

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Estudio de la respuesta Th1 inducida por las proteínas  
ESAT-6 y 38-kDa de *M. tuberculosis* en la vacuna BCG  
(bacilo Calmette-Guèrin)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
P R E S E N T A:  
MAURICIO CASTAÑÓN ARREOLA  
TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL



MEXICO, D.F.

2005

m345864



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Yolanda López Vidal en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina, UNAM.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina
Dra. Clara Inés Espitia Pinzón	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Alejandro Cravioto	Facultad de Medicina

El proyecto se realizó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto G36923-M y beca crédito 144121), el Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP 202304) y la Dirección general de asuntos del personal académico (complemento de beca).

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo excepcional.  
NOMBRE: Mauricio Castañón  
Arreola  
FECHA: Junio 14, 2005  
FIRMA: 



## DEDICATORIA

*A mis padres*

*hermanos*

*y amigos.*

## AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana.

Al laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y la Nutrición “Salvador Zubirán”.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
ANTECEDENTES	1
Tuberculosis en el mundo	2
Epidemiología molecular de la TB	4
Marcadores genéticos en la epidemiología de la tuberculosis	4
Tuberculosis en México	8
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
Patogénesis de la Tuberculosis	13
El Granuloma	16
Vacuna BCG (bacilo Calmette-Guérin)	18
Subcepas BCG	21
Desarrollo de nuevas vacunas	24
Antígenos inmunodominantes en el desarrollo de nuevas vacunas	25
Proteína de 38-kDa	26

ESAT-6	27
JUSTIFICACIÓN	30
OBJETIVO	31
OBJETIVOS PARTICULARES	32
MATERIAL Y MÉTODOS	
Bacterias	33
Preparación de Inóculos	34
Animales de estudio	35
Construcción de <i>M. bovis</i> BCG recombinantes	35
Preparación de células electrocompetentes	35
Electroporación de células competentes	36
Clonación de ESAT-6 de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	36
Vacunación de ratones BALB/c	38
Modelo de infección	38
Hipersensibilidad retardada tipo IV (DTH)	39
CFU en pulmón	39
Análisis Histopatológico	40
Anticuerpos para citometría de flujo	40
Tinción con marcadores de superficie CD4+, CD8+	41
Tinción intracelular	42
Determinación de IgG1 e IgG2a	42
Análisis estadístico	43
RESULTADOS	
EVALUACIÓN DE 10 SUBCEPAS BCG	44
Supervivencia de ratones vacunados e infectados	44

Hipersensibilidad retardada tipo IV (DTH)	44
Carga bacilar en pulmón	46
Histopatología de pulmón	48
VACUNAS RECOMBINANTES	50
Construcción de vacunas recombinantes	50
Supervivencia	51
Respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH)	53
UFC en pulmón	55
Análisis histopatológico	58
Subpoblaciones celulares	60
Perfil de citocinas en células extraídas de pulmón.	62
Respuesta Humoral	65
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	
Primera Etapa	77
Segunda etapa	78
BIBLIOGRAFIA	80

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	
Distribución Mundial de la Tuberculosis	3
<b>Figura 2.</b>	
Elementos utilizados para la de tipificación molecular de <i>M. tuberculosis</i>	6
<b>Figura 3.</b>	
Distribución Mundial de <i>M. tuberculosis</i> genotipo Beijing.	7
<b>Figura 4.</b>	
Incidencia de Tuberculosis en México	8
<b>Figura 5.</b>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
<b>Figura 6.</b>	
Respuesta inmune y formación de granulomas.	17
<b>Figura 7.</b>	
Meta-análisis de la eficacia protectora de BCG.	20
<b>Figura 8.</b>	
Reconstrucción de la genealogía de las diferentes subcepas de BCG por microarreglos.	23
<b>Figura 9.</b>	
Evaluación de nuevas vacunas contra la tuberculosis.	25

<b>Figura 10.</b>	
Mecanismo propuesto para la secreción de ESAT-6.	29
<b>Figura 11</b>	
Respuesta de hipersensibilidad retardada a los 2 y 4 meses de infección con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	45
<b>Figura 12</b>	
UFC en pulmón de ratones vacunados con 10 subcepas BCG y retados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	47
<b>Figura 13</b>	
Neumonía en pulmón de ratones vacunados e infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	49
<b>Figura 14</b>	
Cuantificación de ESAT-6 y 38-kDa en las vacunas rBCGE6 y rBCG38.	51
<b>Figura 15</b>	
Curva de supervivencia en ratones vacunados e infectados con <i>M. tuberculosis</i> Beijing.	52
<b>Figura 16</b>	
Respuesta de hipersensibilidad retardada tipo IV en ratones vacunados e infectados.	54
<b>Figura 17</b>	
Porcentaje de tejido pulmonar con neumonía en ratones vacunados e infectados.	59

**Figura 18**

Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> durante la infección  
de ratones vacunados.

61

**Figura 19**

Producción de citocinas en pulmón durante  
la infección de ratones vacunados.

64

**Figura 20**

Titulación de isotipos IgG1 e IgG2a en ratones  
vacunados con rBCG38

66

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1**

Clasificación de micobacterias según el riesgo de infección 12

**Tabla 2**

Subcepas BCG 34

**Tabla 3**

Unidades Formadoras de Colonia en pulmón de ratones  
vacunados e infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. 56

**Tabla 4**

Unidades Formadoras de Colonia en pulmón de ratones  
vacunados e infectados con *M. tuberculosis* Beijing. 57



## ABREVIACIONES

ADC	Albúmina-dextrosa-catalasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag5	Antígeno cinco
ATCC	Colección de cultivos tipo americano
ATP	Adenosin trifosfato
BCG	Bacilo Calmette-Guèrin
CD4	Designación de Grupo 4
CFP-10	Proteína filtrada de cultivo de 10-kDa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DAF	Diacetato de fluoresceína
DO	Densidad óptica
DS	Desviación estándar
ESAT-6	Antígeno blanco de secreción temprana de 6-kDa
ESM	Sociedad Europea de Micobacteriología
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gravedad
GC	Guanina-Citosina
h	Horas
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFN- $\gamma$	Interferón gamma

IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS2	Sintetasa de oxido nitrico inducible
IS	Secuencias de inserción
kDa	Kilo daltones
kHz	Kilo hertzios
kpb	Kilo pares de bases
Log	Logaritmo base 10
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
min	Minutos
ml	Militros
MNT	Micobacterias no tuberculosas
Mø	Macrófagos alveolares
MR	Multi-Resistencia
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
OADC	Ácido oléico-albúmina-dextrosa-catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PGRS	Secuencia polimórfica rica en GC
pH	Potencia de hidrógeno
PPD	Derivado de proteínas purificado
RD	Secuencias directas repetidas

RNI	Intermediarios reactivos de nitrógeno
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
R-PE	R-Ficoeritrina
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
TB	Tuberculosis
TB-MR	Tuberculosis multi-resistente
Th	Respuesta T cooperadora
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonia
UICTER	Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
Vtz	Voltz
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\mu\text{m}$	Micrómetros

## Resumen

La efectividad del bacilo Calmette-Guèrin (BCG) para reducir la prevalencia de la tuberculosis es pobre, lo cual resulta en la urgente necesidad de mejorar los programas de inmunización con nuevas y más eficientes vacunas contra la tuberculosis. En este estudio se comparó la eficacia protectora de diez subcepas BCG en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva con la finalidad de desarrollar una vacuna recombinante que brinde mayor protección contra la infección con *M. tuberculosis* H37Rv y la cepa hiper-virulenta 9591000 de *M. tuberculosis* perteneciente al genotipo Beijing. En este modelo, en los tiempos seleccionados posteriores a la infección se determinaron la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), las unidades formadoras de colonia (UFC), el daño histopatológico y, en las vacunas nuevas recombinantes la respuesta inmune. La vacunación con BCG protege de forma significativa contra un reto con *M. tuberculosis* H37Rv. Sin embargo, cada subcepa BCG induce diferente grado de protección en cada una de las variables estudiadas, siendo los animales inmunizados con la subcepa Phipps los que tuvieron las menores UFC y área neumónica a los 4 meses de infección con *M. tuberculosis* H37Rv. Las subcepas Phipps y Tice fueron usadas para producir las vacunas recombinantes rBCG38 (Tice) y rBCGE6 (Phipps), que sobre-expresan las proteínas de 38-kDa y ESAT-6. A diferencia de los grupos vacunados con la subcepa Phipps, los animales inmunizados con rBCGE6 no desarrollaron protección. La vacuna rBCG38 incrementó significativamente la supervivencia de los animales infectados tanto con *M. tuberculosis* H37Rv como con *M. tuberculosis* Beijing. Esta vacuna indujo respuesta Th 1, evidenciada por la presencia de un gran número de células productoras de IL-2 e IFN- $\gamma$  en los pulmones de los ratones vacunados e infectados, así como por el incremento en la relación IgG2a:IgG1 en sus sueros.

## Abstract

The effectiveness of *Bacillus Calmette-Guèrin* (BCG) vaccination in reducing tuberculosis (TB) prevalence rates is poor, resulting in urgent need for improved immunization programs, with new and more effective vaccines against TB. The aim of this study was to compare the protective efficacy of ten different BCG substrains in mice model of progressive pulmonary tuberculosis to develop a recombinant BCG vaccine against TB in order to enhance protection against infection by *M. tuberculosis* H37Rv and hyper-virulent *M. tuberculosis* Beijing genotype. At selected times after challenge, the delayed hypersensitivity (DTH) response colony forming units (CFU) and histopathological damage were determined. For recombinant vaccines, immune response was also evaluated. Vaccination with BCG significantly protects against challenge with *M. tuberculosis* H37Rv. However every substrain induces different protection according to variables measured. Animals immunized with the BCG substrain Phipps had the lowest CFU count and the smallest pneumonic area, at 4 months after challenge with *M. tuberculosis* H37Rv. BCG Phipps and BCG Tice substrains were used to produce the recombinant vaccines, rBCG38 (Tice) and rBCGE6 (Phipps) which overexpress the 38-kDa protein and ESAT-6 antigen in BCG. In mice vaccinated with rBCGE6 none protection was observed compared with Phipps substrain. Vaccination with the rBCG38 increased survival of mice infected with either *M. tuberculosis* H37Rv or the Beijing strain (isolate 9501000). This vaccine induced a strong and highly significant Th1 response, shown by the high level of IL-2 and IFN-gamma cytokine producer cells found in the lungs of challenged mice, and an increase in the IgG2a:IgG1 ratio found in the pooled sera of the vaccinated mice.



## Antecedentes

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa crónica que afecta a personas de todas las edades, predominando en adultos jóvenes (20 a 60 años); es decir, personas económicamente activas que se encuentran en la etapa más productiva de su vida. La manifestación clínica más común es la tuberculosis pulmonar, sin embargo se puede presentar en cualquier otro órgano del cuerpo <sup>39</sup>.

*M. tuberculosis* es el agente etiológico causante de la tuberculosis humana. Sin embargo la enfermedad también puede ser causada por otras especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. cannetii*, *M. microti* y *M. bovis*.

A pesar de que en la década de los 50's se pensó que la tuberculosis sería erradicada para el año 2000, actualmente la enfermedad a re-emergido como uno de los principales problemas de salud mundial debido a diversos factores que han impedido su control y favorecido su diseminación. Entre esos factores encontramos el incremento en la esperanza de vida, la pobreza, el hacinamiento y la desnutrición. Esta situación se agrava por el surgimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) fármaco y multi-fármaco resistentes (MR) a los agentes antifímicos, así como por la coinfección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Por estas razones, en 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el estado de emergencia global para desarrollar medidas de control y de eliminación de la tuberculosis en todo el mundo <sup>33,110,111</sup>.

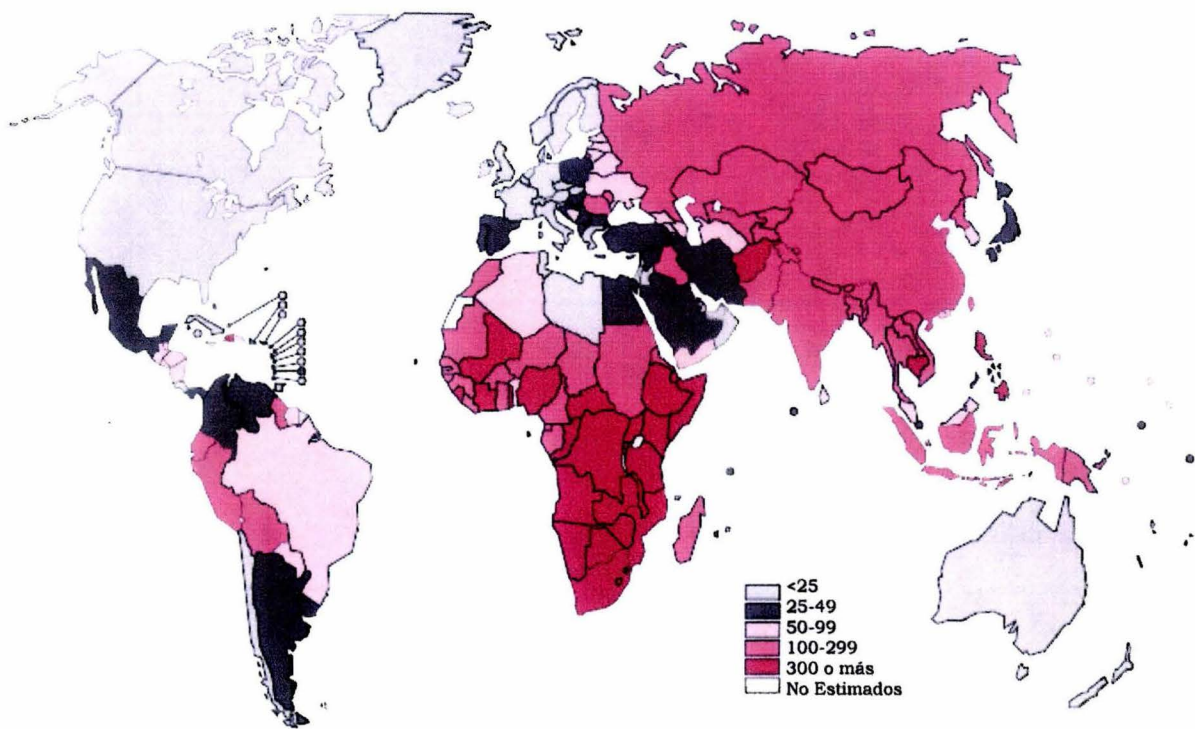
## Tuberculosis en el mundo

De acuerdo a las cifras reportadas por la OMS, se estima que un tercio de la población mundial (~1,700 millones de personas) está infectada con *M. tuberculosis*, y anualmente mueren un promedio de 3 millones de personas en el mundo, situando a este patógeno como la principal causa de muerte por un agente infeccioso (Figura 1). La OMS, estima que se presentarán 88 millones de nuevos casos de tuberculosis (TB) para el decenio 2000-2010, de los cuales 8 millones serán atribuibles a la coinfección con el HIV. Para ese mismo periodo se esperan 30 millones de muertes, de las cuales 2,9 millones serán atribuibles a la coinfección TB-HIV <sup>85, 86, 110</sup>.

Sin lugar a dudas, el grupo de mayor riesgo para padecer tuberculosis lo constituyen las personas con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), en los que se incrementa en 5 % el riesgo anual de desarrollarla, ya sea por reactivación endógena o por re-infección (infección exógena) <sup>89,91</sup>. Cada año la OMS reporta medio millón de casos de coinfección VIH/TB a nivel mundial. Sin embargo, esta tasa sólo está basada en los casos notificados a este organismo por los 211 países adscritos a él, en los cuales se usa el Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) como medida de control de la tuberculosis <sup>89, 111</sup>.

Desde 1994, el Programa Global de la Tuberculosis de la OMS, junto con la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares (UICter) llevan a cabo a nivel mundial la vigilancia de la resistencia a los fármacos antituberculosos. Esta puede ser clasificada en primaria si se presenta en pacientes sin tratamiento previo y adquirida si se presenta en sujetos que recibieron tratamiento previo. Para 1997, 35 países de los cinco continentes habían finalizado sus encuestas.

---



**Figura 1**

Distribución mundial de la Tuberculosis. En la figura se esquematiza la incidencia mundial de la tuberculosis estimada para el año 2002.



Según las notificaciones realizadas por éstos países a la OMS, los porcentajes de MR primaria variaron entre inexistentes a muy bajas (Uruguay, Chile, Cuba) hasta 4 % o mayores (República Dominicana, Argentina) <sup>32, 86,96</sup>. En el mismo grupo de países, los porcentajes de MR adquirida variaron entre 4 % y 22 % (WHO Global Tuberculosis Programme, 1997) <sup>110,111</sup>.

## Epidemiología molecular de la TB

La infección por el VIH-I es el factor más poderoso de progresión de infección tuberculosa latente a enfermedad activa <sup>27, 28</sup>, por lo que no es de extrañar que la pandemia de SIDA provocara profundos cambios en la epidemiología global de la TB. Dada la magnitud del problema, se desarrollaron técnicas moleculares para dilucidar las fuentes y mecanismos de infección vinculados a la infección con TB y la co-infección TB/VIH-I <sup>40</sup>.

Estas técnicas moleculares, llamadas genéricamente fingerprinting ("huella dactiloscópica"), han permitido documentar la transmisión activa de la TB en el seno de instituciones hospitalarias o comunidades urbanas, así como la acelerada progresión desde la primoinfección a la aparición de enfermedad clínica o la reinfección exógena de estos pacientes <sup>3,4,8,19,40,91,100</sup>.

