en lípidos, polisacáridos y proteínas, algunos de éstos componentes son inmunosupresores mientras que otros inducen la formación de granulomas, activación de macrófagos, toxicidad al huésped y adyuvancia. (3,7)

Seibert (42) realizó un fraccionamiento químico de un cultivo hervido de bacilos tuberculosos y demostró cuatro proteínas distintas y dos polisacáridos. Las proteínas fueron designadas A, B, C, D, las cuales se ha demostrado que inducen la hipersensibilidad de tipo retardado. (43)

1.2 Inmunidad

La respuesta humoral mediada por linfocitos B no es importante en la patogénesis de la enfermedad, aunque hay evidencia que ésta respuesta existe, la identificación de anticuerpos puede indicar el reconocimiento de personas infectadas y el título de anticuerpos para relacionar con el pronóstico.
(29)

La tuberculosis es un clásico ejemplo de enfermedad que es controlada por inmunidad celular, involucrando al macrófago como célula efectora y el linfocito T como célula inmunoresponsable. Una vez en el espacio alveolar, el bacilo es ingerido por macrófagos alveolares y la mayoría son destruidos; cuando se ingieren bacilos virulentos por un macrófago alveolar no activado, el bacilo puede multiplicarse intracelularmente y eventualmente muere el fagocito; para que los bacilos sean destruidos, los macrófagos deben primero ser activados, lo que se obtiene por linfocinas obtenidas de linfocitos T.
(14)

1.3 Identificación y purificación de antígenos de Mycobacterium tuberculosis.

Los extractos de micobacteria contienen muchas proteínas antigénicas, algunas son especie específicas y otras comparadas con otras especies. El fraccionamiento físico-químico de cultivos filtrados de micobacterias y extractos celulares

han incluido procedimientos que realizan separaciones en base a solubilidad, carga molecular y peso molecular, muchos procedimientos combinan más de uno de éstos parámetros. (10)

En un intento por uniformizar los criterios de clasificación de éstos antígenos, Daniel, Affronti y col. (11) propusieron la inmunoelectroforesis como método analítico: enfrentaron preparaciones de M. tuberculosis con sueros hiperinmunes de referencia, así clasificaron los antígenos a partir de células bacterianas y filtrados de cultivo en 11 bandas con diferente movilidad electroforética.

Se han publicado gran cantidad de trabajos sobre separación, identificación y aislamiento de antígenos derivados de Mycobacterium tuberculosis (Tabla I). (12)

El aislamiento de antígenos micobacterianos es útil para la determinación del papel inmunológico que presentan.

Se han realizado varias investigaciones al respecto como se observa en la tabla II.

T A B L A I

MÉTODOS DE PURIFICACION DE ANTIGENOS MICOBACTERIANOS

Método	Investigador
Precipitación con etanol ácido acético	Seibert
Cromatografía de intercambio iónico	Kniker y La Borde
Cromatografía por exclusión molecular	Baer y Chaparas
Cromatografía de afinidad con Concanavalina A	Daniel
Cromatografía de afinidad inmunoabsorbente	Daniel y Anderson
Electroforesis en papel	Janicki y col.
Electroforesis en gel de poliacrilamida	Rozzman y col. Minden y Far
Precipitación con sulfato de amonio, filtración en geles, cromatografía de intercambio iónico y electroforesis.	Yoneda y Fukui Daniel y Furgunson Kuwabara
Extracciones alcalinas, precipitación con etanol y cromatografía de intercambio iónico	Azuma y col. Yumamurayed, Misaki y col.
Clonación molecular de DNA	Young y col. Thole y col.

T A B L A II

Antígeno P.M. (Kd)	Papel inmunológico	Investigador
10	Induce hipersensibilidad de tipo retardado en cobayos	Minden y col. (31)
14	Induce respuesta linfoproliferativa "in vitro" e hipersensibilidad de tipo retardado "in vivo"	Kingston Salgame (27)
19	Estimula proliferación de -- linfocitos T.	Frederik, Oftung (35)
38	Estimula proliferación de -- linfocitos T "in vivo" e "in vitro"	Young y col. (55)
64	Induce proliferación de linfocitos T e hipersensibilidad de tipo retardado en cobayos	Thole y col. (47) Frederik, Oftung (35)
70	Posee epitopes capaces de -- reaccionar con células B. Induce respuesta de células T "in vivo" e "in vitro"	Britton y col. (2)
150-200	Induce hipersensibilidad de tipo retardado y estimula la generación de macrófagos activados en ratones inmunizados con <u>M. tuberculosis</u> H 37RV.	Hattikudur, Kamat (25)

1.4 Aspectos celulares en la inmunización ante Mycobacterium tuberculosis.

Maxwell y col. (30) realizaron un trabajo en el cual compararon la capacidad fagocítica y la capacidad de inhibir el crecimiento de M. tuberculosis en macrófagos alveolares y macrófagos peritoneales, se observó que la respuesta fagocítica de los macrófagos alveolares fué menor a la de los macrófagos peritoneales, pero sólo los macrófagos alveolares fueron subsecuentemente bactericidas. Otro trabajo realizado por Pattisapu y col. (38) empleando M. intracellulare, también se obtuvieron resultados similares; en macrófagos peritoneales la micobacteria se multiplica logarítmicamente poco después de la ingestión y continúa multiplicándose hasta que la célula se destruye 11 a 13 días después, en los macrófagos alveolares normales y activados y en macrófagos peritoneales activados, la división fué inhibida aproximadamente 7 días antes de que el crecimiento ya no es inhibido y ocurre la destrucción del macrófago.

Se han reportado múltiples defectos en macrófagos y monocitos en pacientes con tuberculosis, como fagocitosis y capacidad bactericidas reducidas (1,5), presencia de células mononucleares supresoras (15), defectos en la quimiotaxis para monocitos (34), presencia de actividad supresora en suero para la respuesta blastogénica en linfocitos humanos, éste -

factor fué generado por células adherentes y activan una subpoblación de linfocitos que se convierten en células supresoras. (52)

En el presente estudio se caracterizarán antígenos de M. tuberculosis y anticuerpos dirigidos contra éstos en lavados bronquioloalveolares de pacientes con tuberculosis miliar empleando los siguientes métodos:

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) - Es un método con alta sensibilidad mediante el cual se pueden separar proteínas en base a sus características de peso molecular.

Inmunolectrotransferencia - Combina la gran capacidad de resolución de PAGE-SDS con métodos inmunoenzimáticos y radioinmunológicos. Consiste en la transferencia por medio de un equipo eléctrico de antígenos previamente separados por PAGE-SDS, del gel de poliacrilamida al papel de nitrocelulosa, --- donde se llevan a cabo las reacciones para la detección de -- los distintos componentes antigénicos por anticuerpos específicos.

ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay) - Es un inmunoensayo que emplea inmunorreactivos unidos a una enzima, utilizando una fase sólida. La serie de reacciones antígeno-anticuerpo se ponen de manifiesto por una reacción enzimática.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No obstante toda la información existente, poco se ha estudiado en el humano la respuesta local pulmonar a la infección por Mycobacterium tuberculosis. La mayoría de estudios sobre la inmunidad de la tuberculosis se han limitado a sangre periférica y otros fluidos corporales. El trabajar con lavados -- bronquioloalveolares de pacientes con tuberculosis miliar permitirá evaluar la respuesta inmune a ésta infección en pulmón, inicialmente por el estudio de antígenos de M. tuberculosis - presentes en éste material y dentro de macrófagos alveolares, y la determinación de anticuerpos específicos dirigidos contra éstos antígenos.