## Marcadores genéticos en la epidemiología de la tuberculosis

El complejo *M. tuberculosis* está integrado por un grupo particularmente homogéneo de organismos, por lo que los marcadores fenotípicos como la susceptibilidad individual a bacteriófagos, si bien fueron útiles en ciertos

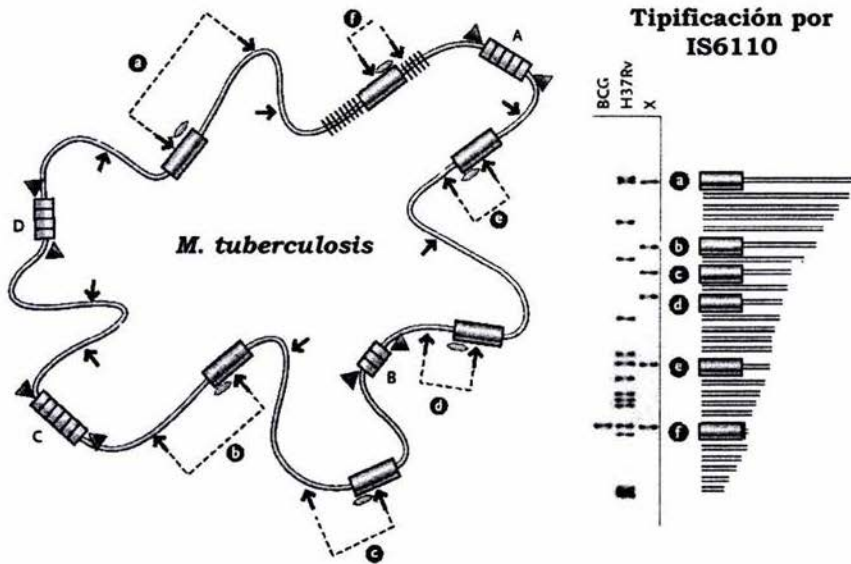
---

casos para determinar focos de infección, tienen una capacidad muy limitada de discriminación entre cepas <sup>46</sup>. El hallazgo de elementos repetitivos en el ADN cuya función en el cromosoma es aún incierta, ha contribuido sustancialmente a identificar la variación entre cepas (Figura 2) <sup>19,71,90</sup>. Entre los más conspicuos de estos elementos repetitivos se encuentran las llamadas secuencias de inserción (IS) que tienen la propiedad de multiplicarse y transponerse variando su ubicación dentro del genoma; ejemplo de ellos es la IS6110 que está presente únicamente en miembros del complejo *M. tuberculosis* (entre 2 y 20 copias) <sup>4,3</sup>. Cuanto menor es el número de copias de IS6110, menor también es la capacidad de discriminación de este marcador genético, debido a que existen sitios preferenciales para su integración en el cromosoma <sup>19,101</sup>.

Además de la IS6110, en *M. tuberculosis* se han identificado otros elementos móviles que contribuyen en mayor o menor grado a su polimorfismo genético, haciendo de ellos un blanco ideal para estudios epidemiológicos. Los fragmentos RD (direct repeat) y PGRS (polymorphic GC-rich sequence) son fragmentos cortos de ADN altamente variables. El polimorfismo generado por estas secuencias cortas es particularmente útil para la diferenciación de cepas de *M. bovis*, la mayoría de las cuales poseen una sola copia de IS6110 en la misma ubicación dentro del cromosoma <sup>45,98,99</sup>.

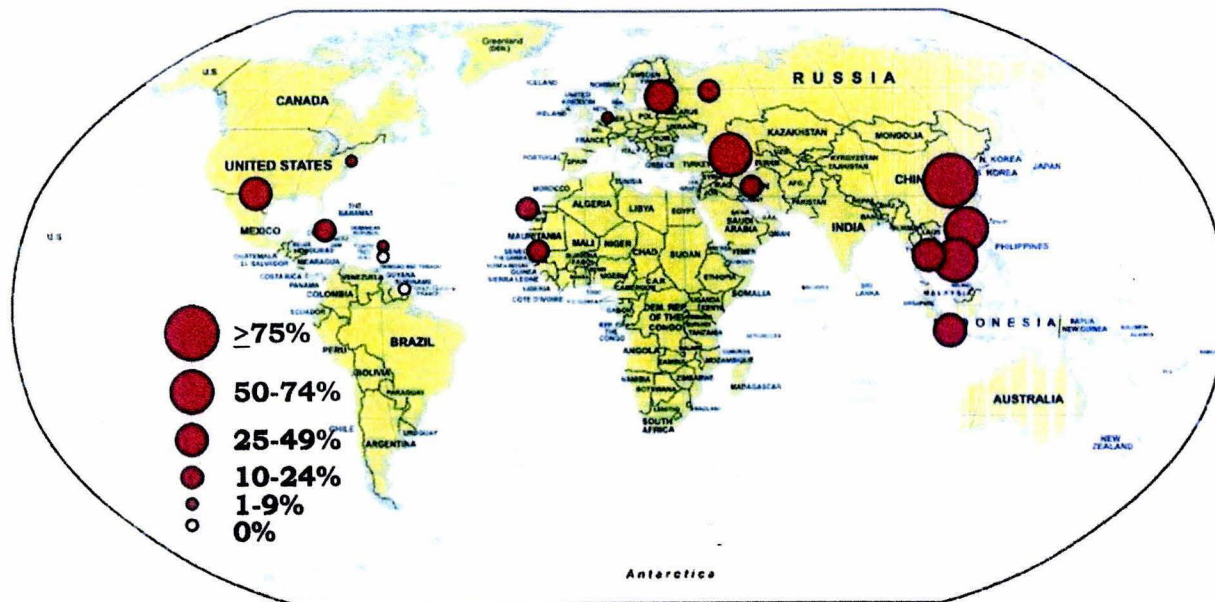
La tipificación molecular de las cepas de *M. tuberculosis* basada en los fragmentos DR (comúnmente conocida como espoligotipificación) permite una clasificación más clara de los aislamientos clínicos y la descripción de familias o clonas de cepas características de algunos países y/o regiones geográficas, identificables por su genotipo. Este es el caso del genotipo Beijing, al que corresponden más del 90% de los aislamientos en algunos países asiáticos (Figura 3). Este genotipo es considerado como de mayor virulencia al estar desplazando a otros genotipos y asociarse a brotes de

rápida diseminación en países como Estados Unidos y otras regiones del mundo. En modelos animales se ha visto que algunos de los aislamientos pertenecientes a este genotipo son hipervirulentos por disminuir la tasa de sobrevivencia, debido a la formación de grandes áreas neumónicas<sup>41,88,102</sup>. En poblaciones con baja prevalencia de TB el polimorfismo es muy alto, en cambio, en poblaciones con muy alta prevalencia se observa un menor polimorfismo en los aislamientos a consecuencia de la transmisión activa y reciente en el seno de la comunidad<sup>33,85</sup>.



**Figura 2**

Elementos utilizados para la de tipificación molecular de *M. tuberculosis*. Representación esquemática de la abundancia y posición en la que se pueden encontrar las regiones directas repetidas que flanquean a la IS6110 (F), las regiones polimórficas repetidas (A-D) conocidas como PGRS y la secuencia de inserción IS6110. La genotipificación por el elemento de inserción IS6110 se basa en la hibridación de la secuencia de inserción (a-f) después de la digestión del cromosoma (las líneas punteadas representan los sitios de corte).



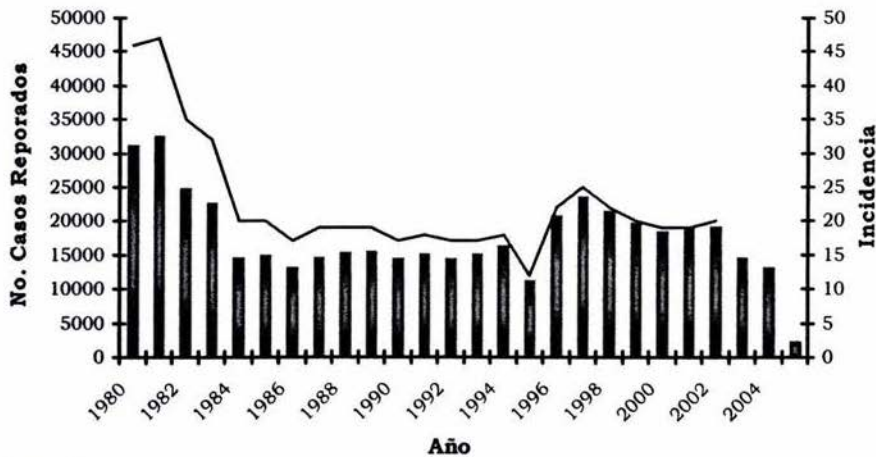
**Figura 3**

Distribución mundial de *M. tuberculosis* genotipo Beijing. El mapa muestra el porcentaje casos en el cual los aislamientos clínicos corresponden al genotipo Beijing.



## Tuberculosis en México

La tuberculosis en México es un problema serio de salud tanto de zonas rurales como urbanas. Durante los últimos 15 años el número de casos reportados es estable (Figura 4), mientras que la mortalidad presentó un descenso constante, aunque no significativo. Dadas estas cifras, la tasa de infección (entre 15 y 20 por 100,000 habitantes) por *M. tuberculosis* es semejante a la de países como España, Alemania, Francia, etc. <sup>32,103,111</sup>.



**Figura 4**

Incidencia de tuberculosis en México. En la gráfica se representa el número de casos de tuberculosis registrados en México (barras) de 1980 al año 2003 y la incidencia correspondiente (línea). OMS, Informe 2003.

Sin embargo, México fue hasta el año de 1997 uno de los trece países considerados por la OMS como de alto riesgo para la tuberculosis. En un estudio realizado en 1993 por la OPS se determinó que existe subregistro de casos nuevos, al estimarse que en México se presentaron aproximadamente 57,600 casos nuevos en ese año. En ese mismo año, la Secretaría de Salud reportó que únicamente se notificaron 15,000 casos en todo el territorio nacional. Este subregistro indica que únicamente se

diagnostica la tercera parte de los casos de tuberculosis, restando dos terceras partes de casos sin posibilidad de recibir tratamiento.

### *Mycobacterium tuberculosis*

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia Mycobacteriaceae, ubicada dentro del orden de los Actinomycetales <sup>43,104</sup>. Esta clasificación es a menudo complicada, ya que suele clasificarse al género *Mycobacterium* con otros géneros como *Corynebacterium* y *Nocardia*. La definición del género *Mycobacterium* se basa en tres criterios: ácido alcohol resistencia, estructura de los ácidos micólicos y proporción de guanina-citosina (GC%) en el ADN. <sup>24</sup>.

Clásicamente las micobacterias son descritas como bacilos que se colorean débilmente con la tinción de Gram, de forma recta o ligeramente encorvada, de 0.2 a 0.6  $\mu\text{m}$  de ancho por 1 a 10  $\mu\text{m}$  de largo, inmóviles, aerobios, no esporulados y sin cápsula (Figura 5) <sup>39,43,69</sup>.



**Figura 5**  
*Mycobacterium tuberculosis*. Fotomicrografía electrónica de barrido de *M. tuberculosis*.

*M. tuberculosis* fue la primera especie descrita en 1882 por Robert Koch y es la especie tipo del género *Mycobacterium*. Es un bacilo aeróbico intracelular obligado, de crecimiento lento (2 a 3 semanas), contiene una pared celular compleja a base de ácidos micólicos, glicolípidos y peptidoglicano que lo protegen de medio ambiente, de los compuestos microbicidas del fagosoma y es relativamente impermeable a los antibióticos, lo cual contribuye a su resistencia y al estadio de latencia dentro de granulomas. La composición lipídica de la pared de las micobacterias le confiere su ácido-alcohol-resistencia, puesta de manifiesto en la coloración de Ziehl-Neelsen que es el método de tinción usado en microscopía para el diagnóstico directo de las muestras clínicas obtenidas de los pacientes <sup>39,43,69</sup>.

Para el género *Mycobacterium* los porcentajes en GC están comprendidos entre 61 y 71 %, salvo en la especie *M. leprae* cuyo porcentaje en GC es 54-57 % <sup>24,94</sup>.

En la actualidad se han identificado más de 90 especies de micobacterias, 27 de las cuales han sido aisladas en muestras clínicas. Algunos de ellas son parásitos estrictos del hombre y de los animales: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. ulcerans*, *M. leprae*, *M. paratuberculosis*, *M. microti*. Otras especies, las más numerosas, frecuentemente denominadas como micobacterias no tuberculosas (MNT), son saprófitas o patógenos oportunistas del hombre y los animales. <sup>39,43,94,104</sup>.

La clasificación de las micobacterias se basa en la velocidad de crecimiento, importancia médica y el riesgo de infección. Las micobacterias se dividen en especies de rápido (menos de 7 días) o lento crecimiento (más de 7 días) dependiendo de su tiempo de generación que es de 2-5 h y de 13-20 h, respectivamente <sup>69,104,105</sup>. De acuerdo a su importancia médica, a las micobacterias se les ha subdividido en tres categorías:

---

- a) Las micobacterias responsables de la TB en el hombre y en los animales se clasifican dentro del llamado Complejo *M. tuberculosis*, constituido por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* y *M. microti*.
- b) Las MNT se clasifican de acuerdo al esquema propuesto por Runyon <sup>42</sup> basado en el tiempo de crecimiento y la cromogenicidad. Esta primera clasificación excluye a las especies del complejo *M. tuberculosis* y las no cultivables.
- c) Según el riesgo de infección: La Sociedad Europea de Micobacteriología (European Society for Mycobacteriology, ESM) clasifica a las micobacterias en tres grupos de riesgo (Tabla 1):

Grupo I: El riesgo de infección para el individuo y la población es bajo, o raramente son responsables de enfermedad en el adulto (patógenos raros).

Grupo II: Riesgo moderado para el individuo (patógenos potenciales u oportunistas).

Grupo III: Riesgo de transmisión por vía aérea; la enfermedad después de la infección puede ser severa y causar la muerte. Es de riesgo elevado para el individuo pero moderado para la población (patógenos estrictos).



**Tabla 1**

Clasificación de especies de micobacterias según el riesgo de infección (ESM, 1991)

<b>Grupo I</b>		<b>Grupo II</b>	<b>Grupo III</b>
<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. phlei</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. bovis</i>
<i>M. fallax</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. africanum</i>
<i>M. thermoresistibile</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. gilvum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. leprae</i>
<i>M. gastri</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. malmoense</i>	
<i>M. triviale</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. marinum</i>	
<i>M. sphagni</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. paratuberculosis</i>	
<i>M. gordonae</i>	<i>M. vaccae</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	
<i>M. flavescens</i>	<i>M. agri</i>	<i>M. szulgai</i>	
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. aichiense</i>	<i>M. xenopi</i>	
<i>M. senegalense</i>	<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. asiaticum</i>	
<i>M. terrae</i>	<i>M. chubuense</i>	<i>M. haemophilum</i>	
<i>M. porcinum</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. shimodei</i>	
<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. rhodosiae</i>	<i>M. simiae</i>	
<i>M. pulveris</i>	<i>M. moriokaense</i>		
<i>M. tokaiense</i>	<i>M. poriferae</i>		
<i>M. nonchromogenicum</i>			

## Patogénesis de la Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad transmitida de persona a persona por una repetida exposición al bacilo *M. tuberculosis* por vía aérea a través de gotas microscópicas de saliva (menores de 5  $\mu\text{m}$ ), expulsadas al toser por un individuo enfermo de tuberculosis pulmonar activa comúnmente denominado bacilífero. La transmisión por objetos contaminados (fomites) es muy rara.

Se estima que únicamente el 10 % de las personas infectadas con *M. tuberculosis* desarrolla la enfermedad en alguna etapa de su vida debido a la capacidad del huésped de controlar la infección. Eventualmente la infección puede reactivarse al presentarse trastornos y/o enfermedades (ej, diabetes mellitus, insuficiencia renal, depresión, desnutrición, infección por el VIH/I, etc.) que debilitan el sistema inmunológico e incrementan el riesgo de desarrollar la enfermedad. Cuando un paciente VIH/I positivo con depresión moderada o severa de la inmunidad celular se coinfecta con *M. tuberculosis* o se reactiva una infección previa, evoluciona rápidamente a enfermedad tuberculosa. Si además los bacilos infectantes son MR, la muerte ocurre en poco tiempo. Esta infección se puede diseminar a otros pacientes inmunodeprimidos y también a contactos inmunocompetentes (personal de salud y visitantes). En estos últimos, si bien la infección puede mantenerse como tal sin desencadenar enfermedad durante años, cuando ésta aparezca será un nuevo caso de TB-MR <sup>39,43</sup>.

Cuando las microgotas alcanzan los alvéolos pulmonares, los bacilos son fagocitados por los macrófagos residentes ( $\text{M}\phi$ ) (macrófagos alveolares) que tratan de eliminarlos mediante mecanismos microbicidas, tales como la producción de óxido nítrico <sup>7</sup> [resultado de la estimulación de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS2)], intermediarios reactivos de oxígeno

(ROI) y nitrógeno (RNI), disminución del pH y activación de hidrolasas al fusionarse el endosoma que contiene el bacilo con las vesículas lisosomales. Cuando *M. tuberculosis* es fagocitado, puede evadir su degradación por las hidrolasas ácidas del lisosoma impidiendo esta fusión y la acidificación del endosoma. Al mismo tiempo las células dendríticas fagocitan bacilos y migran a los nódulos linfáticos regionales, en los cuales promueven la expansión clonal de linfocitos antígeno específicos que son reclutados al sitio de la infección por las quimiocinas secretadas durante la inflamación. Estas células son las responsables de la activación de los macrófagos y sus mecanismos microbicidas <sup>26,38</sup>.

La evasión de los mecanismos microbicidas del Mø marca el inicio de la infección que continúa con la duplicación de los bacilos dentro del macrófago y su posterior diseminación a otros espacios. La respuesta inflamatoria local lleva a la formación de una lesión conocida como granuloma, constituido por macrófagos que tienen el aspecto de células epiteliales por lo que se les denomina epiteloideas; éste puede rodearse por fibroblastos y formar el centro caseoso. La posterior licuefacción del centro caseoso extiende la infección a los bronquios adyacentes entre los que hay necrosis y formación de cavidades en las que los bacilos se diseminan incluidos en el esputo a otras partes del pulmón y hacia el exterior <sup>36,38,77</sup>.

La tuberculosis se puede desarrollar en gran número de órganos aunque la forma más común es la pulmonar; ocasionalmente los bacilos pueden diseminarse indirectamente por el canal linfático a los nódulos linfáticos regionales y luego por el torrente circulatorio hacia cualquier parte del cuerpo o directamente por erosión del tubérculo adyacente a un vaso pulmonar, desarrollándose a corto plazo la infección tuberculosa progresiva que puede establecerse en huesos, aparato genito-urinario, ganglios, meninges, etc.

---

---

La infección primaria que generalmente cursa de forma asintomática está caracterizada por la formación del granuloma, en el cual, los bacilos se encuentran en latencia con ciclos replicativos limitados o infrecuentes. Al alterarse el equilibrio inmunológico de esta estructura se puede producir la reactivación de la infección que conduce al desarrollo del proceso inflamatorio, posteriormente de neumonía y la aparición de los signos y síntomas característicos de la tuberculosis <sup>38,39</sup>.

El control de la infección primaria es dependiente del desarrollo de la respuesta celular tipo Th1. En el transcurso de la infección los macrófagos presentan los antígenos a los linfocitos CD4<sup>+</sup> por medio del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) lo que induce que liberen diferentes citocinas, como el IFN- $\gamma$ , la IL-2 y el TNF- $\alpha$  que activa a los macrófagos para destruir gradualmente a *M. tuberculosis*. Tanto los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y la secreción de IFN- $\gamma$  es estimulada por la IL-12 producida en los macrófagos. Las células T CD8<sup>+</sup>, además de la producción de citocinas, se encargan de lisar a los macrófagos no activados que están infectados por *M. tuberculosis*, mediante la liberación de sus moléculas efectoras (granulisina y perforina). La liberación de estas moléculas es dependiente de la presentación de los antígenos micobacterianos en las moléculas MHC-I <sup>26,36,55,56,75</sup>.

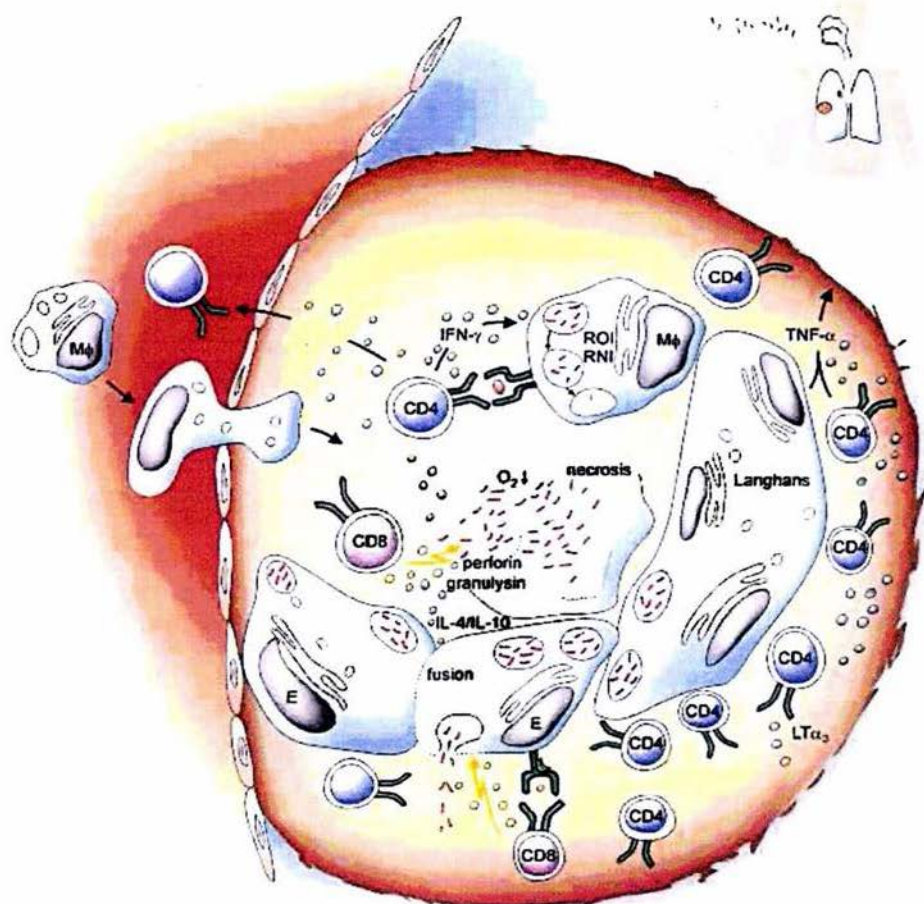


## El granuloma.

La formación del granuloma alrededor de macrófagos infectados constituye la huella típica de la enfermedad, ya que éstos, en las radiografías, tienen el aspecto de tubérculos. Los granulomas son estructuras bien definidas que se caracterizan por la organización definida de las estirpes celulares que los constituyen. El granuloma está formado por láminas de matriz extracelular que encierran un microambiente de células infectadas (M $\phi$ ) y un intenso infiltrado inflamatorio; su función es evitar la diseminación y promover la eliminación de los bacilos <sup>26,38</sup>. Al centro se localizan las células epiteloideas que se rodean de M $\phi$  que son gradualmente activados desde la periferia por los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, siendo predominantes los linfocitos CD4<sup>+</sup> en la fase aguda de la enfermedad y los linfocitos CD8<sup>+</sup> en la fase crónica. También se ha documentado la presencia de células B, aunque hasta la fecha no hay un acuerdo sobre su posible función protectora (Figura 6) <sup>55,56,77</sup>.

Cuando la infección no es controlada, el perfil de citocinas secretadas por los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> cambia la respuesta a Th2, caracterizada por la producción de IL-4 e IL-10 producidas también por los macrófagos. Esto trae como consecuencia la disminución en la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$  que inhibe directamente la respuesta de células T así como de las células presentadoras de antígenos infectadas. Esta respuesta mixta o Th0 favorece la progresión de la infección a enfermedad <sup>26,36,38,52,56</sup>.

---


**Figura 6.**

Respuesta inmune y formación de granulomas. La formación del granuloma en el sitio de la infección se lleva a cabo por la compleja interacción entre los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con los macrófagos alveolares (Mφ), las células epiteloides (E), las células gigantes de Langhans resultantes de la fusión de las células epiteloides y, que contienen a las micobacterias en el centro del granuloma. La activación de los linfocitos por los macrófagos y las células presentadoras de antígeno en el sitio de la infección tiene como resultado la producción de citocinas, quimiocinas y la lisis de las células infectadas. La producción de IFN-γ activa a los macrófagos y las células presentadoras de antígeno que eliminan a los bacilos intracelulares o por medio de la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno (ROI y RNI respectivamente). Los linfocitos CD4<sup>+</sup> adicionalmente producen TNF-α y linfotoxina α 3 (LT α3) que es necesaria para formación de la pared que delimita al granuloma. En el centro de granuloma los linfocitos CD8<sup>+</sup> eliminan a las micobacterias por medio de la secreción de perforina y granulicina.

## Vacuna BCG (bacilo Calmette-Guèrin)

La vacuna BCG es un liofilizado de bacterias vivas derivada de una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*. La BCG es la única vacuna existente en el mundo para la prevención de la tuberculosis, la cual se administra a los humanos durante el primer año de vida. En México se indica una sola dosis, al nacimiento por vía intradérmica. Desde que fue desarrollada por Calmette y Guèrin entre 1908 y 1921, la vacuna se ha aplicado a más de un billón de personas, es inocua y su administración evita las formas más graves de tuberculosis (meningea y miliar)<sup>72</sup>. Actualmente, esta vacuna se encuentra inmersa en una gran controversia en torno a su eficacia en la prevención de la tuberculosis, ya que estudios clínicos controlados realizados en diversas áreas geográficas y en distintas poblaciones mostraron que su eficacia protectora varía de 0 % a 80 % (Figura 7)<sup>18,22,23</sup>. Entre las hipótesis más aceptadas para explicar la variación en la eficacia protectora de la vacuna se encuentran: i) La susceptibilidad genética del hospedero, ii) Surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* con mayor virulencia, iii) Pérdida progresiva de la inmunogenicidad de la vacuna BCG, iv) Prevalencia de infección por *M. tuberculosis* en la región estudiada, v) Exposición a micobacterias no tuberculosas (MNT) y, vi) Utilización de vacunas BCG distintas que inducen inmunidad en diferentes grados sin embargo, ninguna de estas hipótesis ha sido confirmada experimentalmente<sup>11,12,13,16</sup>.

La administración de un refuerzo de BCG ha sido poco estudiada; en Brasil se lleva a cabo en población abierta y sus resultados no son superiores a los de los países que utilizan dosis única de BCG. En Hungría, después de introducir la revacunación con BCG, se observó una disminución significativa en la incidencia de tuberculosis pulmonar. Cabe mencionar que las vacunas BCG usadas no fueron las mismas. Dada la inconsistencia observada en los países donde se aplica un refuerzo de

---



BCG, la OMS y el Programa Mundial del Control de la Tuberculosis, aun no han aceptado esta medida al no existir la evidencia que sustente los beneficios de implementar una segunda dosis de BCG en los esquemas de vacunación <sup>12,18,34</sup>.

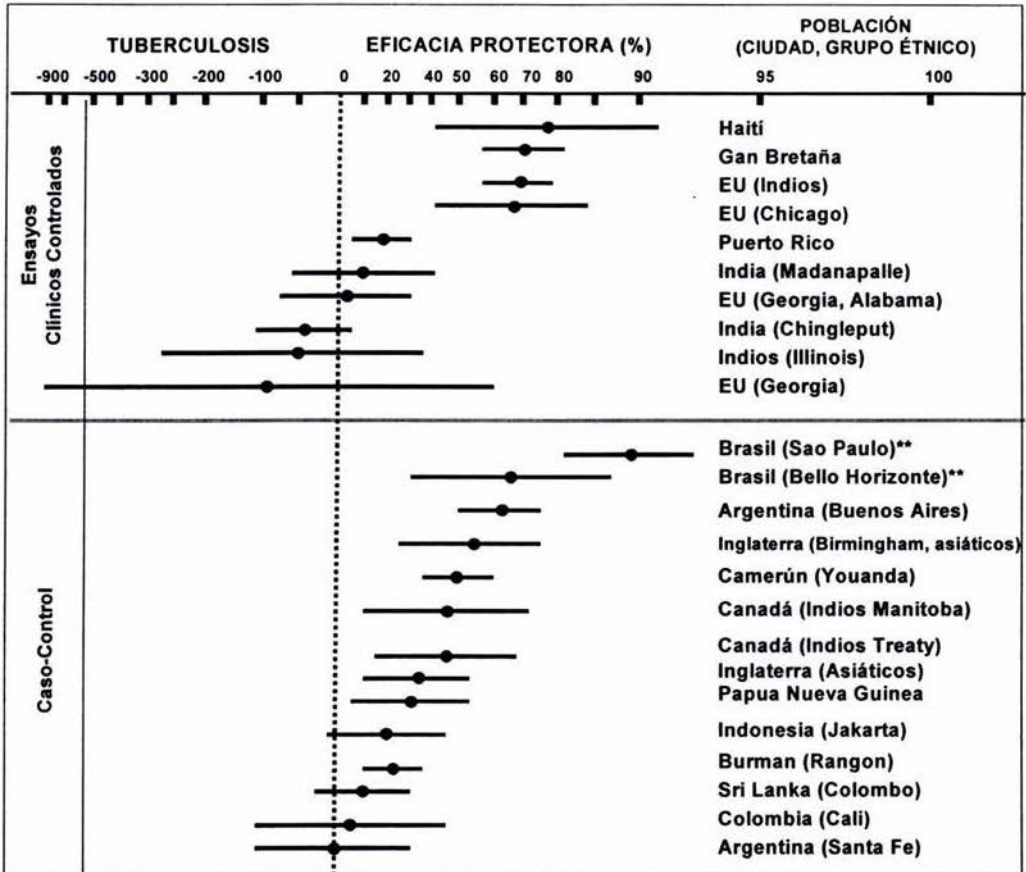
Actualmente la vacuna BCG se aplica en los países subdesarrollados a los infantes durante el primer año de vida mientras que en los países desarrollados solo se usa cuando se presenta una conversión a la prueba del PPD.

Albert Calmette y Camille Guèrin desarrollaron la vacuna BCG entre 1908 y 1921 mediante cultivos sucesivos *in vitro* (230 cultivos) de una cepa de *M. bovis* aislada de un caso de mastitis bovina. Durante la primera mitad del Siglo XX la vacuna BCG se distribuyó a diferentes países para su utilización y producción en los laboratorios locales, en los cuales se utilizaron diferentes métodos para su preparación y conservación. Durante este tiempo y debido a la carencia de métodos de preservación de microorganismos, estas cepas se conservaron por subcultivo. Debido a esto, la vacuna BCG presentó cambios genotípicos y fenotípicos que llevaron al desarrollo de variantes de la BCG original, a las que se les conoce como subcepas de BCG. Hasta la invención del proceso de liofilización y la preservación de la vacuna BCG en el Instituto Pasteur en 1961, esta cepa se había subcultivado más de 1,000 veces al igual que las subcepas BCG desarrolladas en el mundo <sup>11,72,76</sup>.

El meta-análisis (Figura 7) de los estudios de protección disponible en la literatura concluyó que la vacuna BCG reduce de forma significativa el riesgo de desarrollar TB (50% en promedio), sin embargo, los criterios aplicados en la interpretación de las variables de confusión, hacen difícil de interpretar el efecto protector de las vacunas utilizadas <sup>18</sup>. Las diferencias fenotípicas, genéticas y las observadas en los ensayos clínicos,



motivaron en 1956 la realización de la Conferencia Técnica Internacional sobre BCG (International BCG Technical Conference) cuyo objetivo fue el de establecer los criterios y metodologías estándares de producción de la vacuna, adoptándose el sistema de preservación de lotes semilla (seed-lot system) 76,79.



**Figura 7.**

Meta-análisis de la eficacia protectora de la vacuna BCG. En la figura se observa la variación encontrada en la eficacia protectora de la vacuna BCG en los diferentes estudios evaluados, que va de 0 % a 90 %.

## Subcepas BCG

Al considerar que durante el desarrollo de la vacuna BCG, los subcultivos disminuían progresivamente la virulencia del aislamiento de *M. bovis*, no es de extrañar que la preservación de la vacuna original durante la primera mitad del Siglo XX condujera a la diversificación de la vacuna en subcepas y, en algunos casos, a la sobre atenuación de algunas de las variantes.

Después de la adopción del sistema de lotes semilla, el mercado internacional cuenta con al menos 13 vacunas BCG conocidas comúnmente como subcepas de BCG, sin embargo, más del 90 % de las dosis aplicadas corresponden a solo 3 de ellas (BCG Glaxo 1077, BCG Tokio 172 y Pasteur 1173P2) que están emparentadas con la BCG original <sup>11</sup>.

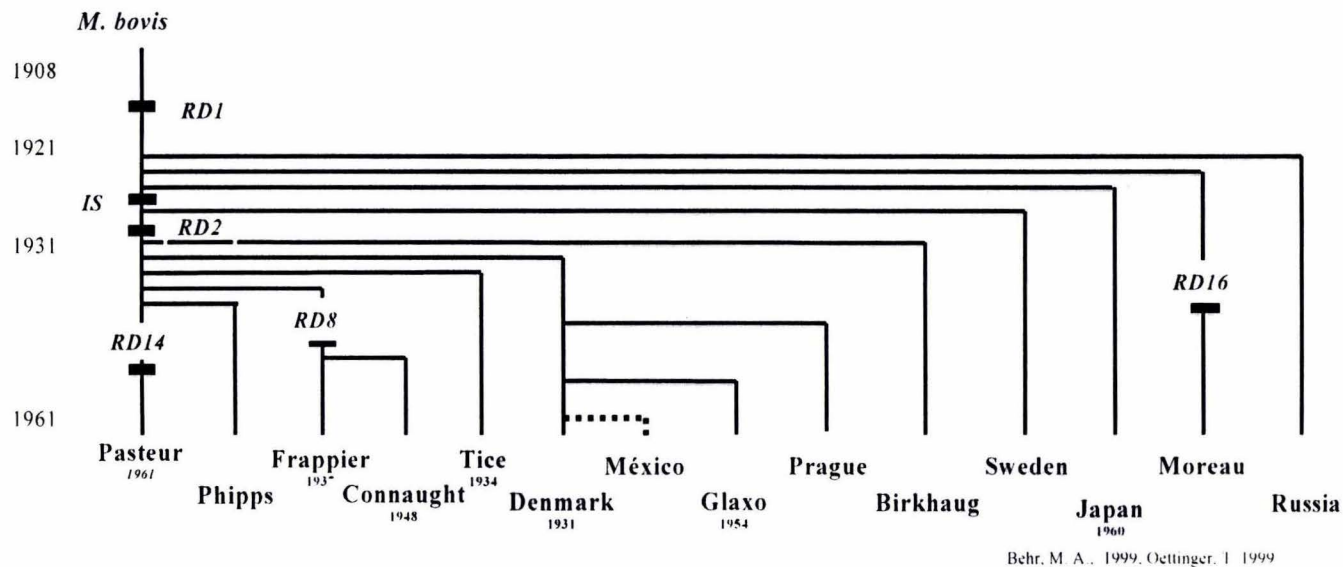
Estas subcepas varían entre sí en características como su composición y estructura de antígenos <sup>1,76</sup>, perfil de proteínas secretadas al medio de cultivo <sup>62,66</sup>, número de copias IS6110 <sup>72</sup>, patrón de ácidos micólicos <sup>9</sup> y cantidad de exoquelinas <sup>42</sup>.

En 1995, la evaluación en un modelo murino de 5 subcepas BCG, puso de manifiesto que cada una de la subcepas utilizadas induce diferente grado de protección al infectar los ratones con la BCG Pasteur por vía pulmonar; sin embargo, los hallazgos están sujetos a interpretación dada por los criterios utilizados en este modelo animal <sup>61</sup>.