3. OBJETIVOS

- 1) Detección y caracterización de antígenos de Mycobacterium tuberculosis en lavados bronquioloalveolares de pacientes con tuberculosis miliar por el método de ELISA e inmunoelectrotransferencia.
- 2) Detección de anticuerpos específicos contra Mycobacterium tuberculosis presentes en lavados bronquioloalveolares de pacientes con tuberculosis miliar por el método de ELISA e inmunoelectrotransferencia.
- 3) Detección y caracterización de antígenos de Mycobacterium tuberculosis presentes en macrófagos alveolares de pacientes con tuberculosis miliar por el método de inmunoelectrotransferencia.

4. HIPOTESIS

Si se desencadena una respuesta inmunológica local en pacientes con tuberculosis miliar, se espera encontrar un incremento en el nivel de anticuerpos dirigidos --- contra antígenos de Mycobacterium tuberculosis y además la presencia de antígenos tanto en el lavado bronquioloalveolar como en macrófagos alveolares.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 Equipo

Refrigerador --- American
Centrífuga --- Beckman
Campana de flujo laminar --- Vecco
Estufa de CO₂ --- Presicion
Agitador magnético --- Solbat
Equipo de electroforesis --- Protean II Biorad
Equipo de electrotransferencia --- Transcell Biorad
Fuente de alto voltaje 500 mA --- Vimar
Fuente de alto voltaje 2 A --- Vimar
Baño enfriador 4 C --- CIUMAM
Agitador orbital --- CDMIT
Lector de ELISA --- Dynatech
Impresora --- Geminis X
Espectrofotómetro --- Beckman
Microscopio --- Zeiss

5.2 Material

Equipo Millipore
Membranas microbiológicas 0.8, 0.45, 0.22 m --- Millipore
Placas de ELISA --- Immunolon II Dynatech
Membrana de nitrocelulosa 0.45 m --- Biorad
Membrana de diálisis 12 mm PM 12-14000 --- Spectrafor
Matraces erlenmeyer 125, 250 ml.
Matraces volumétricos 100, 500, 1000 ml.
Pipetas serológicas 1, 5, 10 ml.
Vasos de precipitados 100, 250, 500 ml.
Placas de 6 pozos para cultivo celular --- Falcon
Micropipetas de 1-50 μ l y de 50-200 μ l --- Socorex
Tubos estériles de 50 ml --- Costar
Cámara de Neubauer --- Reichert
Papel filtro No 1 --- Whatman

5.3 Reactivos

Sulfato de amonio --- J.T. Baker
Fosfato de sodio dibásico --- J.T. Baker
Fosfato de sodio monobásico --- J.T. Baker
Cloruro de sodio --- Merck
DMEM --- Gibco
Suero bovino fetal --- Sigma
Mercaptoetanol --- Biorad
TEMED --- Biorad
Acrilamida --- Biorad
Bis-acrilamida --- Biorad
TRIS --- Biorad
Persulfato de amonio --- Biorad
SDS --- Biorad
Glicina --- Biorad
4 cloronaftol --- Biorad
Glicerol --- Merck
Azul de bromofenol
Tween 20 --- Sigma
Estreptoavidin conjugado a peroxidasa --- Sigma
Anti IgA humana conjugada a biotina --- Sigma
Anti IgG humana conjugada a biotina --- Sigma
Anti IgM humana conjugada a biotina --- Sigma
Albúmina sérica bovina --- Sigma
Anti IgG de cabra conjugada a peroxidasa --- Sigma
o-fenilendiamina --- Sigma
Citrato de sodio --- J.T. Baker
Carbonato de sodio --- J.T. Baker
Bicarbonato de sodio --- J.T. Baker
Hepes --- Sigma
Peróxido de hidrógeno --- Pharmacia
Metanol --- Merck
Acido clorhídrico --- J.T. Baker
Hidróxido de sodio --- Merck
Acido sulfúrico --- Laitz
Proteína A conjugada a biotina --- Sigma
M.W. SDS-Blue --- Sigma
Tartrato de sodio --- J.T. Baker
Sulfato de cobre --- J.T. Baker
Reactivo de Folin --- Sigma
Mezcla de antibióticos --- Sigma
Azul tripano --- Gibco

5.4 Material biológico

Extracto proteico de Mycobacterium tuberculosis cepa H 37RV proporcionado por el laboratorio de Microbiología del INER.

IgG de conejo antimicobacteria purificada en columna de --- proteína A-Sepharosa 4B, proporcionada por el laboratorio de - Microbiología del INER.

Dos conejos adultos de 2 Kg de peso, Nueva Zelanda.

Suero hiperinmune de conejo dirigido contra extracto proteico de M. tuberculosis.

IgG de cabra anti BCG.

5.5 Grupos de estudio

I) 13 lavados bronquioloalveolares de pacientes con ---- tuberculosis miliar.

II) 9 lavados bronquioloalveolares de personas que no -- padecen tuberculosis (grupo control).

Métodos

5.6 Obtención de suero hiperinmune

Se utilizaron dos conejos adultos, de dos Kg de peso, Nueva Zelanda.

Via de inmunización : Intramuscular

Protocolo de inmunización : Las inmunizaciones se llevaron a cabo cada semana. Se obtuvo una muestra inicial de suero como control.

Inmunización	Antígeno
1°	5 mg micobacteria muerta por calor <u>M. tuberculosis</u> cepa H 37RV. 3 mg extracto proteico. 1 ml hidróxido de aluminio.
2°	1 mg extracto proteico. 1 ml hidróxido de aluminio.
3°	1 mg extracto proteico. 1 ml hidróxido de aluminio.
4°	1 mg extracto proteico. 1 ml hidróxido de aluminio.
5°	1 mg extracto proteico. 1 ml hidróxido de aluminio.
6°	1 mg extracto proteico. 1 ml hidróxido de aluminio.
7°	Sangrar al conejo y evaluar la potencia del suero hiperinmune por la técnica de --- ELISA. Un título mayor a --- 2000 es útil.

- 5.7 Técnica de ELISA para determinar la potencia del suero - hiperinmune.
1. Sensibilizar la placa con 1µg/ml de extracto proteico, hacer la dilución en buffer de carbonatos (pH 9.6, 0.05M) adicionar 100µl por pozo.
 2. Incubar toda la noche a 4 °C.
 3. Lavar 4 veces con PBS-T 0.05%, 200µl por pozo.
 4. Bloquear por 2 hr. a 37 °C con albúmina sérica bovina- 1% en PBS-T, 100µl por pozo.
 5. Lavar 4 veces con PBS-T, 200µl por pozo.
 6. Hacer las diluciones del suero en albúmina sérica bovina 1% en PBS-T, adicionar 100µl por pozo.
 7. Incubar una hora a 37 °C.
 8. Lavar 4 veces con PBS-T, 200µl por pozo.
 9. Hacer una dilución de anti IgG de conejo conjugada a peroxidasa en albúmina sérica bovina 1% en PBS-T, adicionar 100µl por pozo.
 10. Incubar una hora a 37 °C.
 11. Lavar 4 veces con PBS-T, 200µl por pozo.
 12. Adicionar 100µl por pozo de sustrato, dejar que desarrolle color. (anexo)
 13. Detener la reacción con 50µl por pozo de ácido sulfúrico 2.5 M.
 14. Leer la placa a 490 nm.

5.8 Procesamiento de la muestra.

Se efectuaron 13 LBA a pacientes con tuberculosis miliar confirmada y 9 LBA a personas que no padecen tuberculosis.

1. Filtrar dos veces por gasa, recibir en tubos estériles de 50 ml.

2. Centrifugar a 1600 rpm por 10 min.

3. El precipitado lavarlo 3 veces con PBS estéril y una vez con medio de cultivo DMEM con 20% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos.

3.1 Observar viabilidad de las células con azul tripano diluido 1:20 con PBS estéril y 1:5 con la muestra.

3.2 Sembrar 1×10^6 células por pozo, incubar 2 hr. a 37°C en una estufa con 5% de CO_2 .

3.3 Colectar el sobrenadante (población no adherente) y lavar la población adherente 3 veces con PBS estéril

3.4 Adicionar 200 μl de coctail de electroforesis por pozo, mezclar, colectar la muestra.

3.5 Hervir 5 min., guardar en congelación.

3.6 Caracterizar antígenos micobacterianos con electroforesis y electrotransferencia.

4. El sobrenadante del LBA centrifugado se filtra en un equipo Millipore empleando membranas de 0.45 μm y 0.22 μm .

4.1 Precipitar con sulfato de amonio 50%, adicionando

una solución saturada de sulfato de amonio en relación 1:2 con la muestra.

4.2 Dejar en agitación toda la noche a 4°C.

4.3 Centrifugar a 12000 rpm por 30 min.

4.4 Dializar el precipitado contra PBS efectuando por lo menos 3 cambios.

4.5 Cuantificar proteínas por el método de Lowry.

4.6 Determinar antígenos y anticuerpos por los métodos de ELISA e inmunoelectrotransferencia.

5.9 Determinación de proteínas por el método de Lowry (44)

Solución A 50 ml carbonato de sodio 2% en hidróxido de sodio 0.1 N.

0.5 ml tartrato de sodio 2%.

0.5 ml sulfato de cobre 1%.

Solución B Reactivo de Folin diluido 1:2 con agua destilada.

Solución estándar de proteínas: Albúmina sérica bovina (ASB) 100 μ g/ml.

	T U B O							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ASB 100 μ g/ml (ml)	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1	-	-
Agua dest. (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	-	-	-
Soln. problema (ml)	-	-	-	-	-	-	1	1
Solución A (ml)	3	3	3	3	3	3	3	3
	Mezclar y dejar reposar 10 min.							
Solución B (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	Mezclar y dejar reaccionar de 30 a 120 min.							
	Leer absorbancia a 500 nm.							

- 5.10 Cuantificación de antígenos micobacterianos por ELISA.
1. Sensibilizar la placa con IgG de conejo antimicobacteria, hacer la dilución en buffer de carbonatos (pH 9.6, 0.05 M), adicionar 100 μ l por pozo.
 2. Incubar toda la noche a 4°C.
 3. Lavar 4 veces con PBS-T 0.05%, 200 μ l por pozo.
 4. Bloquear con albúmina sérica bovina 1% en PBS-T, --- 100 μ l por pozo.
 5. Incubar toda la noche a 4°C.
 6. Lavar 4 veces con PBS-T, 200 μ l por pozo.
 7. Hacer las diluciones de las muestras en albúmina sérica bovina 1% en PBS-T, para ajustarlas a una concentración de 0.36 mg/ml. Adicionar 100 μ l por pozo.
 8. Incubar una hora a 37°C.
 9. Lavar 4 veces con PBS-T, 200 μ l por pozo.
 10. Hacer la dilución de IgG anti BCG producido en cabra en albúmina sérica bovina 1% en PBS-T, adicionar -- 100 μ l por pozo.
 11. Incubar una hora a 37°C.
 12. Lavar 4 veces con PBS-T, 200 μ l por pozo.
 13. Hacer una dilución de anti IgG de cabra conjugada a peroxidasa en albúmina sérica bovina 1% en PBS-T, adic-- cionar 100 μ l por pozo.
 14. Incubar una hora a 37°C.

15. Lavar 4 veces con PBS-T, 200 μ l por pozo.
16. Adicionar 100 μ l por pozo de sustrato, dejar que desarrolle el color. (anexo)
17. Detener la reacción con 50 μ l por pozo de ácido sulfúrico 2.5 M.
18. Leer la placa a 490 nm.

5.11 Cuantificación de anticuerpos antimicobacteria por ELISA.

1. Sensibilizar la placa con $1\mu\text{g/ml}$ de extracto proteico, hacer la dilución en buffer de carbonatos (pH 9.6, 0.05 M). Adicionar $100\mu\text{l}$ por pozo.
2. Incubar toda la noche a 4°C .
3. Lavar 4 veces con PBS-T 0.05%, $200\mu\text{l}$ por pozo.
4. Bloquear por 2 hr. a 37°C con albúmina sérica bovina 1% en PBS-T, $100\mu\text{l}$ por pozo.
5. Lavar 4 veces con PBS-T, $200\mu\text{l}$ por pozo.
6. Hacer las diluciones de las muestras en albúmina sérica bovina 1% en PBS-T, para ajustar a una concentración de 0.36 mg/ml . Adicionar $100\mu\text{l}$ por pozo.
7. Incubar una hora a 37°C .
8. Lavar 4 veces con PBS-T, $200\mu\text{l}$ por pozo.
9. Hacer una dilución de anti IgG, anti IgM y anti IgA humana conjugada a biotina, en albúmina sérica bovina, adicionar $100\mu\text{l}$ por pozo.
10. Incubar una hora a 37°C .
11. Lavar 4 veces con PBS-T, $200\mu\text{l}$ por pozo.
12. Hacer una dilución de estreptoavidin-peroxidasa en albúmina sérica bovina 1% en PBS-T, adicionar $100\mu\text{l}$ por pozo.
13. Incubar una hora a 37°C .

14. Lavar 4 veces con PBS-T, 200 μ l por pozo.
15. Adicionar 100 μ l por pozo de sustrato y dejar que desarrolle color. (anexo)
16. Detener la reacción con 50 μ l por pozo de ácido sulfúrico 2.5 M.
17. Leer la placa a 490 nm.

5.12 Caracterización de antígenos micobacterianos y de anticuerpos antimicobacteria por inmunoelectrotransferencia.

A) Electroforesis

-Preparación de los geles (cantidad para un gel)

Gel separador (10% acrilamida; TRIS 0.375 M)

Acrilamida	11.7 ml
Buffer TRIS-HCl pH 8.8	8.8 ml
SDS 10%	0.35 ml
Agua destilada	14 ml
Persulfato de amonio 10%	300 μ l
TEMED	12 μ l

Gel concentrador (4% acrilamida; TRIS 0.125 M)

Acrilamida	1.3 ml
Buffer TRIS-HCl pH 6,8	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
Agua destilada	6.1 ml
Persulfato de amonio 10%	50 μ l
TEMED	5 μ l

-Condiciones de corrida

Gel concentrador 25 mA por gel, el voltaje va aumentando durante la corrida.

Gel separador 40 mA por gel

Tiempo de corrida 4-5 horas

-Preparación de las muestras

a) Para la determinación de antígenos tomar 200 μ l de cada LBA precipitado con sulfato de amonio, mezclar con 60 μ l de coctail de electroforesis, hervir 5 min. y guardar en congelación.

b) Para determinar antígenos en macrófagos alveolares emplear las muestras obtenidas anteriormente al procesar la muestra del LBA.

c) Para determinar anticuerpos tomar el volumen necesario de extracto proteico de M. tuberculosis para colocar 900 μ g, mezclar con un volumen igual de ----- coctail de electroforesis, hervir 5 min., guardar en congelación. Emplear un gel preparativo.