En 1999, la utilización de microarreglos permitió elucidar algunos de los eventos moleculares ocurridos durante la diversificación de la vacuna BCG (Figura 8). En este estudio, se utilizó como base la secuencia del genoma

de *M. tuberculosis* H37Rv y los registros históricos de la producción de las vacuna BCG en el mundo para reconstruir la genealogía de las subcepas BCG existentes en la actualidad. En esta genealogía se distinguen 2 grupos de subcepas caracterizadas por la presencia o ausencia de la región RD2 <sup>10,11,72</sup>. Adicionalmente, se identificaron tres deleciones ocurridas durante la diversificación de las subcepas Pasteur (RD14), Moreau (RD16) y el ancestro de las subcepas Connaught y Frappier (RD8) desarrolladas en Canadá <sup>10</sup>.

---



**Figura 8.**

Reconstrucción de la genealogía de las diferentes subcepas de BCG por microarreglos. En el esquema se puede observar la pérdida de la región RD1, ocurrida durante la atenuación de la cepa Pasteur entre 1908 y 1921, la pérdida de una copia de la secuencia de inserción IS6110 y la ocurrencia de 4 deleciones más (RD2, RD8, RD14, RD16) durante la diversificación de la vacuna BCG.

Behr, M. A., 1999, Oettinger, I 1999

## Desarrollo de nuevas vacunas

Durante los últimos 20 años se han redoblado los esfuerzos por desarrollar una nueva vacuna contra la tuberculosis que sea más eficiente en el control de la primoinfección y muestre mayor consistencia en la protección. Las alternativas evaluadas incluyen el uso de proteínas de secreción de forma individual o combinada, la vacunación con ADN, la atenuación de otras cepas de micobacterias más cercanas filogenéticamente a *M. tuberculosis*, vacunas auxotróficas y el desarrollo de vacunas recombinantes de BCG que sobreexpresen antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis* (Figura 9) <sup>20,25,57,58,67,73,83</sup>.

Los resultados obtenidos de la evaluación de más de 180 vacunas pertenecientes a las categorías arriba mencionadas mostró que, con excepción de algunas vacunas recombinantes de BCG, en el mejor de los escenarios la protección conferida por estas nuevas vacunas apenas fue comparable a la inducida por la vacuna BCG <sup>67</sup>. Estos hallazgos colocaron en perspectiva la necesidad de evaluar las subcepas de BCG disponibles en la actualidad, con la finalidad de seleccionar las mejores para recombinar con antígenos inmunodominantes que incrementen su eficacia protectora <sup>65,73,114</sup>.

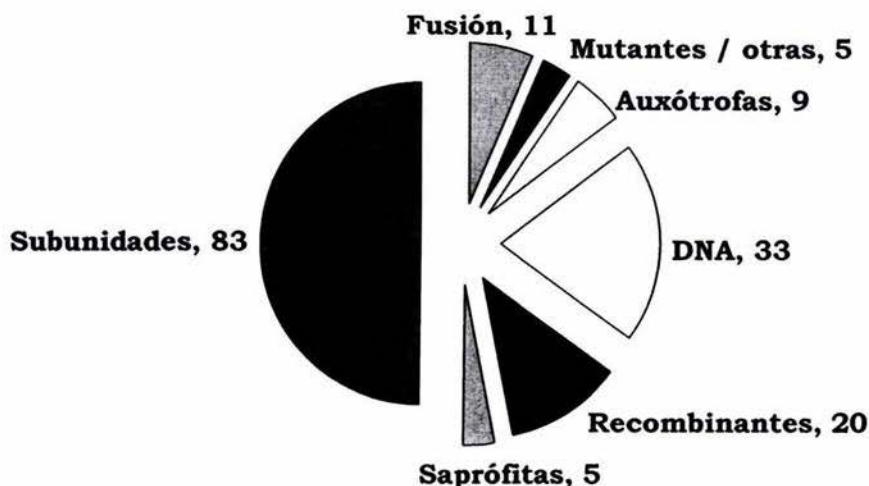
Las vacunas recombinantes basadas en BCG mostraron inducir una respuesta inmune Th1 superior a la desarrollada por la BCG, con la reducción en las UFC en bazo, hígado y pulmón después del reto con *M. tuberculosis* H37Rv <sup>53,54</sup>.

El uso de BCG como vector para la presentación de antígenos homólogos o heterólogos es una herramienta muy útil para dirigir la respuesta inmune al fenotipo Th1, ya sea por recombinación homóloga o con el uso de

---



plásmidos clonados con antígenos inmunodominantes previamente identificados en animales y muestras clínicas.



**Figura 9.** Evaluación de nuevas vacunas contra la tuberculosis. En la gráfica se observa el número de vacunas desarrolladas y probadas en el modelo murino de tuberculosis pulmonar, aprobado por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos.

### Antígenos inmunodominantes en el desarrollo de nuevas vacunas

En los últimos 20 años se han caracterizado un sinnúmero de antígenos de *M. tuberculosis* con capacidades inmunogénicas y el potencial para su uso en el desarrollo de vacunas, particularmente encontrados en la fracción de proteínas secretadas al medio de cultivo<sup>21,37</sup>. Las proteínas de secreción obtenidas de filtrados de cultivos de *M. tuberculosis* fueron los antígenos más ampliamente estudiados en la última década<sup>6,14,51,70</sup>. Entre las proteínas más inmunogénicas encontramos de forma abundante al



complejo de 30-32 kDa, seguido de proteínas como ESAT-6 <sup>6</sup>. Las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* pueden ser divididas en: a) las activamente secretadas por los bacilos durante los primeros días de cultivo; b) las proteínas asociadas a la pared que se desprenden gradualmente y, finalmente, c) las proteínas de los estadios tardíos de crecimiento liberadas por la lisis bacteriana.

Entre los antígenos más utilizados por su potencial para el desarrollo de la nueva vacuna se encuentran las proteínas ESAT-6 y 38-kDa, ambas secretadas al medio de cultivo y reconocidas por inducir respuesta inmune Th1 en diversos modelos animales, así como por la proliferación y producción de IFN- $\gamma$  en células de pacientes con tuberculosis y sus contactos sanos <sup>6,14,50,64,106,113</sup>.

### Proteína de 38-kDa

La proteína de 38-kDa (originalmente llamada Ag5 en la clasificación de Daniels) es uno de los antígenos más abundantes en *M. tuberculosis* <sup>50</sup>. Esta proteína fue caracterizada estructuralmente en su forma nativa y es una de las primeras lipoproteínas glicosiladas descritas en *M. tuberculosis* <sup>36,49</sup>.

La proteína de 38-kDa es de los antígenos micobacterianos más inmunogénicos. Induce proliferación de células T y produce respuesta de hipersensibilidad de tipo tardío. Dadas sus características antigénicas, esta proteína fue estudiada en diversos modelos animales como uno de los primeros candidatos a vacuna contra la tuberculosis y, en base a su especificidad, como prueba diagnóstica (sensibilidad del 72.6 % y especificidad del 94.9 %), aunque con reactividad cruzada con MNT en las que encontramos proteínas homólogas <sup>7,50,82,97,112</sup>. Como vacuna de

---

subunidad induce una repuesta celular protectora caracterizada por la producción de IFN- $\gamma$  y proliferación celular antígeno específica <sup>2,7,64,82</sup>.

La proteína de 38-kDa se produce abundantemente en los cultivos de *M. tuberculosis* H37Rv y contiene epitopos inmunodominantes reconocidos por linfocitos T y B en pacientes con tuberculosis y convivientes sanos<sup>5</sup>, siendo el péptido 38G (350-369) el que tiene la mayor capacidad proliferativa e induce la producción de IFN- $\gamma$ , asociándose con haplotipos H-2 en ratones sensibilizados con *M. tuberculosis*, en tanto que los sujetos con tuberculosis pulmonar activa presentan anergia selectiva hacia este péptido, generalmente asociada al HLA-DR3 <sup>64,106, 107, 2,64,82</sup>. En sujetos sanos sin historia previa de vacunación o infección se detectó respuesta inmune contra este antígeno debido a las proteínas homólogas encontradas en casi todo el género *Mycobacterium*. En la vacuna BCG ya fué descrita la presencia de un par de proteínas funcionales (PstS2 y PstS3) con homología a PstS1, que al igual que esta se expresan en menor cantidad al compararse con la producida en *M. tuberculosis* <sup>15,95</sup>.

## ESAT-6

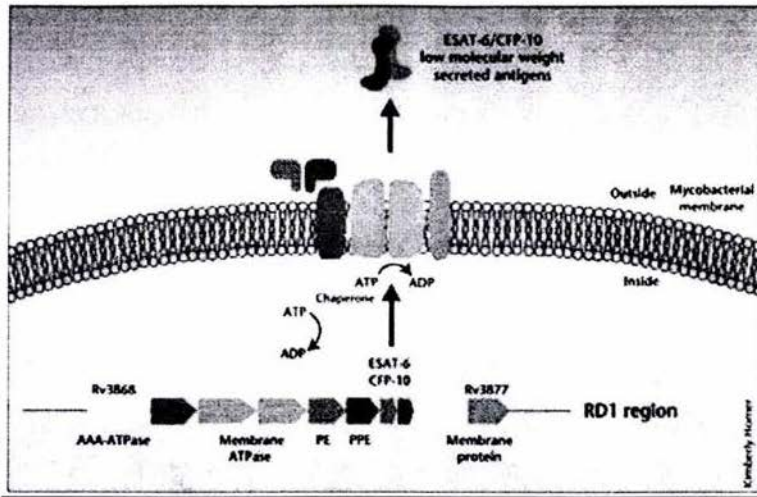
La proteína ESAT-6 (por sus siglas en inglés “Early Secretory Antigenic Target” y su aparente peso molecular de 6-kDa) es secretada tempranamente al medio de cultivo y se caracteriza por inducir respuesta inmune Th1 acompañada de una pronunciada producción de IFN- $\gamma$  que supera la respuesta encontrada a otros antígenos inmunodominantes previamente descritos <sup>6,51,80,93</sup>. ESAT-6 está constituida por 95 aminoácidos que se codifican en un marco de lectura abierto (ORF) de 285 pb. Esta proteína se co-transcribe junto con la proteína de bajo peso *lhp* (CFP-10) que, a diferencia de ESAT-6, es reconocida principalmente por antisueros de pacientes leproso y lepromatosos. ESAT-6 carece de una

secuencia líder para su exportación y, puede ser encontrada en forma trimérica, sin función conocida. Ambas proteínas se detectan en concentraciones equiparables y solo se encuentran en cepas del complejo *M. tuberculosis* y en muy pocas cepas ambientales como son *M. szulgai*, *M. marinum* y *M. flavescens*; se postula que estas pueden ser un factor de virulencia <sup>48,49</sup>. Gracias al análisis comparativo de genes y la identificación de homologías, se sabe que las proteínas ESAT-6 y CFP-10 son secretadas al medio de cultivo por un sistema de secreción dependiente de ATP (Figura 10) que está conformado por las proteínas transmembranales codificadas en la región RD1. Actualmente se sabe que ESAT-6 pertenece a una familia de 23 proteínas de bajo peso molecular presuntamente reguladas durante la infección <sup>47,74</sup>. En diversos estudios con mutantes nulas de *esat-6*, se observa una reducción en la virulencia de las cepas <sup>108</sup>.

Por su especificidad e inmunogenicidad, se le ha evaluado en diversos modelos animales como un candidato importante para el desarrollo de la vacuna contra la tuberculosis. En estos modelos la inmunización con ESAT-6 se realizó en forma de subunidades, vacuna de ADN, como proteína fusionada al antígeno de 30-kDa o en combinación de algunas de ellas, obteniéndose de forma general el desarrollo de una respuesta Th1 que protegió de forma significativa ante un reto con *M. tuberculosis*. Sin embargo, la protección conferida con estas vacunas no superó la inducida por la vacunación con BCG <sup>17,48,109,113</sup>.

Dado que ESAT-6 sólo se encontró en especies de micobacterias patógenas, en los últimos años se exploró su potencial como un reactivo diagnóstico de la tuberculosis <sup>35,81</sup>.

---



**Figura 10.**

Mecanismo propuesto para la secreción de ESAT-6. Los genes codificados en la región RD1 conforman un sistema de secreción que forma un canal transmembranal por el cuál se secretan las proteínas ESAT-6 y CFP-10 como un heterodímero.



## Justificación

La re-emergencia global de la tuberculosis se ha traducido en la evidente necesidad de evaluar la eficacia protectora de las subcepas BCG contemporáneas y de desarrollar nuevas vacunas más eficientes. La experiencia de un sinnúmero de investigaciones ha mostrado que la mejor alternativa es la transformación de BCG para la expresión de antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis* que favorecen la respuesta celular Th1 y podrían mejorar la eficacia protectora de la vacuna actual.

---



## Objetivo

- Evaluar la eficacia protectora de 10 subcepas de *M. bovis* BCG en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.
- Construir vacunas recombinantes de BCG con las proteínas ESAT-6 y 38-kDa para inducir mayor eficacia protectora contra la infección con *M. tuberculosis*.

## Objetivos particulares

- Evaluar la eficacia protectora de 10 subcepas BCG contra la infección con *M. tuberculosis* H37Rv.
  - Seleccionar las subcepas de BCG que muestren los valores de protección mayor y menor.
  - Clonar los genes que codifican para las proteínas ESAT-6 y 38-kDa en plásmidos de expresión para micobacterias.
  - Transformar las subcepas de BCG seleccionadas con plásmidos clonados.
  - Determinar la expresión o sobre-expresión de ESAT-6 y 38kDa en las subcepas transformadas.
  - Evaluar la eficacia protectora de las vacunas BCG recombinantes en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.
  - Caracterizar la respuesta inmune inducida durante la infección con *M. tuberculosis* H37Rv ó *M. tuberculosis* Beijing en ratones inmunizados con las subcepas recombinantes.
-

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Bacterias

Las subcepas de *M. bovis* BCG Phipps, Birkhaugh, Sweden, Connaught, Moreau, Frappier y Tice fueron donadas por los doctores M. A. Behr (Montreal General Hospital, Division of Infectious Diseases and Medical Microbiology-, McGill University, Montreal, Canadá); la subcepa Pasteur por el Dr. Raúl Mancilla (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM); la subcepa Danish por el Dr. Mahavir Singh (Lionex diagnostics and Therapeutics, GmbH, Braunschwig, Germany) y la subcepa México por el laboratorio de vacunas de la Secretaria de Salud. Las características de estas subcepas se presentan en la Tabla 2.

Para la infección de los animales se utilizaron las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y el aislamiento *M. tuberculosis* 9501000, perteneciente al genotipo Beijing.

Las bacterias se cultivaron hasta la fase media logarítmica en caldo de cultivo Middelbrook 7H9 (Difco, Detroit, Mich.) suplementado con albumina-dextrosa-catalasa [ADC (BBL, Cockeysville, Md.)] y 0.05 % de Tween-80 (Sigma, St. Louis, USA).

Los cultivos se mantuvieron en agitación constante a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Una vez que se alcanzó la fase logarítmica las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 5000 x g. Para eliminar los componentes del medio de cultivo el botón celular se lavó tres veces con solución salina

amortiguadora de fosfatos (PBS) y se distribuyó en alícuotas de 1 ml a una concentración de  $10^7$  bacteria/ml. Los paquetes bacterianos fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**Tabla 2.**  
**Subcepas BCG**

No. ATCC	Cepa (Sinónimo)	ORF's Perdidos	No. copias IS6110	MPB64	MPB70	Ácidos $\alpha$ -metoxy-micolados	Exoquelinas $\mu\text{g/ml}$
35734	Pasteur	DR1, DR2, DR14 (28)	1	P	+	A	345
35744	Phipps (Philadelphia)	DR1, DR2 (20)	1	P	+	A	SD
35735	Frappier (Montreal)	DR1, DR2, DR8 (24)	1	P	+	A	SD
35745	Connaught (Toronto)	DR1, DR2, DR8 (24)	1	P	+	A	SD
35743	Tice (Chicago)	DR1, DR2 (20)	1	P	+	A	390
35733	Denmark (Danish 1331)	DR1, DR2 (20)	1	P	+	A	140
35731	Birkhaug	DR1, DR2 (20)	1	P	+	A	SD
35732	Sweden (Ghotenburg)	DR1 (9)	1	A	+++	P	SD
35736	Moreau (Brazil)	DR1, DR 16 (15)	2	A	+++	P	SD
35738	México	DR1, DR2 (20)	1	P	?	A	SD

ORF: Marco de lectura abierto; P: presente; A: ausente; SD: sin determinar.

### Preparación de Inóculos

Para los ensayos de infección y vacunación las bacterias se descongelaron rápidamente a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para obtener una suspensión homogénea de bacilos independientes, las bacterias se transfirieron a tubos falcon estériles que contenían perlas de vidrio y solución de PBS-Tween 80 al 0.1 %. Se agitaron en vortex hasta obtener bacilos independientes en suspensión

que posteriormente se ajustaron a la concentración de  $10^6$  UFC/ml. La viabilidad y la cuenta de los bacilos se realizaron por microscopía de epifluorescencia. Los bacilos se tiñeron con Diacetato de fluoresceína (DAF) [5  $\mu$ g/ml] y fueron contados en cámara de Neubauer. Adicionalmente, la cuenta de bacilos se confirmó por plaqueo en medio Middelbrook 7H10 (Difco, Detroit, Mich.) suplementado con ácido oléico-albumina-dextrosa-catalasa [OADC (BBL, Cockeysville, Md.)]. Las bacterias se sembraron en diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1,000 y 1:10,000.

### Animales de estudio

Se utilizaron ratones machos BALB/c de 6-8 semanas de edad, obtenidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y la Nutrición "Salvador Zubirán". Los ratones durante todo el experimento se mantuvieron en cajas de aislamiento dentro del bioterio con nivel de bio-seguridad 3. El manejo de animales en esta investigación fue aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y la Nutrición "Salvador Zubirán".