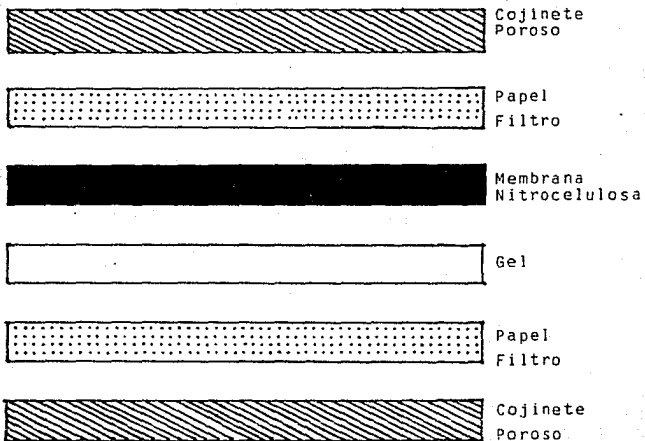
d) Simultáneamente correr electroforéticamente marcadores de peso molecular.

B) Electrotransferencia (48)

Posterior a la corrida electroforética, colocar el gel y la membrana de nifrocelulosa en buffer de transferencia por 30 min.

Colocar el sistema como se muestra en la figura, -- eliminar las burbujas de aire.

A N O D O



C A T O D O

Esquema de colocación de la Electrotransferencia

Realizar la electrotransferencia por 2 hr. a 1 A. Al terminar la transferencia cortar la tira de membrana de nitrocelulosa en donde se encuentran los marcadores de peso molecular, guardarla en una hoja de papel blanco.

c) Revelado

a) Determinación de antígenos

- Bloquear la membrana de nitrocelulosa con albúmina sérica bovina 3% en PBS-T 0.1%, toda la noche a -4°C , con agitación constante.
- Hacer 4 lavados de 15 min. con PBS-T 0.1%.
- Incubar con suero hiperinmune toda la noche a 4°C .
- Hacer 4 lavados de 15 min. con PBS-T.
- Incubar una hora con proteína A conjugada a biotina
- Hacer 4 lavados de 15 min. con PBS-T.
- Incubar una hora con estreptoavidin-peroxidasa.
- Hacer 4 lavados de 15 min. con PBS-T y un lavado con PBS.
- Adicionar el sustrato, dejar que aparezcan las bandas. (anexo)
- Sacar la nitrocelulosa y colocarla en PBS-T, posteriormente lavar con agua corriente.
- Colocar la nitrocelulosa en hojas de papel blanco.

-Realizar los cálculos para determinar peso molecular a las bandas observadas.

b) Determinación de anticuerpos

-Bloquear la membrana de nitrocelulosa con albúmina sérica bovina 3% en PBS-T 0.1%, toda la noche a -4°C , con agitación constante.

-Hacer 4 lavados de 15 min. con PBS-T 0.1%.

-Cortar la membrana de nitrocelulosa en tiras de 0.5 cm.

-Colocar 3 tiras de nitrocelulosa en cada tubo que contiene la muestra de LBA precipitado con sulfato de amonio en una dilución 1:10, realizar la dilución en albúmina sérica bovina 1% en PBS-T. Colocar tres tiras en un tubo conteniendo PBS (control negativo).

-Incubar toda la noche a 4°C .

-Hacer 4 lavados de 15 min. con PBS-T.

-Colocar cada una de las tres tiras de nitrocelulosa en tres tubos que contienen diluciones de anti IgG, IgM e IgA humanas conjugadas a biotina.

-Incubar una hora a 4°C .

-Hacer 4 lavados de 15 min. con PBS-T.

-Colocar todas las tiras de nitrocelulosa en un recipiente con estreptoavidin-peroxidasa.- Incubar una hora.

- Hacer 4 lavados de 15 min. con PBS-T y un lavado con PBS.
- Adicionar el sustrato, dejar que aparezcan las - bandas.
- Sacar las tiras de nitrocelulosa y colocarlas en PBS-T, posteriormente lavarlas con agua corriente.
- Colocar las tiras de nitrocelulosa en hojas de pa pel blanco.
- Realizar los cálculos para determinar peso molecular a las bandas observadas.

NOTA: Para preparación de reactivos ver anexo.

6. RESULTADOS

De los lavados bronquioloalveolares (LBA) de pacientes con tuberculosis miliar y del grupo control, empleando los métodos de ELISA e inmunoelectrotransferencia se obtuvieron los siguientes resultados:

La tabla 1 y la gráfica 1 muestran los niveles de antígeno de M. tuberculosis aplicando el método de ELISA.

Las tablas 2, 3 y 4, así como la gráfica 2, representan los niveles de anticuerpos dirigidos contra M. tuberculosis determinados por el método de ELISA.

La figura 1 representa los antígenos de M. tuberculosis encontrados en sobrenadante de los LBA utilizando el método de inmunoelectrotransferencia. En la gráfica 3, se observa la frecuencia en que aparecen tales antígenos.

La figura 2 así como la gráfica 4, representan la presencia y frecuencia de antígenos de M. tuberculosis presentes en macrófagos alveolares de pacientes con tuberculosis miliar y del grupo control, determinados por el método de inmunoelectrotransferencia.

La figura 3 muestra la detección de anticuerpos específicos dirigidos contra M. tuberculosis. En lo que respecta a las gráficas 5, 6 y 7 se muestra la frecuencia con la que aparecen éstos anticuerpos del tipo IgG, IgM e IgA respectivamente.

TABLA 1. Determinación de antígenos micobacterianos por el método de ELISA.

GRUPO I		GRUPO II	
Muestra	Absorbancia 490 nm	Muestra	Absorbancia 490 nm
1	0.73	1	0.06
2	0.37	2	0.06
3	0.31	3	0.06
4	0.22	4	0.05
5	0.22	5	0.04
6	0.20	6	0.04
7	0.12	7	0.02
8	0.10	8	0.02
9	0.09	9	0.00
10	0.07		
11	0.05		
12	0.03		
13	0.02		

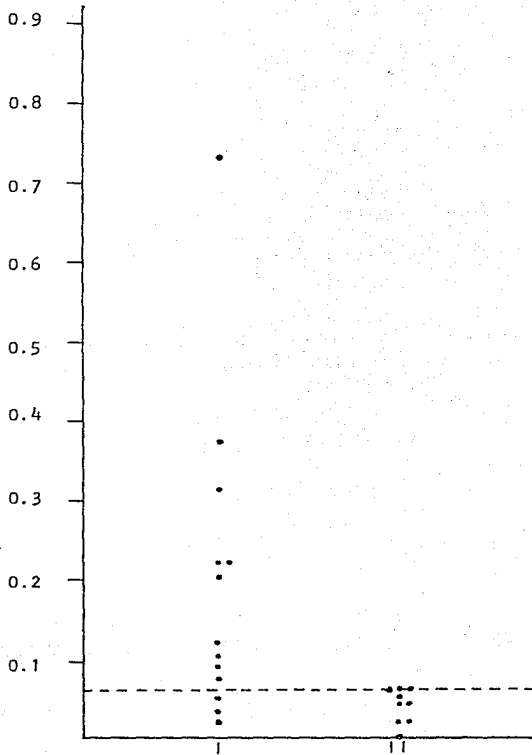
$$\bar{X} = 0.038$$

$$\sigma = 0.02$$

$$\text{Valor de corte} = 0.06 \\ (\bar{X} + 2\sigma)$$

GRUPO I = pacientes con tuberculosis miliar.

GRUPO II = grupo control.



GRAFICA 1. Detección de antígenos de M. tuberculosis en sobrenadante de LBA por el método de ELISA.

I = pacientes con TB miliar

II = grupo control.

TABLA 2. Determinación de anticuerpos tipo IgG anti M. tuberculosis por el método de ELISA.

GRUPO I		GRUPO II	
Muestra	Absorbancia 490 nm	Muestra	Absorbancia 490 nm
1	1.82	1	0.19
2	0.15	2	0.08
3	1.82	3	0.05
4	1.89	4	0.03
5	1.85	5	0.01
6	1.92	6	0.00
7	0.24	7	0.00
8	0.92	8	0.01
9	0.70	9	0.31
10	0.92		
11	0.56	$\bar{X} = 0.07$	
12	0.33	$\sigma = 0.1$	
13	1.45		

Valor de corte = 0.27
($\bar{X} + 2\sigma$)

GRUPO I = pacientes con tuberculosis miliar.

GRUPO II = grupo control.

TABLA 3. Determinación de anticuerpos tipo IgM anti M. tuberculosis por el método de ELISA.

GRUPO I		GRUPO II	
Muestra	Absorbancia 490 nm	Muestra	Absorbancia 490 nm
1	0.74	1	0.04
2	0.01	2	0.00
3	0.02	3	0.00
4	0.27	4	0.00
5	0.21	5	0.00
6	0.40	6	0.00
7	0.10	7	0.00
8	0.80	8	0.00
9	0.10	9	0.00
10	0.28		
11	0.26	$\bar{X} = 0.004$	
12	0.03	$\sigma = 0.012$	
13	0.25		

Valor de corte = 0.03
($\bar{X} + 2\sigma$)

GRUPO I = pacientes con tuberculosis miliar.

GRUPO II = grupo control.

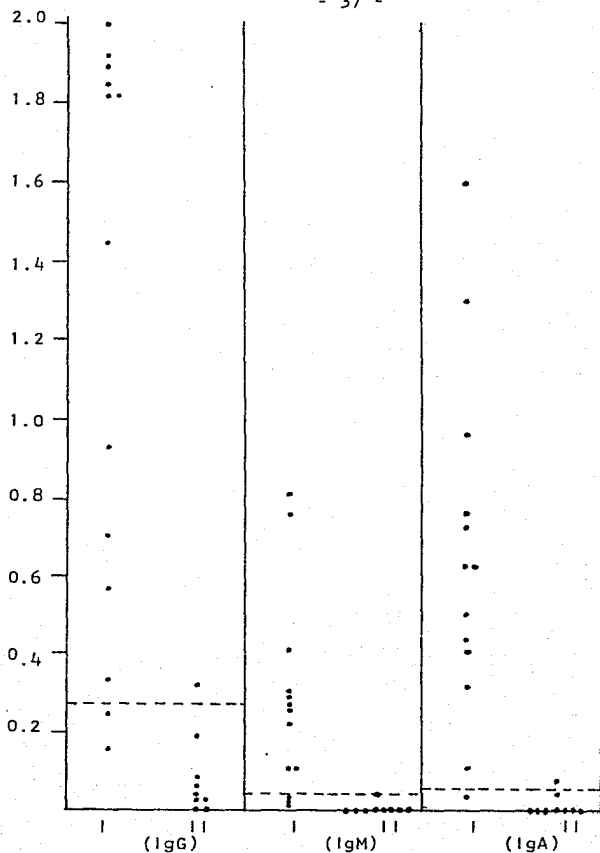
TABLA 4. Determinación de anticuerpos tipo IgA anti M. tuberculosis por el método de ELISA.

GRUPO I		GRUPO II	
Muestra	Absorbancia 490 nm	Muestra	Absorbancia 490 nm
1	1.30	1	0.03
2	0.03	2	0.00
3	0.71	3	0.00
4	0.49	4	0.00
5	0.95	5	0.00
6	0.61	6	0.00
7	0.10	7	0.00
8	1.59	8	0.00
9	0.31	9	0.07
10	0.61		
11	0.39		$\bar{x} = 0.011$
12	0.42		$\sigma = 0.022$
13	0.75		

Valor de corte = 0.05
($\bar{x} + 2\sigma$)

GRUPO I = pacientes con tuberculosis miliar.

GRUPO II = grupo control.



GRAFICA2 Detección de anticuerpos IgG, IgM e IgA contra M. tuberculosis en LBA.
I = pacientes con TB miliar.
II = grupo control.

Se analizaron los datos obtenidos por el método de ELISA -
utilizándo las pruebas estadísticas de ANADEV A.

Hipótesis empleadas :

H_0 = No hay diferencia significativa entre los resulta-
dos del grupo de pacientes con tuberculosis miliar
y el grupo control.

H_a = Si hay diferencia significativa entre los resulta-
dos del grupo de pacientes con tuberculosis miliar
y el grupo control.

Regla de desición :

Si F calculada $>$ F tablas, se rechaza H_0 .

Si F calculada $<$ F tablas, se acepta H_0 , lo que indicaría
que las diferencias son debidas a la variabilidad bioló -
gica de las unidades de experimentación.

F tablas para 1 y 20 grados de libertad con un intervalo -
de confianza de 95% = 4.35

F calculada para :

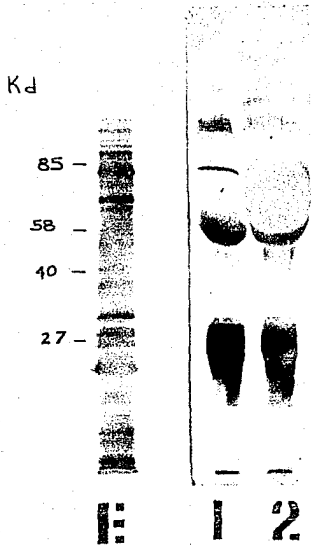
Determinación de antígenos = 5.66

Determinación de anticuerpos clase IgG = 20.83

Determinación de anticuerpos clase IgM = 9.51

Determinación de anticuerpos clase IgA = 17.53

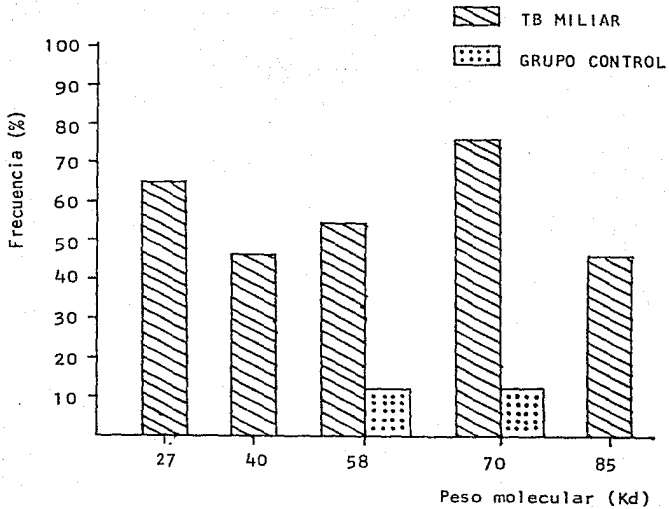
En todos los casos F calculada $>$ F tablas, por lo tanto se rechaza H_0 y se concluye que las diferencias entre los valores obtenidos en LBA de pacientes con tuberculosis miliar y LBA del grupo control no son debidas a la variabilidad biológica sino a la presencia de la infección por Mycobacterium tuberculosis.