### Construcción de *M. bovis* BCG recombinantes

#### Preparación de células electrocompetentes

Las subcepas de *M. bovis* BCG Phipps y Tice se seleccionaron como vehículos para la expresión de la proteínas ESAT-6 y 38-kDa de *M. tuberculosis*, respectivamente. Las bacterias se cultivaron por 8 días en medio de cultivo Middelbrook 7H9 (Difco, Detroit, Mich.) suplementado con ADC (BBL, Cockeysville, Md.) y 0.05 % de Tween-80 (Sigma, St. Louis, USA). Los cultivos se mantuvieron en agitación constante a 37°C. Las



bacterias se cosecharon por centrifugación a 5000 x g. El precipitado se resuspendió inicialmente en un volumen igual al original con solución estéril de agua con glicerol (Sigma, USA) al 10 %, posteriormente se redujo el volumen original a la mitad del anterior hasta concentrar las bacterias 50 veces. La suspensión resultante se dividió en alícuotas de 200 µl que fueron congeladas en N<sub>2</sub> y almacenadas a -70°C hasta su uso.

### Electroporación de células competentes

Para electroporar las bacterias competentes de *M. bovis* BCG Tice y Phipps, se aplicaron 2 pulsos de 2.5 Vtz. Tan pronto como se aplicaron los pulsos a las muestras se les adicionó 900 µl de medio durante 16 h. Posteriormente se seleccionaron las bacterias clonadas por plaqueo en medio suplementado con Kanamicina (Gibco, USA) [30 µg/ml]. Las placas se incubaron durante 20 días y se tomó una colonia para determinar la presencia del plásmido y el gen clonado mediante hibridación.

### Clonación de ESAT-6 de *M. tuberculosis* H37Rv

Para la construcción de las clonas se seleccionó el plásmido PMV261 desarrollado en el Wright Fleming Institute (Figura 14). Este plásmido presenta un sitio de clonación múltiple (SCM), un origen de replicación para *M. tuberculosis* y otro para *Escherichia coli*. Para la clonación de *esat-6* se diseñaron los iniciadores ES1 y ES2 a partir de la secuencia de *esat-6* reportada en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv<sup>24,93</sup>, los cuales están flanqueados por secuencias específicas para las endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII, respectivamente.

---

Para identificar las colonias transformadas con el plásmido clonado, se extrajo el DNA de las colonias por el método de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, seguido de precipitación con etanol y finalmente con el método de GeneClean (GeneClean kit III, Bio 101, Inc. Joshua Way Vista, CA,USA) siguiendo las recomendaciones del productor.

Para cuantificar la expresión de las proteínas recombinantes ESAT-6 y 38-kDa en las subcepas clonadas de BCG se utilizó la prueba de ELISA de competencia. Para esto, las cepas rBCGE6 y rBCG38 se crecieron en agitación constante durante 12 días en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10 % de ADC. Al término de la incubación, los bacilos se cosecharon por centrifugación y se ajustaron en H<sub>2</sub>O a una DO=0.4 a 590 nm. Los extractos se prepararon por sonicación [VibraCell, Sonics, USA], aplicando 15 pulsos de 1 min a 24 kHz a 4°C, intercalados con 1 min de reposo en hielo.

Las microplacas de 96 pozos (MaxiSort, NUNC) se sensibilizaron toda la noche a 4°C con 5 µg/ml de cada una de las proteínas recombinantes de forma independiente. Por razones de bioseguridad en el ensayo no se incluyó el extracto de *M. tuberculosis* H37Rv. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con una solución al 1% albúmina sérica bovina (BSA) libre de gamma globulinas (Gibco, BRL) en PBS con 0.05% de Tween20. En la placa se adicionaron por duplicado 50, 30 ó 20 µg del extracto proteico de las bacterias recombinantes y las bacterias homólogas y fueron incubadas a 37°C en competencia con los anticuerpos MTB12 y MTBE6 (Dil. 1:125) durante 1h con agitación constante. Posteriormente, las microplacas fueron lavadas 5 veces con PBS-Tween-20 al 0.05 %. Finalmente, las placas fueron incubadas con el anticuerpo anti-gammaglobulinas murinas totales conjugado a fosfatasa alcalina (Dako Corporation, Carpinteria, California) (Dil. 1:1000) y los complejos inmunes fueron revelada adicionando diaminobencidina como sustrato. Las

microplacas fueron leídas a 492 nm en el lector STL-RainBow (STL Labinstruments, Austria) y los resultados de DO fueron expresados como el recíproco de los pozos sin antígenos en competencia. Para la determinación de la concentración de ambos antígenos en los extractos de las bacterias, se realizó en paralelo la curva de inhibición usando las proteínas recombinantes (rESAT-6 y r38-kDa).

### Vacunación de ratones BALB/c

Una alícuota de cada una de las subcepas de *M. bovis* BCG se descongeló rápidamente a 37°C, fue diluida en PBS-Tween80 0.05 % y se ajustó a 10<sup>5</sup> UFC/ml como se describió previamente. De forma aleatoria, se formaron grupos de 10 ratones que fueron inmunizados por vía subcutánea en la base de la cola. A cada animal se le administró una dosis única de 10<sup>4</sup> UFC de cada una de las subcepas de BCG ó las vacunas recombinantes, según correspondiera.

### Modelo de infección

Para evaluar la eficacia protectora de las subcepas de BCG y las vacunas recombinantes desarrolladas se utilizó el modelo previamente descrito por Hernández-Pando *et al* <sup>52</sup>. A las ocho semanas post-inmunización, los animales control (no inmunizados) se anestesiaron intraperitonealmente con Pentotal (56 mg/kg) para realizar una incisión media que permitió exponer la traquea. Posteriormente cada ratón fue inoculado intratraquealmente con 2.5 x 10<sup>5</sup> CFU de *M. tuberculosis* H37Rv o *M. tuberculosis* Beijing y la incisión fue suturada. Después de la intervención, los animales se mantuvieron en posición vertical hasta su recuperación. Ocho ratones de cada grupo fueron sacrificados en los días 1, 3, 7, 14, 21,

---



28, 60 y 120 posteriores a la inoculación. Durante el sacrificio cada ratón fue anestesiado en cámara de eter después de lo cual se colectó la sangre para obtención de suero y se extrajeron los pulmones, uno de los cuales fue congelado para la posterior determinación de las UFC; el otro fue perfundido con etanol absoluto para la preparación de cotes histológicos.

### Hipersensibilidad retardada tipo IV (DTH)

Para la determinación de la DTH en cada uno de los tiempos de sacrificio, de cada uno de los grupos de animales infectados se seleccionaron 4 ratones a los que se les inyectó en el cojinete plantar 20 µg de antígenos solubles (proteínas filtradas de cultivos de 6 semanas de *M. tuberculosis* H37Rv cultivadas en medio Proskauer-Beck modificado por Youmans). La induración fue medida con un vernier de ingeniero (Matotuyo) a las 24 h.

### CFU en pulmón

La eliminación o crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv o *M. tuberculosis* Beijing en los pulmones de los ratones inmunizados y sin inmunizar se determinó en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 post infección. Los pulmones fueron descongelados a 37°C y depositados en tubos con 3 ml de PBS-Tween-80 al 0.05 % para ser homogeneizados mecánicamente con un Polytron (Brinkmann instruments, Rexleid, Can). Los bacilos fueron cuantificados por plaqueo de diluciones seriadas (1:10) de cada uno de los homogeneizados en medio Middlebrook 7H10 suplementado con 10 % de OADC. Las placas fueron incubadas durante 21 días a 37°C realizando conteo de colonias a los 10 y 21 días auxiliado de un microscopio esteroscópico (Carl Zeiss, Germany). La cuenta de UFC se expresó en los

resultados como el promedio de 4 pulmones. Cada uno de los ensayos se realizó por duplicado.

### Análisis Histopatológico

Para la realización de cortes histológicos, los pulmones insuflados con alcohol absoluto se fijaron en el mismo por un mínimo de 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se cortaron parasagitalmente a través de hilio y el tejido se preparó de forma rutinaria para su inclusión en parafina. De cada uno de los bloques se hicieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Las determinaciones morfométricas de área total y área neumónica se realizaron con un microscopio Leica DM LS (Leica Microsystem, Wetzlar, GmbA, Germany) con el sistema de análisis digital Q-win (Leica microsystem Imaging Solutions Ltd, Cambridge, UK)

### Anticuerpos para citometría de flujo

Para determinar el porcentaje de linfocitos CD4+, CD8+ y la producción de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2) y Th2 (IL-4 e IL-10) en el infiltrado inflamatorio de la neumonía se utilizaron los anticuerpos de rata anti-ratón (Becton & Dickinson, Bioscience, New Jersey, USA): CD8a (Ly-2) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) clona 56-6.7, CD4 (L3T4) conjugado con R-Phycoerythrin ficoeritrina (R-PE) clona RM4-5, CD69-FITC clona H1-F3. Para la tinción de citocinas intracelulares se utilizaron: IFN-gamma-FITC clona XMG1.2, IL-4 R-PE clona BVD4-1D11, IL-2-R-PE e IL-10 conjugado con alocianina Allophycocyanin (APC) clona JES5-16E3.

---



Las poblaciones celulares se analizaron en el citómetro de flujo Epics Altra (Coulter, CA, USA) usando el programa Expo 2.0. Los porcentajes de células positivas se determinaron seleccionando la región de linfocitos (excluyendo detritos celulares, macrófagos y demás células monocíticas) después de la adquisición de 10,000 partículas.

### Tinción con marcadores de superficie CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>

Los linfocitos del infiltrado neumónico se purificaron de los pulmones de los ratones con 16 semanas de infección con *M. tuberculosis* H37Rv y a las 8 semanas de infección en aquellos grupos inoculados con *M. tuberculosis* Beijing. En 2 animales de cada grupo se insuflaron los pulmones con medio RPMI-1640 suplementado con 10 % suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, conteniendo Berfeldina A [5 µg/ml], colagenasa tipo IV [0.5 U/ml] (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) y 0.025 % de DNasa I. Posteriormente, los pulmones fueron extraídos, fragmentados en pedazos menores a 3 mm y se mantuvieron en agitación durante 1 h a 37°C en tubos con el medio arriba mencionado. Los tejidos se tamizaron a través de una malla de nylon estéril y la suspensión celular resultante se purificó con un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Histoprep, Sigma, St Louis, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células mononucleares obtenidas se lavaron con medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB inactivado por calor y se ajustaron a  $1 \times 10^7$  células/ml. Las células se incubaron con los anticuerpos anti CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Becton & Dickinson Bioscience, New Jersey, USA) por 30 min, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, las células se fijaron por 16h en una solución de para-formaldehído al 4 % antes de ser analizadas por citometría de flujo con el programa Expo Altra v.2 (Beckman Coulter System, California, USA).

## Tinción intracelular

Una alícuota de 1 millón de células purificadas para la tinción de marcadores de superficie se trabajó de forma similar a la previamente descrita. Las células se incubaron por 16h en medio RPMI-1640 SFB inactivado con calor conteniendo 3 µg/ml de berfeldina A (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), posteriormente, se trataron con la solución Citofix/Citoperm (BD Bioscience, NJ., USA) para fijar y permeabilizar las células, seguido de un lavado con la solución Citoperm (BD Bioscience, NJ., USA). Finalmente, las células fueron incubadas con los anticuerpos IL-2 R-PE, IL-4 R-PE, IL-10 APC e IFN-γ-FITC durante 30 min a 4°C, al término se eliminaron los anticuerpos no unidos y se fijaron las células con PBS / para-formaldehído al 4 %, en el cual se incubaron por 16 h antes de su análisis por citometría de flujo.

## Determinación de IgG1 e IgG2a

Para determinar de forma indirecta si la vacuna rBCG38 induce una respuesta celular Th1, se evaluó el título de IgG1 e IgG2a. De cada grupo de ratones se seleccionó aleatoriamente el suero de 4 de ellos para formar una poza que fue analizada para determinar los títulos contra extractos solubles de *M. tuberculosis* H37Rv y la proteína r38-kDa por ELISA. Los títulos de IgG1 e IgG2a de los grupos seleccionados se realizaron en placas de 96 pozos previamente sensibilizadas con 2 µg/ml de extracto soluble de *M. tuberculosis* H37Rv ó 1µg/ml de la proteína r38-kDa [donada por el Dr. Mahavir Singh (Lionex diagnostics and Therapeutics, GmbH, Braunschwig, Germany)]. Para determinar los títulos de los sueros, estos se evaluaron en diluciones (1:5), y se revelaron con anti IgG1 ó IgG2a *vs* ratón (ZYMED, Laboratories, San Francisco, California, USA) conjugados a fosfatasa alcalina (Dil. 1:1000), al término de 20 min, la reacción fue detenida con

---

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N y las microplacas de ELISA se leyeron a 492 nm en el lector SLT-Rainbows (SLT Lab instruments, Austria).

### Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias encontradas en las variables DTH, UFC's y porcentaje de tejido con neumonía de los grupos vacunados con las subcepas de BCG, se determinó por análisis de varianza (one-way ANOVA). Las diferencias entre cepas se evaluaron con la prueba de *chi* cuadrada. El análisis *Post Hoc* de las diferencias entre los grupos se determinó mediante el valor de *p* para comparaciones múltiples. Los valores de *p* mayores o iguales 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. La asociación entre las variables se determinó por el coeficiente de correlación *R* de Pearson's. Los valores de *R* menores de 5 % fueron considerados como significativos.

## RESULTADOS

### EVALUACIÓN DE 10 SUBCEPAS BCG

#### Supervivencia de ratones vacunados e infectados

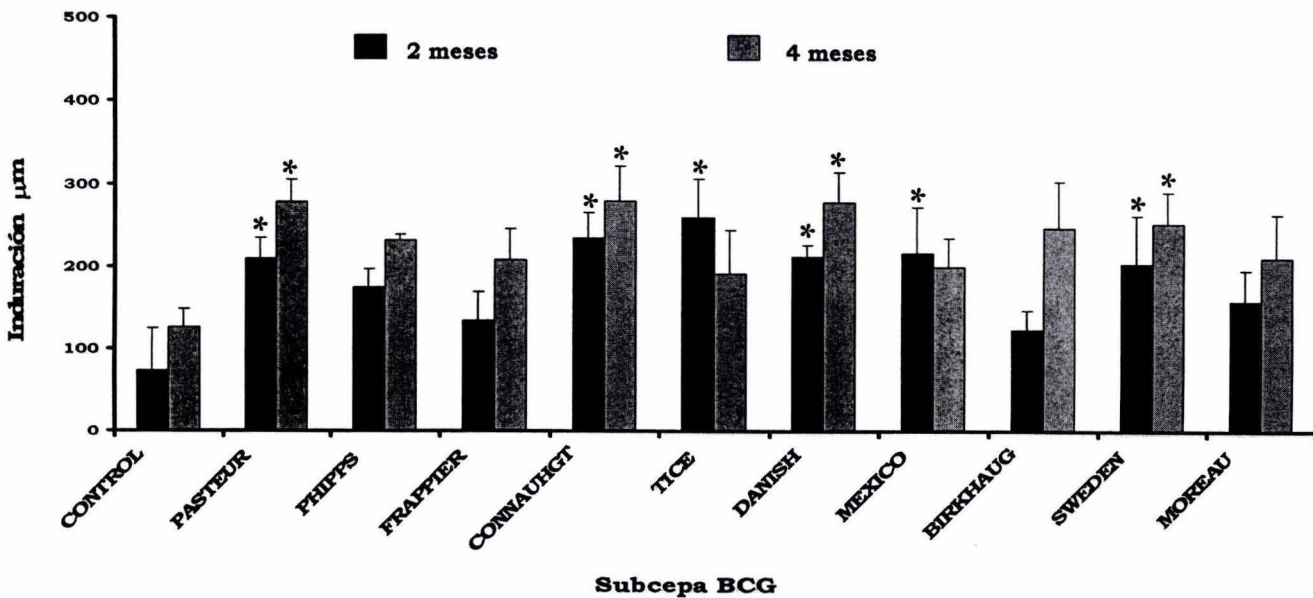
Los grupos vacunados con las 10 subcepas BCG evaluadas, no presentaron mortalidad de animales después de la infección con *M. tuberculosis* ni durante los cuatro meses de infección que duró el experimento. Esto probablemente debido a la dosis de infección utilizada y a la cepa de ratón (BALB/c) que de forma natural presenta resistencia a la infección con micobacterias.

#### Hipersensibilidad retardada tipo IV (DTH)

En la figura 11 se muestran la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) a los 2 y a los 4 meses posteriores a la infección con *M. tuberculosis* H37Rv. Únicamente los ratones vacunados con las subcepas Sweden, Pasteur, Danish y Connaught mostraron consistencia al presentar induración significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a la del grupo control en ambos tiempos de sacrificio. A los dos meses de infección, los ratones que desarrollaron la mayor respuesta de hipersensibilidad fueron aquellos vacunados con las subcepas México y Tice ( $p < 0.05$ ), mientras que a los 4 meses fueron los animales vacunados con las subcepas Frappier ( $p = 0.026$ ) y Phipps ( $p = 0.01$ ). En los demás grupos no se encontraron diferencias significativas al ser comparados con el grupo control.

---





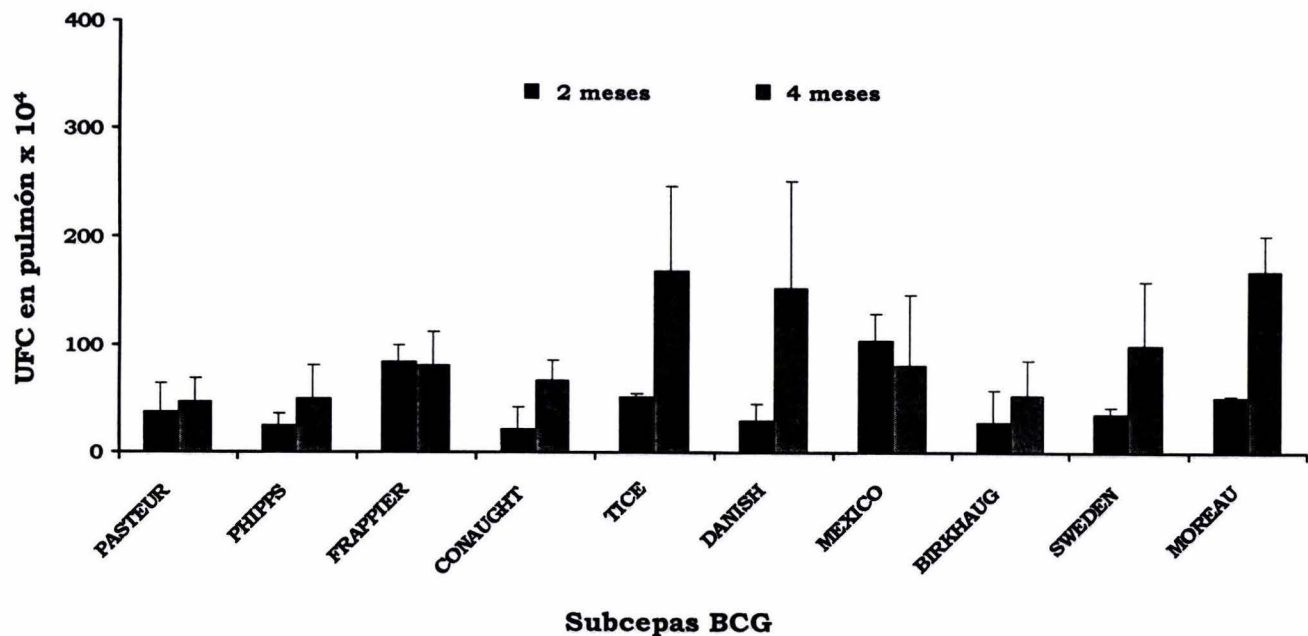
**Figura 11.**

Respuesta de hipersensibilidad retardada a los 2 y 4 meses de infección con *M. tuberculosis* H37Rv. Cada barra representa el promedio +DS de tres ratones seleccionados de forma aleatoria. \*  $p < 0.05$



## Carga bacilar en pulmón

Después de realizar los homogeneizados de pulmón, las diluciones seriadas (1:10) se sembraron en placas de medio Middlebrook 7H10, suplementado con 10% de OADC. Las UFC se contaron a los 10 y 21 días de incubación para confirmar las lecturas. En todos los grupos vacunados se observó una reducción significativa ( $p < 0.001$ ) en las cuentas de UFC, tanto a los 2 como a los 4 meses de infección con *M. tuberculosis* H37Rv comparados con el grupo control (sin inmunizar). A los cuatro meses de infección las subcepas Phipps, Pasteur, Connaught, Frappier, México y Sweden mantuvieron UFC menores a  $5 \times 10^5$  UFC por pulmón (Figura 12). Únicamente en los grupos vacunados con las subcepas Phipps, Pasteur, Connaught y Birkhaug, las UFC se mantuvieron bajas en ambos tiempos de sacrificio. Con excepción del grupo vacunado con la subcepa Pasteur, en todos los grupos vacunados se encontró una asociación entre las UFC y el porcentaje de área pulmonar con neumonía ( $R=0.52$ ;  $p=0.013$ ), siendo el grupo vacunado con la subcepa Phipps el que mostró menores cuentas de UFC, así como el menor porcentaje de tejido con neumonía.



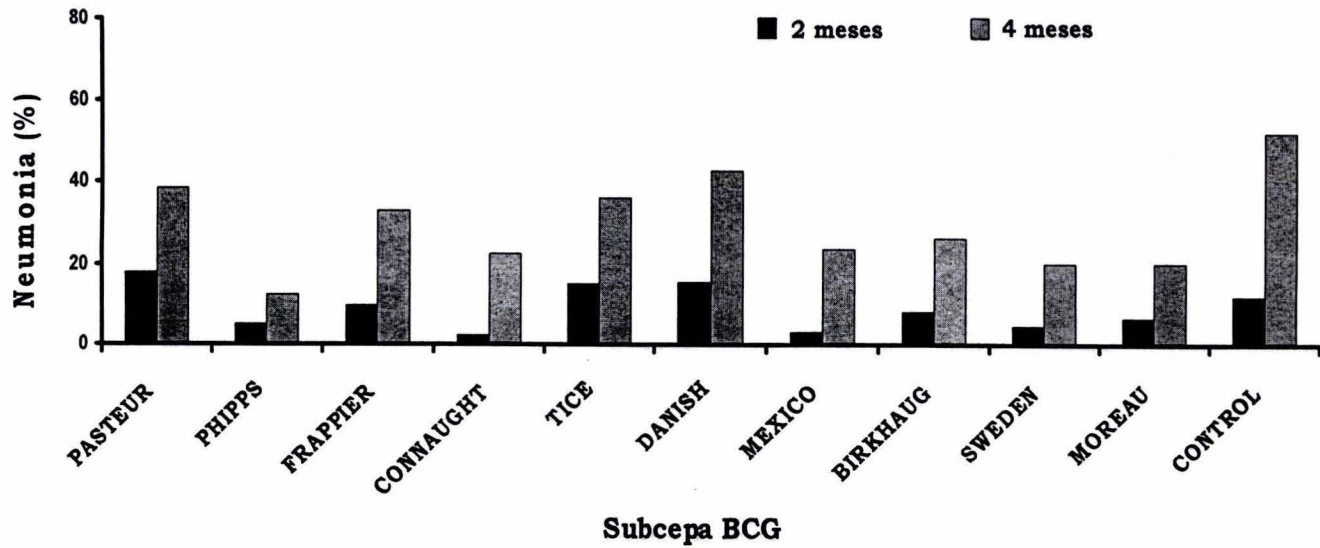
**Figura 12.**

UFC en pulmón de ratones vacunados con 10 subcepas BCG y retados con *M. tuberculosis* H37Rv. En cada tiempo de sacrificio se seleccionaron de forma aleatoria 4 pulmones de cada grupo de estudio para determinar las UFC a los 2 (barras negras) y 4 meses (barras grises) de infección con *M. tuberculosis* H37Rv. Cada barra representa la media + DS.

## Histopatología de pulmón

En los pulmones de los ratones vacunados se midió en cortes transversales el porcentaje de tejido afectado por neumonía. En todos los casos la neumonía se caracterizó por la presencia de macrófagos y linfocitos intersticiales, distribuidos generalmente alrededor de las áreas peri-vascular y peri-bronquial. A los cuatro meses de infección en todos los grupos se observó neumonía dispersa en grandes extensiones de tejido, encontrándose diferencias en la vacuolización de los macrófagos y la presencia de regiones con abundantes linfocitos entre los grupos estudiados. En los ratones vacunados con las subcepas Phipps, Sweden, Moreau y México se encontró el menor porcentaje de tejido neumónico a los 2 y 4 meses de infección (Figura 13), mientras que en los grupos vacunados con las subcepas Danish, Tice, Pasteur y Frappier el porcentaje de neumonía a los cuatro meses de infección se incremento significativamente con respecto a los 2 meses de infección.

---



**Figura 13.**

Neumonía en pulmón de ratones vacunados e infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. La gráfica ilustra el porcentaje en que se redujeron las neumonías en los grupos vacunados en relación al porcentaje de neumonía encontrado en el grupo control (no vacunado) a los 2 (barras negras) y 4 meses (barras grises) de infección con *M. tuberculosis* H37Rv.

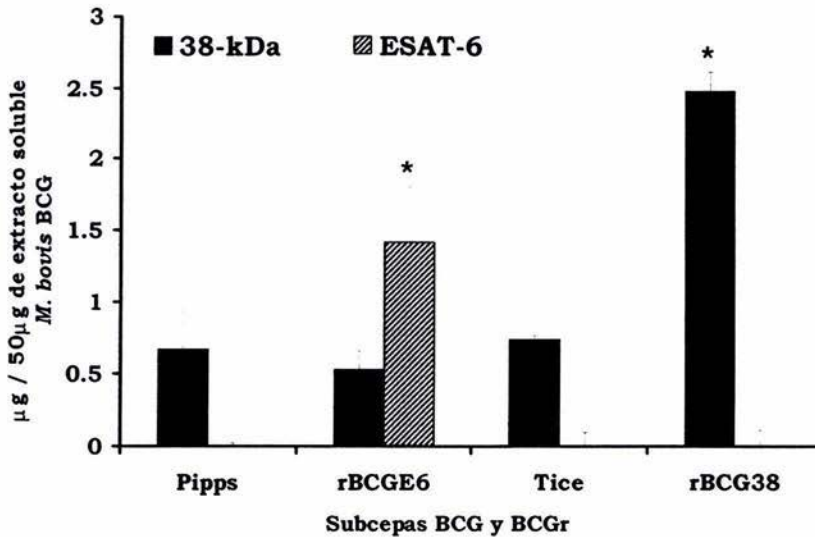
## VACUNAS RECOMBINANTES

### Construcción de vacunas recombinantes

Para la clonación de *estat-6* y *pst S1* se utilizaron las subcepas BCG Phipps y Tice respectivamente. Después de la electroporación de los bacilos con el plásmido PMV261-38-kDa y PMV261-E6, las colonias que se desarrollaron en el medio con kanamicina (30 µg/ml) mostraron una morfología indistinguible a la de las cepas sin transformar. A las subcepas transformadas se les denominó vacuna rBCG38 (Subcepa Tice transformada con PMV261-38-kDa) y vacuna rBCGE6 (subcepa Phipps transformada con PMV261-E6). En los plásmidos extraídos de las colonia seleccionadas se confirmó la presencia del gen clonado mediante la restricción del plásmido y la posterior detección de una banda de aproximadamente 5.9 kpb y 5.2 kpb, respectivamente (Imágenes no mostradas). Finalmente la expresión de las proteínas en las subcepas BCG transformadas se determinó por el método de ELISA de competencia en extractos celulares de cada una de ellas, encontrando tres veces más expresión de 38-kDa en la vacuna rBCG38 en comparación a la subcepa homóloga sin transformar (Figura 14). La expresión de ESAT-6 sólo se observó en la vacuna rBCGE6 y fue 2 veces la expresión de la proteína de 38-kDa en la subcepas sin transfectar.

---





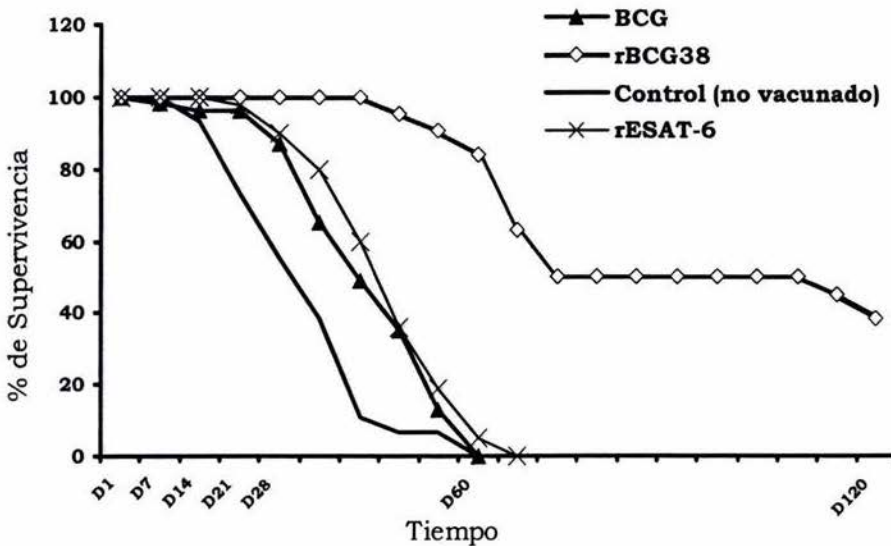
**Figura 14.**

Cuantificación de ESAT-6 y 38-kDa en las vacunas rBCGE6 y rBCG38. En los extractos celulares de las vacunas rBCG38 y rBCGE6 se cuantificó la producción de los antígenos 38-kDa y ESAT-6 por ELISA de competencia. Las barras representan la media de dos determinaciones + DS. \* p < 0.05

## Supervivencia

En todos los grupos de animales vacunados con rBCGE6, rBCG38 y sus homólogos e infectados con la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv sólo se observó pérdida de peso, principalmente en el grupo inmunizado con la subcepa TICE y en el grupo control, sin presentarse mortalidad a causa del reto. Simultáneamente, grupos de ratones vacunados con las mismas subcepas fueron infectados con el aislamiento clínico de *M. tuberculosis* Beijing, que previamente mostró ser hiper-virulento en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva por su alta tasa de mortalidad <sup>63</sup>. En estos grupos los animales control y los inmunizados con

rBCGE6 murieron entre los 28 y 60 días de infección, por la incapacidad de la vacuna de proteger contra *M. tuberculosis* Beijing. En contraste, el 50% de los animales inmunizados con rBCG38 sobrevivieron hasta los 120 de post-infección ( $p < 0.05$ ), tiempo en el que se sacrificaron el resto de los animales (Figura 15).

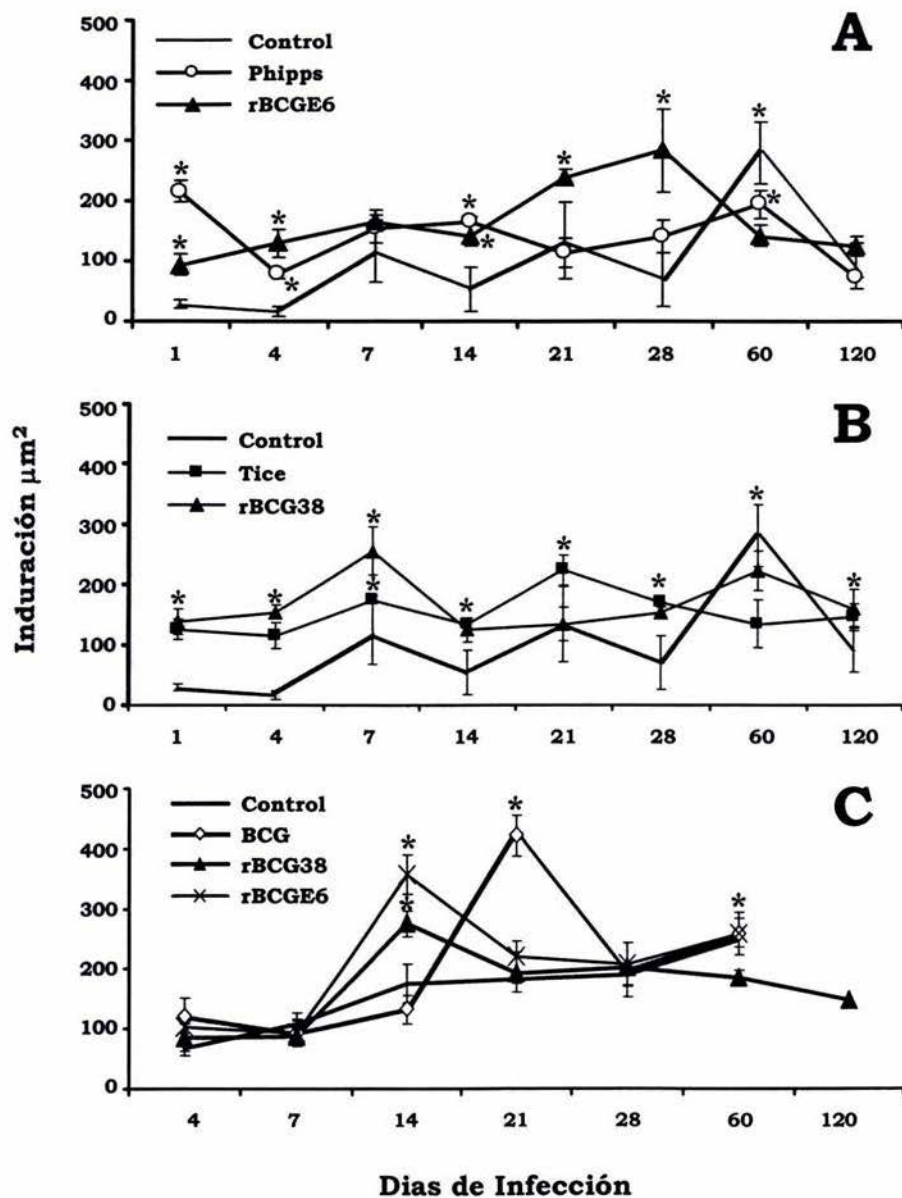


**Figura 15.**

Curva de supervivencia en ratones vacunados e infectados con *M. tuberculosis* Beijing. Los animales fueron inmunizados con las vacunas recombinantes y después de la infección con *M. tuberculosis* Beijing se les dio seguimiento durante cuatro meses. La vacunación con rBCG38 incrementó de forma significativa la supervivencia de los animales.

## Respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH)

Durante cada uno de los tiempos de sacrificio, se evaluó la respuesta de hipersensibilidad de los ratones inmunizados con las vacunas recombinantes y sus homólogas. En los grupos vacunados con las subcepas Tice y Phipps, hasta el día 28 la DTH fue mayor a la observada en el grupo control. En el grupo inmunizado con rBCGE6 se observó una respuesta de hipersensibilidad pequeña y constante durante todo el experimento, con excepción de la determinación a las 24 h post-infección en la que fue el doble de la encontrada en el grupo vacunado con BCG Phipps. El grupo vacunado con rBCG38 tuvo un máximo de induración a los 7 días de infección mientras que en el grupo inmunizado con rBCGE6 fue hasta el día 28. En el grupo control se observó un incremento gradual en la respuesta de hipersensibilidad, el cuál alcanzó su máximo a los 60 días post-infección para disminuir a los 120 días a niveles equiparables a los observados en los otros grupos (Figura 16A). Cuando los animales fueron retados con la cepa *M. tuberculosis* Beijing el grupo de animales inmunizados con rBCG38 la induración fue semejante a la observada en el grupo control, con el máximo al día 14 (Figura 16B) que sólo fue superado por la determinada a los 21 días post-infección en el grupo inmunizado con rBCGE6.