F I G U R A 1

Detección de antígenos en sobrenadante de LBA de pacientes con TB miliar.

E=extracto proteico vs. suero hiperinmune anti M.tuberculosis,
1,2 =pacientes con TB miliar.



GRAFICA 3. Frecuencia de antígenos de M. tuberculosis en sobrenadante de LBA.

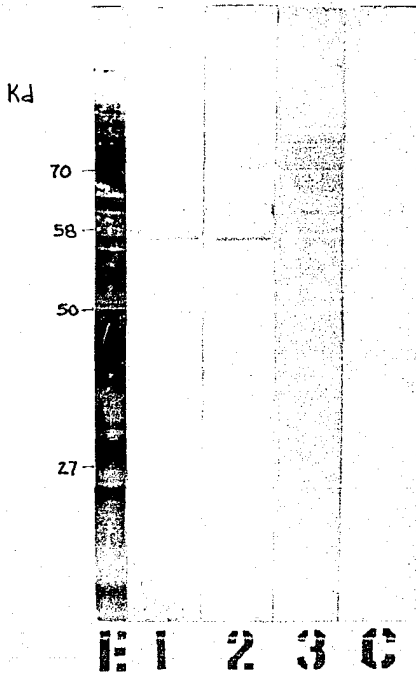
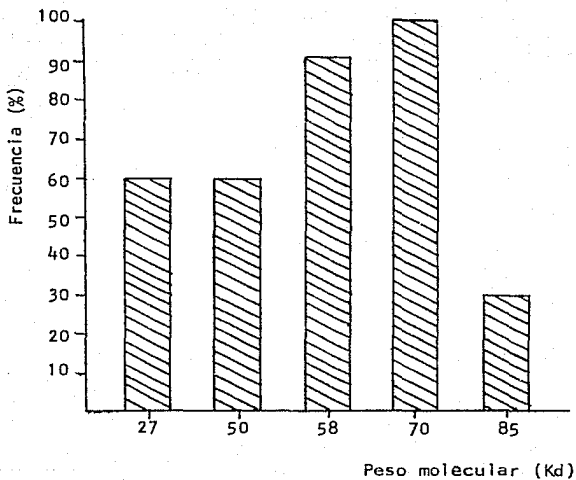


FIGURA 2

Detección de antígenos en macrófagos alveolares de LBA de pacientes con TB miliar por Western Blot.

E= extracto proteico, 1,2,3.=pacientes con TB miliar, C-control.



GRAFICA 4. Frecuencia de antígenos en macrófagos alveolares de pacientes con TB miliar.

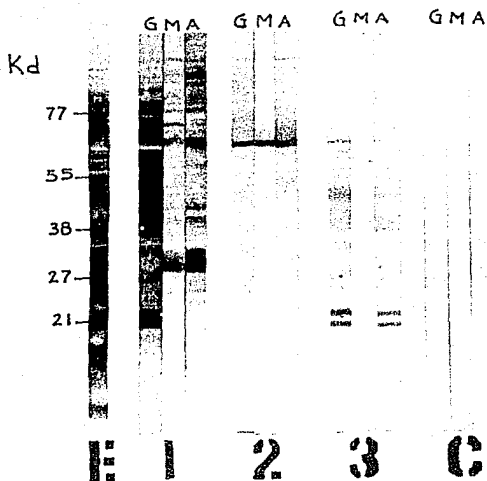
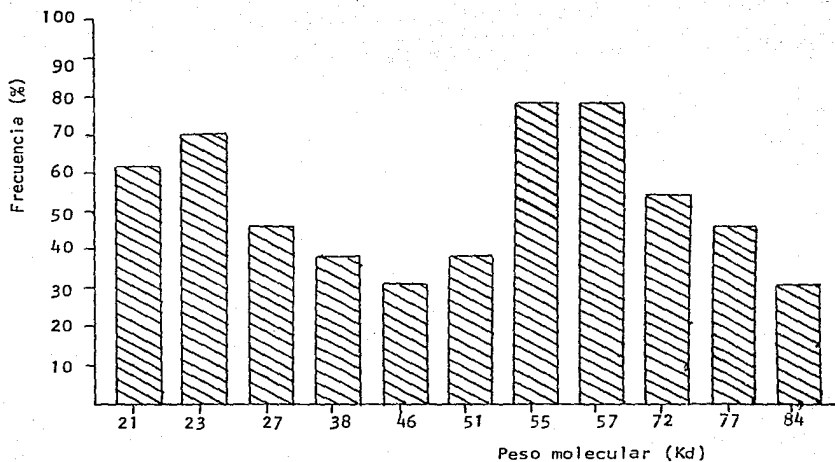


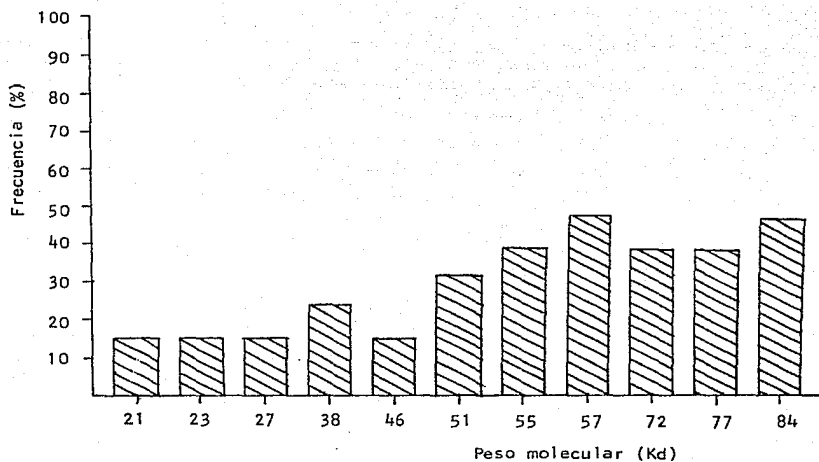
FIGURA 3

Detección de anticuerpos contra M.tuberculosis en LBA de pacientes con TB miliar. Western Blotting.

E=extracto proteico de M.tuberculosis
1,2,3 =LBA de TB miliar C=control.



GRAFICA 5. Frecuencia de anticuerpos tipo IgG dirigidos contra extracto proteico de M. tuberculosis en sobrenadante de LBA de pacientes con TB miliar.



GRAFICA 6. Frecuencia de anticuerpos tipo IgM dirigidos contra extracto proteico de M. tuberculosis en sobrenadante de LBA de pacientes con TB miliar.

7. ANALISIS DE RESULTADOS

Debido a que la inmunidad a nivel pulmonar en la tuberculosis no es clara, es importante la caracterización de antígenos de Mycobacterium tuberculosis en LBA para el estudio de la actividad inmunológica que tienen en el huésped.

Por el método de inmunolectrotransferencia se encontraron los siguientes antígenos proteicos:

El antígeno de 70 Kd se encontró en alta proporción tanto en sobrenadante de LBA como en macrófagos alveolares, la actividad inmunológica de éste antígeno se ha descrito que induce la respuesta de linfocitos T "in vivo" e "in vitro". (2)

El antígeno de 40 Kd se encuentra solamente en sobrenadante del LBA, dicho antígeno se correlaciona con el antígeno de 38 Kd descrito por Young y col. (55) que provoca una respuesta de linfoproliferación.