**Figura 16.**

Respuesta de hipersensibilidad retardada tipo IV en ratones vacunados e infectados. Cada punto representa la media  $\pm$  DS en los grupos vacunados e infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (A y B) y con *M. tuberculosis* Beijing (C). \*  $p < 0.05$

## UFC en pulmón

En los grupos vacunados con BCG Phipps, BCG Tice, rBCG38 y rBCGE6 después de 21 días de infección se encontró una reducción de 10 veces ( $p < 0.05$ ) en la infección con *M. tuberculosis* H37Rv. En los grupos inmunizados con rBCGE6 no se encontraron diferencias significativas en las UFC al compararse con el grupo vacunado con BCG Phipps (Tabla 3). La reducción en las UFC encontrada a los 60 días de infección en el grupo vacunado con rBCGE6 tampoco resultó significativa. Cuando comparamos las diferencias en UFC entre estos, se observaron 0.5 log más UFC en los animales vacunados con BCG Tice al día 28 que en los vacunados con rBCG38 (Tabla 3), esta diferencia se mantuvo hasta el día 120 (0.4 log menos UFC que en el grupo vacunado con BCG Tice). Sin embargo, a los 60 días de infección la diferencia entre ambos grupos no fue significativa.

En los animales infectados con *M. tuberculosis* Beijing, el grupo control tuvo un crecimiento exponencial de las micobacterias entre los días 7 y 28, provocando la muerte de los animales (Tabla 4). En el grupo vacunado con rBCGE6, hasta el día 28 de infección se observó un número de UFC similar al encontrado en el grupo vacunado con rBCG38. Entre los días 28 y 60 se encontró un crecimiento exponencial de las UFC (0.7 log) y una gran mortalidad. En el grupo vacunado con rBCG38 las UFC son significativamente menores a los 21 días ( $p < 0.05$ ) al compararlos con el grupo control y a los 60 días, cuando se le compara con el grupo vacunado con rBCGE6.



**Tabla 3.**

Unidades Formadoras de Colonia en pulmón en ratones vacunados e infectados con *M. tuberculosis* H37Rv.

Día	Control		BCG Tice		rBCG38		Phipps		rBCGE6	
	Media +/- DS		Media +/- DS		Media +/- DS		Media +/- DS		Media +/- DS	
	<b>UFC x 10<sup>4</sup> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv</b>									
<b>1</b>	<b>5.35</b>	1.94	<b>1.74</b>	1.50	<b>0.97</b>	0.22	<b>5.86</b>	3.67	<b>0.73</b>	0.11
<b>3</b>	<b>4.12</b>	0.99	<b>1.99</b>	1.41	<b>1.97</b>	0.50	<b>5.50</b>	2.52	<b>0.44</b>	0.10
<b>14</b>	<b>5.40</b>	3.88	<b>5.20</b>	1.55	<u>1.17</u>	0.77	<b>0.00</b>	0.00	<b>1.53</b>	0.38
<b>21</b>	<b>110.90</b>	30.26	<u>6.50</u>	2.81	<u>5.37</u>	3.23	<b>6.30</b>	0.42	<b>9.45</b>	7.00
<b>28</b>	<b>136.20</b>	20.05	<u>3.85</u>	1.76	<u>14.00</u>	6.58	<b>8.87</b>	1.75	<b>2.97</b>	1.57
<b>60</b>	<b>110.00</b>	52.69	<u>6.83</u>	2.76	<u>7.55</u>	3.13	<b>5.46</b>	1.82	<b>8.34</b>	2.83
<b>120</b>	<b>98.40</b>	59.07	<u>12.25</u>	6.17	<u>4.83</u>	2.22	<b>10.53</b>	6.13	<b>8.00</b>	4.51

Cada valor representa la media de 4 determinaciones por grupo +/- DS. Los valores subrayados muestran los valores que fueron significativamente menores a los del grupo control (\* p < 0.05).

**Tabla 4.**

Unidades Formadoras de Colonia en pulmón en ratones vacunados e infectados con *M. tuberculosis* Beijing.

Día	Control		BCG		rBCG38		rBCG38	
	Media +/- DS		Media +/- DS		Media +/- DS		Media +/- DS	
UFC x 10 <sup>5</sup> de <i>M. tuberculosis</i> Beijing								
1	<b>0.67</b>	0.44	<b>1.07</b>	0.51	<b>1.62</b>	0.37	<b>1.17</b>	0.47
4	<b>3.33</b>	1.00	<b>1.92</b>	0.64	<b>2.54</b>	0.48	<b>2.12</b>	0.44
7	<b>44.75</b>	16.38	<u><b>1.66</b></u>	1.18	<u><b>2.58</b></u>	1.09	<u><b>1.75</b></u>	0.57
14	<b>415.55</b>	184.93	<b>507.08</b>	145.29	<b>289.08</b>	202.71	<b>530.92</b>	79.72
21	<b>1956.67</b>	1015.89	<u><b>677.50</b></u>	228.68	<u><b>557.75</b></u>	270.97	<u><b>693.83</b></u>	95.20
28	<b>1783.31</b>	1629.47	<b>601.11</b>	194.98	<u><b>237.22</b></u>	77.46	<b>564.33</b>	149.60
60	<b>1500.00</b>	721.25	<b>1890.00</b>	975.81	<b>932.00</b>	132.18	<b>2140.00</b>	615.79
120					<u><b>1485.00</b></u>	1036.19		

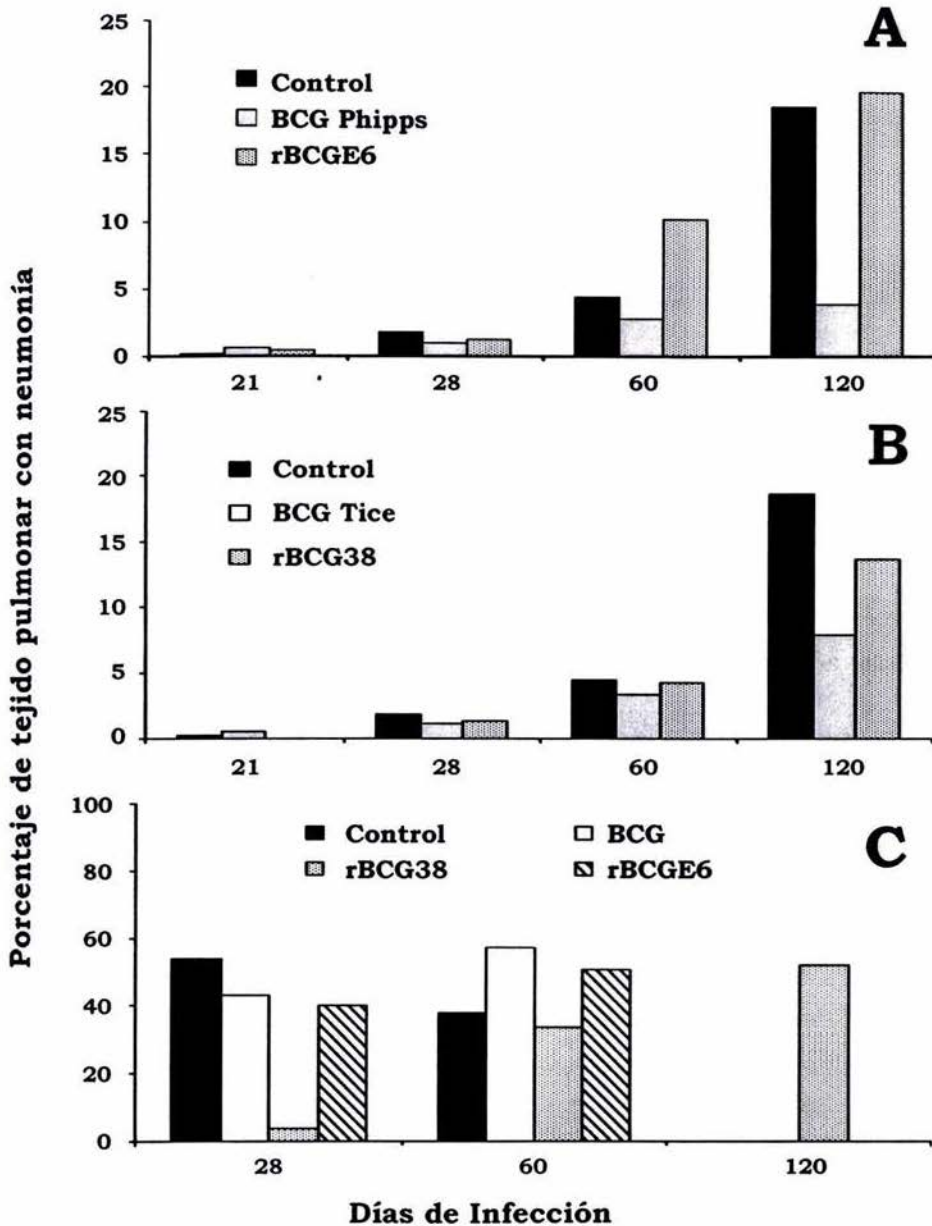
Cada valor representa la media de 4 determinaciones por grupo +/- DS. Los valores subrayados muestran los valores que fueron significativamente menores a los del grupo control (\* p < 0.05).

## Análisis histopatológico

De forma general en todos los grupos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv se detectó la presencia de neumonía desde el día 28 y se incrementó progresivamente hasta los 120 días en que fueron sacrificados los animales (Figura 17A). En el grupo control (sin vacunar) se observó el 18.5 % de neumonía a los 120 días de infección y en los animales vacunados con BCG y rBCG38 de 7.9 % y 13.7 % respectivamente. En los grupos inmunizados con las vacunas recombinantes a los 4 meses de infección con *M. tuberculosis* H37Rv se encontró un porcentaje mayor de neumonía al observado en las cepas homólogas sin transformar, siendo 0.7 veces mayor en rBCG38 y 3.7 veces mayor en rBCGE6.

En los animales infectados con *M. tuberculosis* Beijing, en el grupo control se observó el 54% de tejido con neumonía para el día 28, en contraste el grupo inmunizado con rBCG38 solo fue el 3.8 % del tejido con neumonía ( $p<0.05$ ). Para el día 60 de infección en los ratones inmunizados con rBCGE6 y rBCG38, el porcentaje de neumonía fue del 55.3 % y 33.7 % respectivamente. Finalmente, el grupo vacunado con rBCG38, único que sobrevivió hasta el día 120 de infección, mostró el 52.3 % de tejido con neumonía (Figura 17B). Esta se caracterizó por la presencia de abundantes macrófagos, células gigantes multinucleadas y linfocitos. En el grupo vacunado con rBCG38, al día 28 también se encontró mayor número de granulomas pequeños, comparado con el grupo control, en el que estaban rodeados por extensas áreas neumónicas.

---



**Figura 17.**

Porcentaje de tejido pulmonar con neumonía en ratones vacunados e infectados. La gráfica ilustra el porcentaje de tejido pulmonar afectado por neumonía durante la infección con *M. tuberculosis* H37Rv (A y B) y *M. tuberculosis* Beijing (C) en los grupos vacunados con rBCGE6 (A y C) y rBCG38 (B y C).

## Subpoblaciones celulares

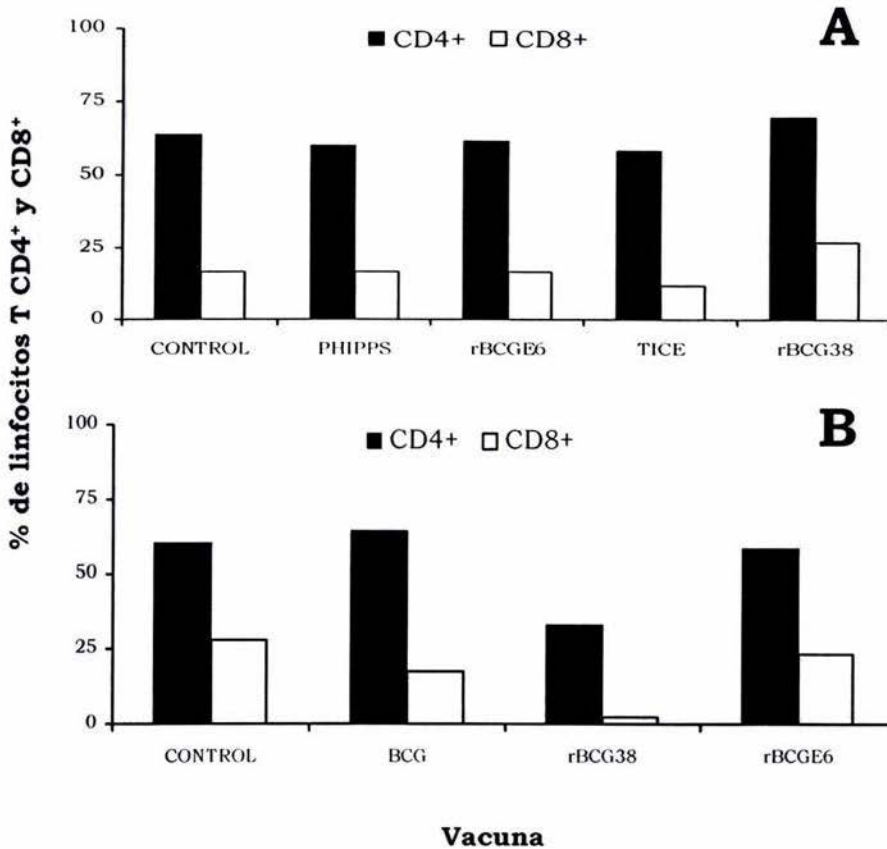
En la Figura 18 se ilustran los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> detectados a los cuatro meses de infección con *M. tuberculosis* H37Rv y a los dos meses de infección con *M. tuberculosis* Beijing en los grupos estudiados.

En todos los grupos se encontró un porcentaje mayor de linfocitos CD4<sup>+</sup> que de CD8<sup>+</sup>, el cual varió entre 58.5 % y 69.8 %. La subpoblación de linfocitos CD8<sup>+</sup> se encontró en el intervalo de 11.7 % a 26.7 %. En el grupo inmunizado con rBCG38 se observó el mayor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (26.7 %) al día 120 de infección con *M. tuberculosis*. Sin embargo, al infectar con *M. tuberculosis* Beijing, en el grupo inmunizado con rBCG38 a los 60 días de infección el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> fue 5 veces menor al encontrado en los otros grupos.

En general, cada uno de los grupos inmunizados mostró un porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> distinto. Cuando se infectó con *M. tuberculosis* H37Rv, en el grupo vacunado con la subcepa Tice se encontró la menor relación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (5:1), mientras que en el grupo inmunizado con rBCG38 fue de 2.5:1. En el caso de la infección con *M. tuberculosis* Beijing, con excepción del grupo inmunizado con rBCG38 en el que se encontró una relación de 15:1, en los demás grupos se observó la participación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> al encontrarse relación de 2:1 y 3.5 en los grupos control y el inmunizado con BCG, respectivamente (Figura 18B).

---





**Figura 18.**

Linfocitos T CD4 y CD8 durante la infección de ratones vacunados. Dos meses después de la inmunización, los animales se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv (panel A) o *M. tuberculosis* Beijing (panel B). Las barras representan el porcentaje de linfocitos CD4+ (barras negras) y CD8+ (barras blancas) de pulmón de 4 ratones a los 4 meses (A) y a los 2 meses (B) de infección.

## Perfil de citocinas en células extraídas de pulmón.

Las citocinas producidas por las células mononucleares determinaron el tipo de respuesta inmune contra la infección con *M. tuberculosis*. Se determinó el tipo de respuesta que se indujo durante la infección con *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* Beijing en los grupos inmunizados con las vacunas rBCG38 y rBCGE6, en base a la producción de citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-4 e IL-10 a los cuatro meses de infección con *M. tuberculosis* H37Rv y a los dos meses en los grupos infectados con *M. tuberculosis* Beijing.