También se hallaron antígenos de 27, 50, 58 y 85 Kd, pero no se ha descubierto su papel en la inmunología de la tuberculosis.

Al comparar la frecuencia en que aparecen los antígenos de M. tuberculosis en sobrenadante de LBA de pacientes con tuberculosis miliar y en sobrenadante de LBA del grupo control, se observa que en el grupo control aparecen antígenos de 58 y 70 Kd en una frecuencia de 11%, lo cual puede indicar que existe

reacción cruzada de éstos antígenos con otras proteínas presentes en el sobrenadante del LBA, ya que éstos antígenos no están presentes en macrófagos alveolares del grupo control y que están en alta proporción en macrófagos alveolares de pacientes con tuberculosis miliar.

Los antígenos de 27, 40, 85 Kd no están presentes en LBA del grupo control, lo cual indica que éstos son específicos.

La presencia de antígenos de pesos moleculares similares en el sobrenadante de los LBA y en macrófagos alveolares puede indicar que los macrófagos alveolares no degradan éstos antígenos de M. tuberculosis, esto podría explicar el mecanismo de resistencia de las micobacterias patógenas en el macrófago, ya que éstas proteínas podrían alterar la función celular, por ejemplo la fusión fagosoma-lisosoma lo que permite la evasión del parásito. (17)

En la detección de anticuerpos dirigidos contra M. tuberculosis por el método de inmunoelectrotransferencia, se encontró lo siguiente:

- a) Una frecuencia mayor de anticuerpos tipo IgG dirigidos contra antígenos de peso molecular aproximado de 23, 55, 57 Kd.
- b) De acuerdo a la gráfica 6 de anticuerpos tipo IgM se observa una respuesta incrementada hacia los antígenos de peso molecular aproximado de 55, 57, 72 Kd.

c) Los antígenos de peso molecular aproximado de 55, 57, 72, 77, 84 Kd son los que presentan una mayor inducción de anticuerpos del tipo IgA.

Por el método de ELISA se demostró que existe una diferencia significativa entre los datos de concentración de antígeno y de anticuerpos del grupo control y del grupo de pacientes con tuberculosis miliar.

En los LBA de pacientes con tuberculosis miliar hay un incremento en la producción de anticuerpos a nivel local en la siguiente frecuencia $IgG > IgA > IgM$.

8. CONCLUSIONES.

Del presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

1) Se observó un incremento en la producción de anticuerpos a nivel pulmonar dirigidos contra M. tuberculosis en LBA de -- pacientes con tuberculosis miliar.

2) De acuerdo a los métodos empleados se encontró que la frecuencia de anticuerpos siguen el orden de IgG, IgA e IgM - en proporción decreciente.

3) Se detectó la presencia de antígenos de M. tuberculosis de pesos moleculares similares tanto en macrófagos alveolares como en sobrenadante de los LBA analizados.

4) De acuerdo al inciso 3 se deduce que los macrófagos alveolares no degradan los antígenos de pesos moleculares anteriormente mencionados, lo que probablemente implica el efecto patogénico de la micobacteria.

5) Los anticuerpos detectados en los LBA reconocieron antígenos específicos con peso molecular entre 21-84 Kd.

6) En casos seleccionados la detección de antígenos y de anticuerpos en LBA pueden tener una utilidad diagnóstica.

9. ANEXO

MEDIO DE CULTIVO (DMEM) pH 7.2

DMEM--- un sobre

Bicarbonato de sodio --- 3.8g

Hepes --- 4.82 g

Adicionar agua destilada para aforar a un litro, antes de aforar ajustar el pH a 7 con HCl 0.01 N o NaOH 0.01 N. Esterilizar por filtración.

SOLUCION SATURADA DE SULFATO DE AMONIO

Sulfato de amonio --- 80g

Disolver el 100 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH.

BUFFER DE CARBONATOS (pH 9.6, 0.05 M)

Na₂CO₃--- 1.59g

NaHCO₃--- 2.93g

Aforar a un litro con agua destilada, ajustando el pH antes de llegar al aforo.

BUFFER DE CITRATOS-FOSFATOS (pH 5, 0.1 M)

Citrato de sodio --- 29.4g

Aforar a un litro con agua destilada, ajustando el pH con ácido fosfórico.

BUFFER TRIS-HCl (pH 8.8, 1.5 M)

TRIS 18.17g

Aforar a 100 ml con agua destilada, ajustando el pH con HCl antes de llegar al aforo, filtrar con Whatman Nº 1.

Guardar a 4°C. no más de un mes.

BUFFER TRIS-HCl (pH 6.8, 0.5 M)

TRIS 6.057g

Aforar a 100 ml con agua destilada, ajustando el pH con HCl antes de llegar al aforo, filtrar con whatman Nº 1.

Guardar a 4°C. no más de un mes.

BUFFER DE FOSFATOS SALINO (PBS pH 7.2, 0.01 M)

Solución A NaH_2PO_4 --- 27.5g aforar a un litro

Solución B Na_2HPO_4 --- 28.3g aforar a un litro

Tomar 33.5 ml de la solución B

16.5 ml de la solución A

7.4 g de cloruro de sodio

Aforar a un litro, ajustando el pH

PBS-T 0.05%

Tween 20 --- 0.5 ml

Adicionar a un litro de PBS 0.01 M, pH 7.2

PBS-T 0.1%

Tween 20 --- 1 ml

Adicionar a un litro de PBS 0.01 M, pH 7.2

BUFFER DE ELECTROFORESIS

(TRIS 0.025 M, glicina 0.19 M, SDS 0.1%, pH 8.3)

TRIS - - - 12g

Glicina --- 57.6g

SDS --- 40 ml de una solución al 10%

Llevar a 4 litros con agua destilada, ajustar el pH y filtrar.

BUFFER DE ELECTROTRANSFERENCIA

(TRIS 0.025 M, glicina 0.19 M, Metanol 20%, pH 8.3)

TRIS --- 12g

Glicina --- 57.6g

Metanol --- 800 ml

Llevar a 4 litros con agua destilada, ajustar el pH - con NaOH, no utilizar HCl, filtrar.

COCTAIL DE ELECTROFORESIS

2 ml glicerol

2 ml SDS 10%

2 ml TRIS (pH 6.8, 0.5 M)

4 ml agua destilada

100 μ l 2-mercaptoetanol

Pizca azul de bromofenol

10. BIBLIOGRAFIA

1. Armstrong J.A., Hart P.D. Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis with observation on fusion of - lysosomes with phagosomes. J.Exp. Med. 134: 713 (1971).
2. Britton J.W., Hellquist L. Immunoreactivity of a 70 KD --- protein purified from Mycobacterium bovis bacillus Calmette - Guerin by monoclonal antibody affinity chromatography. J. Exp. Med. 164 : 695 (1986).
3. Collins F.M. The immunology of tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 125 : 42 (1982).
4. Comstock G.W. Tuberculosis. Bact. Inf. of Hum. Ep. and con- rol. 33 : 605 (1982).
5. Cruchaud A., Girard J. The functions of human monocytes in normal subjects and in disorders associated with immune defi- ciency. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 54 : 529 (1977).
6. Chandler, Tuller W., Jackson R.M. Studies of membrane re- ceptors and phagocytosis in subpopulations of rat alveolar -- macrophages. Am. Rev. Respir. Dis. 138 : 461 (1986).
7. Chaperas S.D. The immunology of mycobacterial infections. CRC Crit. Rev. Microbiol. 9 : 139 (1982).
8. Chesnut R.W., Grey A.M. Antigen presenting cells and mecha- nisms of antigen presentation. CRC Crit. Rev. Immun. 5 : 263 (1985).
9. Daniel T.M., Olds G.R. Demostration of a shared epitope - among mycobacterial antigens using a monoclonal antibody. Clin. Exp. Immun. 60 : 249 (1985).

10. Daniel T.M. The immunology of tuberculosis. *Courses in Chest Med.* 1 : 189 (1980).
11. Daniel T.M., Affronti. A reference system for antigens of Mycobacterium tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 104 : 602 (1971).
12. Daniel T.M., Janicki B.W. Mycobacterial antigens a review of isolation, chemistry and immunological properties. *Microbiol. Rev.* 42 : 84 (1978).
13. Davies, Dulbelcco. *Tratado de Microbiología*. 2a. edición. Ed. Salvat. España. 868 (1978).
14. Dearborne E., Kirk P. The immunology of mycobacterial --- diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134 : 1062 (1986).
15. Ellner J.J. Suppressor adherent cells in human tuberculosis. *J. Immun.* 121 : 2573 (1978).
16. Engvall E. Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. *Meth. in -- Enzyme.* 70 : 419 (1980).
17. Flesh I. KaufmannS.H. Mycobacterial growth inhibition by interferón-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of Mycobacterium tuberculosis. *J. Immun.* 138 : 4408 (1987).
18. Gershani J.M., Palade G.E. Review protein blotting : prin ciples and applications. *Anal. Biochem.* 131 : 145 (1983).
19. Gonzalez S.N., Torales T.A. *Infectología clínica*. 1a. edi ción. Ed. Trillas. México. 107 (1984).

20. Goren M.B., Hart P.D. Prevention on phagosome-lysosome -- fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73 : 2510 (1976).
21. Goren M.B. Immunoreactive substances of mycobacteria. Am. Rev. Respir. Dis. 125 : 50 (1982).
22. Hahn H., Kaufmann S.H. The role of cell-mediated immunity in bacterial infectious. Rev. Infect. Dis. 3 : 1221 (1981).
23. Hakan N., Hans A.H. Conjugation of horseradish peroxidase to Staphylococcal protein A with benzoquinone, glutaraldehyde or periodate as cross-linking reagents. J. Hist. 29 : 266 (1981).
24. Harmsen A.G., Bice D.E. The effect of local antibody responses on in vitro and in vivo phagocytosis by pulmonary alveolar macrophages. J. Lueuk. Biol. 37 : 483 (1985).
25. Hattikudur S. Characterization of target antigen of cell - mediated immunity in Mycobacterium tuberculosis H 37RV. J. Med. Microbiol. 18 : 17 (1984).
26. Kato M. Studies of a biochemical lesion in experimental -- tuberculosis in mice VIII. Effect of derivatives and chemical analoges of cord factor on structure and function of mouse liver mitochondria. Am. Rev. Respir. Dis. 98: 668 (1968).
27. Kingston, Salgame. Immunological activity of a 14-Kilodalton recombinant protein of Mycobacterium tuberculosis H 37RV. Infect. and Immun. 55 : 3149 (1987).

28. Krambovitis E., Harris M. Improved serodiagnosis of tuberculosis using two assay test. J. Clin. Pathol. 39; 779 (1986).
29. Laurence F. Supplement on future research in tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 134 : 401 (1986).
30. Maxwell K.W. Phagocytosis and intracellular fate of Mycobacterium tuberculosis : in vitro studies with guinea pig peritoneal and alveolar mononuclear phagocytes. J. Immunol. 101 : 176 (1968).
31. Minden P., Houghten R. A chemically synthesised peptide -- wich elicits humoral and cellular immune responses to mycobacterial antigens. Infect. Immun. 58 : 560 (1986).
32. Moulder J.W. Comparative biology of intracellular parasitism Microbiol. Rev. 49 :298 (1985).
33. Myrvik Q.N., Leake E.J. Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37RV strain Mycobacterium tuberculosis A correlate of virulence. Am. Rev. Respir. Dis. 129:322 (1984).
34. Nielsen H., Bennedsen J. Defective monocyte chemotaxis in pulmonary tuberculosis. Eur. J. Respir. Dis. 63:122 (1982)
35. Offtung F. Human T cellsclones recognize two abundant Mycobacterium tuberculosis protein antigens expressed in Escherichia coli. J. Inmun. 138:927 (1987)

36. Orme J.M., Collins F.M. Adoptive protection of the Mycobacterium tuberculosis infected lung: dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those - that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin. -- Cell. Immun. 84:113 (1984).
37. Orme J.M. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with Mycobacterium tuberculosis. J. Immun. 138:293 (1987).
38. Pattisapu R.J. In vitro response of murine alveolar and - peritoneal macrophages to Mycobacterium intracellulare. Am. - Rev. Respir. Dis. 128:1044 (1983).
39. Pedrazzini T., Louis J.A. Function analysis in vitro and in vivo of Mycobacterium bovis strain BCG specific T cell clones. J. Immunol. 136:1828 (1986).
40. Reinhard R., Gainer H. Polyacrylamide gel electrophoresis: principles, techniques and micromethods. Ch 4:245.
41. Scott H., Kaufmann. The erasable Western blot. Anal. Biochem. 161:89 (1987).
42. Seibert F.B. The isolation of three different proteins - and two polysaccharides from tuberculin by alcohol fractionation. Their chemical and biological properties. Am. Rev. - - Tuberc. 59:86 (1949).
43. Someya S., Hayashi O. Studies on the antigenicity of tuberculin active peptide. Am. Rev. Respir. Dis. 86:542 (1962).

44. Sowry O.R., Farr A.L. Protein measurement with folin phenal reagent. J. Biol. Chem. 193:265 (1951).
45. Stratis A. Coupling of enzymes to proteins with gluteraldehyde use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. Immunochemistry. 6:43 (1969).
46. Straus E., Wu N. Clinical Applicarlons of radioimmunoassay of secretory tuberculoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:3214 (1981).
47. Thole J.E. Characterization, sequence determination and immunogenicity of a 64- Kilodalton protein of Mycobacterium bovis BCG expressed in Escherichia coli K-12. - Infect. and Immun. 55:1466 (1987)
48. Towbin H.T., Staehelin. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose shechts: - procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76:4350 (1979).
49. Tweardy D.J., Schacter B.Z. Association of altered dynamics of monocyte surface expression of human leukocyte antigen DR with immunosuppression in tuberculosis. J. Infect. Dis. 149:31 (1984).
50. Unanue E.R., Allen P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. Science. - 236:551 (1987).

51. Vandiviere H.M., Seibert F.B. Comparison between purified individual tuberculoproteins and the international standard - tuberculin, J. Infect. Dis. 108:45 (1961).
52. Wade A.A., Rabson A.R. Production of a suppressor factor by adherent cells from Mycobacterium tuberculosis-infected - guinea pigs. Clin. Exp. Immun. 45:427 (1981).
53. Yanez M.A., Coppola M.P. Determination of mycobacterial - antigens in sputum by enzyme immunoassay. J. Clin. Microbiol. 23:822 (1986).
54. Yolken R.M. Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids: current limitations and future prospects. Rev. Infect. Dis. 4: (1982).
55. Young D.B., Kent L. Immunological activity of a 38-Kilodalton protein purified from Mycobacterium tuberculosis Infect Immun. 54:177 (1986).