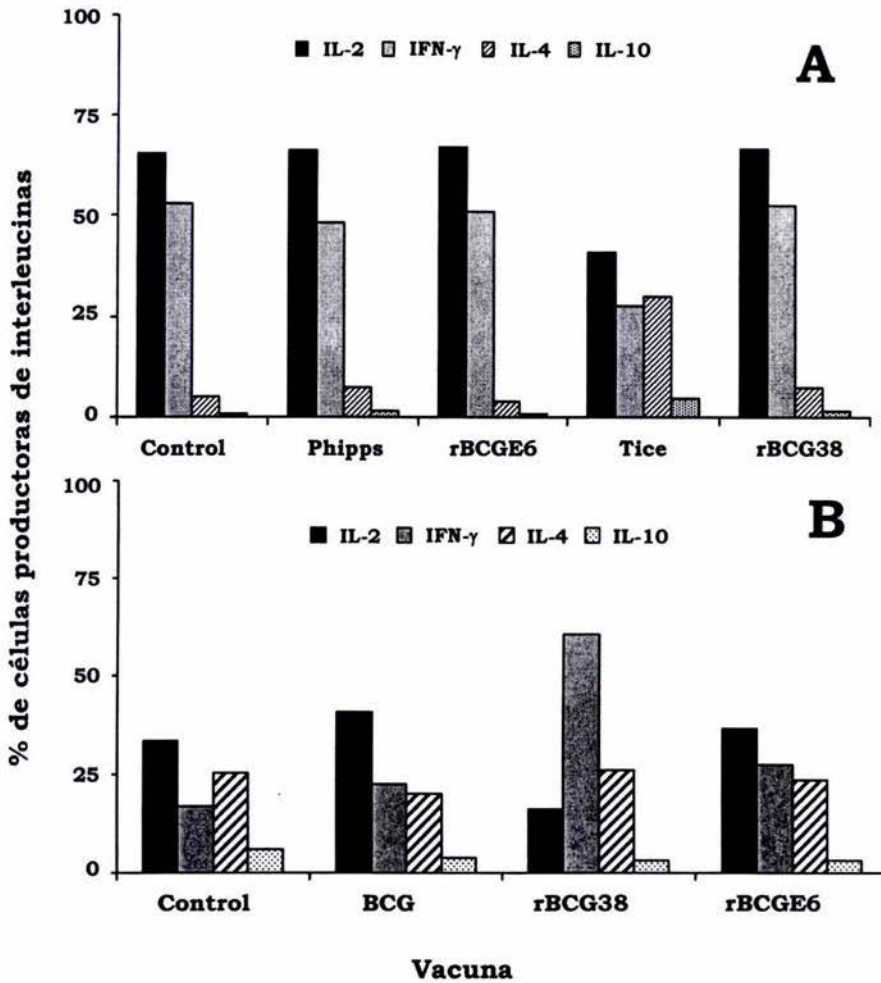
En los grupos de animales infectados con *M. tuberculosis* H37Rv principalmente se indujo una respuesta Th1. Con excepción del grupo inmunizado con BCG Tice, tanto en el grupo control como en los inmunizados con rBCG38 y rBCGE6 se encontró más del 60% de las células positivas para IL-2 (Figura 19A). En estos grupos no se observaron diferencias en la producción de IFN- $\gamma$ , detectando el 48 % de células positivas en el grupo inmunizado con BCG Phipps hasta el 52 % en el grupo control. En el grupo inmunizado con BCG Tice se observó una respuesta inmune mixta Th1/Th2 caracterizada por el 25 % de células productoras de IL-2 y el 22 % de células productoras de IFN- $\gamma$ , así como un incremento significativo en el porcentaje de células productoras de IL-4 (29.8 %) y de casi dos veces el porcentaje de IL-10 encontrado en los otros grupos.

En el grupo inmunizado con rBCG38 y retado con *M. tuberculosis* Beijing (Figura 19B), se encontró el 60.9 % de células productoras de IFN- $\gamma$  seguido por el 40.9% para el grupo inmunizado con BCG, 35 % para el vacunado con rBCGE6 y el 16.9 % para el grupo control. La IL-2 también se encontró de forma importante en el 40.1 % de las células de pulmón del

---

grupo inmunizado con rBCG38 y sólo el 16.2 % en el vacunado con BCG Tice.

El grupo inmunizado con rBCG38 se encontró la respuesta Th1 caracterizada por la producción de IFN- $\gamma$  en el 60 % de las células del infiltrado pulmonar, siendo tres veces más que las encontradas en el grupo control y el doble de las encontradas en el grupo inmunizado con BCG Tice (27.5 %). En la producción de IL-4 no se observaron diferencias significativas entre los grupos inmunizados con las vacunas estudiadas y el control (Figura 19B), al igual que en el caso de la IL-10 en donde el grupo control presentó 6.2 %.



**Figura 19.**

Producción de citocinas en pulmón durante la infección de ratones vacunados. A los cuatro y dos meses de infección con *M. tuberculosis* H37Rv (panel A) y *M. tuberculosis* Beijing (panel B). En las células mononucleares del infiltrado inflamatorio de pulmón se determinó el porcentaje de células productoras de interleucinas Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) y Th2 (IL-4 e IL-10). Las barras representan el porcentaje de interleucinas en 4 ratones de cada grupo.

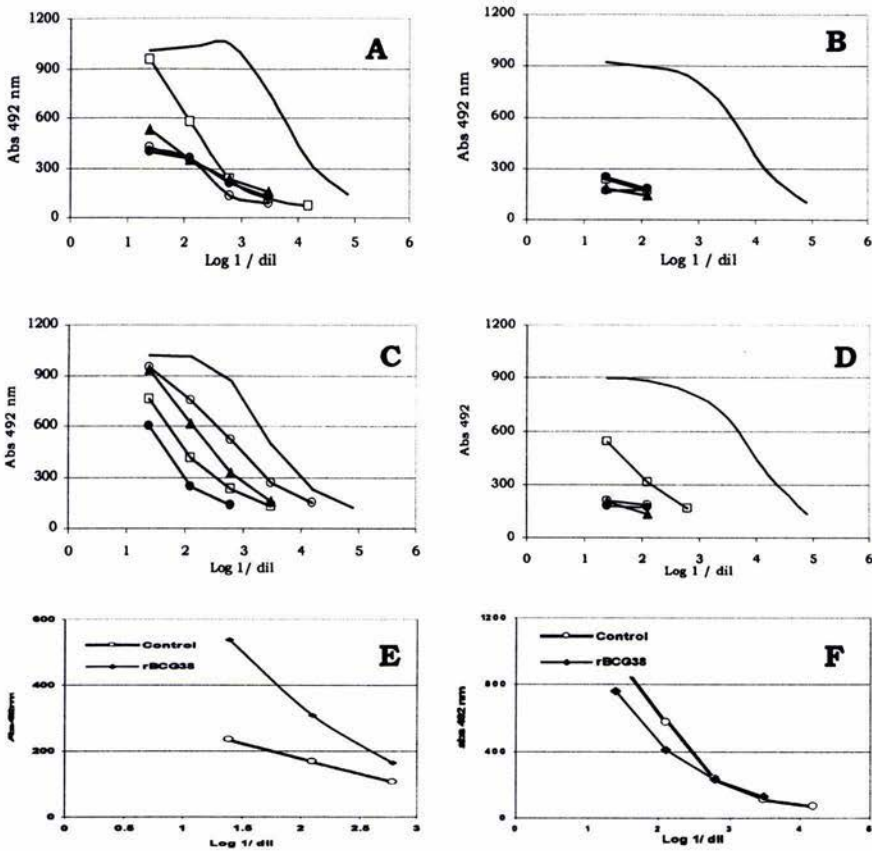
## Respuesta Humoral

Dada el incremento en eficacia protectora de la vacuna rBCG38, en este grupo y en el grupo control, se caracterizó la respuesta protectora inducida por la inmunización con rBCG38, mediante la determinación de los títulos de IgG1 e IgG2a contra extractos celulares de *M. tuberculosis* H37Rv ó la proteína recombinante de 38-kDa. Para esta determinación se seleccionaron de forma aleatoria el suero de 4 ratones por grupo; con éstos se conformó una poza por grupo que fue evaluada por ELISA.

En los grupos vacunados el patrón de anticuerpos IgG1 que reconocieron el extracto soluble de *M. tuberculosis* fue uniforme, sin diferencias a los 120 días de infección con *M. tuberculosis* H37Rv, y a los 60 días de infección con *M. tuberculosis* Beijing (Figura 20).

En cuanto a los títulos de IgG2a contra el extracto soluble y la proteína r38-kDa, por el contrario, se encontraron diferencias importantes para el grupo vacunado con rBCG38 con el máximo de producción a los 28 días (Figura 23D). Esta producción se acompañó de la reducción substancial en el título de IgG1 contra 38-kDa entre los días 7 y 60 de infección con *M. tuberculosis* Beijing. Este mismo grupo, al día 28 mostró el título de IgG2a de 1:79, el cual correlaciona con el establecimiento de una respuesta Th1 protectora, reflejada en las UFC y en la respuesta de hipersensibilidad retardada a los antígenos de la micobacteria.





**Figura 20.**

Titulación de los isotipos IgG1 e IgG2a en los ratones vacunados con rBCG38. En los animales del grupo control (A y B) y los inmunizados con rBCG38 (C y D), se determinó el título de anticuerpos IgG1 (A y C) vs el extracto celular de *M. tuberculosis* H37Rv y la proteína r38-kDa (B y D) a los 3 (—●—), 7 (—○—), 21 (—▲—), 28(—□—) y 60(—) días después del reto con *M. tuberculosis* Beijing. En comparación con el grupo control, los animales inmunizado con rBCG38 se incrementó el título de IgG2a (E) y disminuyó el título de IgG1 (F) vs r38-kDa a los 28 días de infección.

## Discusión

A pesar de que la tuberculosis es curable, su erradicación se dificulta debido a la carencia de una vacuna eficiente, al surgimiento de cepas más virulentas y cepas fármaco-resistentes y multifármaco-resistentes que dificultan el tratamiento adecuado en los pacientes. Estas dificultades manifiestan la necesidad de desarrollar una nueva vacuna contra la tuberculosis, capaz no sólo de prevenir la progresión de la enfermedad, sino también de eliminar la infección. La variación observada en la protección conferida por BCG (0 % a 80 %) coloca a la vacuna BCG en una controversia que actualmente mantiene en duda su eficacia para el control de la tuberculosis. Aunque en la actualidad sólo existen subcepas derivadas de las utilizadas en estos estudios y son las que se usan en más de 180 países como parte de los programas de inmunización, la OMS recomienda su implementación en aquellas regiones en las que la tuberculosis es endémica <sup>110,111</sup>.

Las vacunas BCG a las que actualmente se conocen como subcepas BCG se les designa con el nombre genérico BCG acompañado del sitio de origen (ej BCG Pasteur), laboratorio (ej. BCG Glaxo) o investigador que las preservó (ej. BCG Frappier) seguido, en algunos casos, del número de cultivo que se preservó como cepa tipo (ej. BCG Danish 1331). Bajo esta nomenclatura actualmente se reconocen 15 subcepas en los sistemas de colección de cepas internacionales.

A pesar de que desde inicios de los años 50's se realizaron evaluaciones de la eficacia protectora de algunas de las subcepas BCG disponibles para su uso en humanos, resulta difícil concluir si su eficacia protectora fue estable desde el desarrollo de la cepa original en 1921, o si disminuyó

paulatinamente durante su diversificación y propagación. Con los datos experimentales disponibles y las evaluaciones llevadas a cabo en diversos modelos animales resulta imposible determinar si una subcepa BCG es mejor que otra, debido a la carencia de criterios de evaluación estandarizados y la variación en las rutas de inmunización y/o infección<sup>67,68,92</sup>. La utilización de 2 cepas de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* Erdman) para infectar, así como las variaciones en las dosis utilizadas para inmunizar y retar impidieron comparar los estudios de evaluación de las subcepas y hacen más difícil establecer conclusiones sobre si las diferencias en protección observadas en las subcepas fueron determinadas por las características fenotípicas de la subcepa utilizada, por las condiciones metodológicas o por el modelo en el que fueron evaluadas<sup>30,59,60,77,78</sup>. Aún cuando cualquiera de estas variables estuviese implicada en las diferencias de protección, no se pueden explicar las diferencias observadas en los ensayos clínicos dada la inexistencia de las vacunas utilizadas e esos estudios.

Dadas las características arriba mencionadas, resulta imperante el uso de modelos animales que empleen vías y dosis estándar de inmunización y reto, con la finalidad de homologar criterios que permitan la comparación de las vacunas y la elección de una de ellas ("la mejor") para eventualmente sustituir a la vacuna BCG en uso, o utilizarla como vehículo para la recombinación de antígenos inmunodominantes. Algunos estudios demostraron que la administración de dosis bajas de *M. bovis* BCG por vía subcutánea induce una respuesta Th1, caracterizada por la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$ , mientras que dosis altas de inmunización indujeron preferentemente el desarrollo de una respuesta Th2, caracterizada por la producción de IL-4 e IL-10.

Con nuestro estudio de evaluación de la eficacia protectora de 10 subcepas de *M. bovis* BCG "contemporáneas" disponibles en la colección de cepas tipo americana (ATCC) en un modelo murino de tuberculosis pulmonar

---



progresiva que mimetizó la vía de infección natural en los humanos y, tomando como criterios de evaluación 1) la supervivencia de los animales, 2) las UFC en pulmón, 3) el porcentaje de tejido pulmonar con neumonía y 4) la respuesta de hipersensibilidad en los días de sacrificio.

Se determinó que el inóculo de vacunación fuera de una dosis única de  $10^4$  UFC. Utilizando esta dosis, en los grupos vacunados la DTH fue significativamente mayor a la observada en el grupo control, sin embargo, no se encontró correlación entre la magnitud de la DTH y ninguna de las otras variables estudiadas. Estos resultados confirmaron hallazgos previos en los que se encontró que la respuesta de hipersensibilidad no fue un indicador del desarrollo de una respuesta inmune protectora <sup>38,75</sup>.

En los animales vacunados con las 10 subcepas BCG se encontró una gran variación en el porcentaje de tejido neumónico. La subcepa Frappier fue una de las vacunas con las cuales se observó un número bajo de UFC, el cual fue similar tanto a los 2 como a los 4 meses de infección, sin embargo, a los 4 meses se observa neumonía en más del 30% del tejido pulmonar. En el caso de la subcepa Phipps, ésta presentó el segundo menor porcentaje de tejido con neumonía, y un número reducido de UFC en pulmón a los 2 y a los 4 meses de infección, sugiriendo la inducción de una respuesta Th1 caracterizado por la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$ . En contraste, las subcepas Pasteur, Danish, Frappier y Tice presentaron los mayores porcentajes de neumonía (desde 33 % hasta 42 %) a los cuatro meses de infección con *M. tuberculosis* H37Rv, reflejando la pérdida de control de la infección y el establecimiento de la fase crónica de la enfermedad. Estas cuatro subcepas mostraron protección moderada en los ensayos clínicos y en algunos casos ninguna, como sucedió con la subcepa Tice en el estudio de Chingleput, India <sup>12</sup>.

Las variaciones observadas en el modelo animal, quizá son efecto de la sobreatenuación de las vacunas BCG durante su conservación en los

laboratorios de producción durante la primera mitad del Siglo XX. Sin embargo, esta atenuación no guarda relación con la genealogía de las subcepas BCG construida con apoyo de micro arreglos de los marcos de lectura de *M. tuberculosis* H37Rv<sup>10,11</sup>.

Los ensayos clínicos en humanos únicamente permiten la comparación de 5 subcepas BCG, de las cuales únicamente la subcepa Frappier mostró consistencia con la protección observada en los estudios de Saskatchewan y Vanadivine (80 %) <sup>18</sup>. Las subcepas Danish, Tice y Pasteur, mostraron una menor capacidad de conferir protección. En el caso de la subcepa Phipps, la protección observada en los estudios clínicos disminuyó de 83% en el primer estudio a 40 % en el segundo, sugiriendo una sobre atenuación de esta subcepa. Sin embargo, las subcepas BCG utilizadas en estos estudios no pudieron ser conservadas íntegramente y actualmente solo existen subcepas derivadas de ellas.

Los modelos animales participan preponderantemente en el desarrollo de cualquier vacuna, por lo que en nuestro estudio, se optimizó el modelo animal definiendo las rutas y dosis de inmunización e infección, el número de inmunizaciones a aplicar, el intervalo entre las mismas, el tiempo adecuado para infectar a los animales después de la última inmunización, así como la cepa de referencia de *M. tuberculosis* con la cual se infectó. Una vez alcanzada la primera meta, paralelamente se realizaron estudios de patogenicidad en este modelo con el aislamiento 950 1000 perteneciente al genotipo Beijing previamente caracterizado <sup>63</sup>.

En este estudio se demostró que al evaluar 10 diferentes subcepas BCG producidas bajo las mismas condiciones y utilizando los mismos criterios de evaluación, cada una de ellas protegió a los animales en diferente grado, siendo las diferencias observadas en el porcentaje de tejido con neumonía un indicador indirecto del establecimiento de respuesta inmune distinta. Con el presente estudio, determinamos que la subcepa Phipps

---



mostró el mayor grado de protección, sugiriendo su uso como vehículo para la elaboración de vacunas recombinantes.

Estos hallazgos sustentan la hipótesis de que la vacuna BCG originalmente desarrollada por Calmette y Guèrin en 1921 al sufrir un proceso de diversificación y, en algunos casos como la subcepa Tice, una sobre-atenuación durante su propagación en los diferentes laboratorios a los que fue entregada para su producción local. La ineficacia de algunas subcepas para proteger contra la tuberculosis puede ser parcialmente explicada por otros factores como la sensibilización con micobacterias no tuberculosas que pudiera bloquear, enmascarar o alterar la respuesta inmune desarrollada por vacunación con BCG <sup>13,16</sup>.

A partir de la declaración de emergencia global contra la tuberculosis, la utilización de subcepas BCG para sobre-expresar antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis* capaces de conferir inmunidad protectora al ser administrados individualmente, es hasta ahora la única estrategia que demostró conferir protección superior a la inducida con la vacuna BCG <sup>53,54</sup>.

En nuestra experiencia la recombinación de BCG Phipps con la proteína ESAT-6, resultó en el incremento al doble del porcentaje de tejido con neumonía desde los 60 días de infección, comparado con BCG Phipps, cuando se infectó con *M. tuberculosis* Beijing. En el grupo vacunado con rBCGE6 se encontró que el índice de mortalidad fue semejante al observado en el grupo control y el vacunado con BCG Tice, con una respuesta Th1/Th2.

Este estudio demostró el incremento en la eficacia protectora de BCG, cuando fue utilizada como vehículo para la expresión del antígeno 38-kDa de *M. tuberculosis*. En este caso, la sobre-expresión de la proteína de 38-kDa (transportador de fosfatos con homología a la superfamilia de los ABC

transportadores) indujo una respuesta inmune capaz de controlar la infección con *M. tuberculosis* y con aislamientos clínicos de mayor virulencia (ej, *M. tuberculosis* Beijing), prolongando de forma significativa la supervivencia de los animales. La sobre-expresión de esta proteína (Figura 4) favoreció la respuesta inmune Th1, caracterizada por la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 (Figura 19), acompañado de títulos elevados de IgG2a contra la proteína de 38-kDa y la disminución del título de IgG1 contra este y otros antígenos solubles de *M. tuberculosis* (Figura 20C y D), resultantes de un perfil de citocinas Th1.

En este estudio se observó una respuesta temprana de hipersensibilidad en los animales vacunados con rBCG38 independientemente de la cepa utilizada en la infección. Esta respuesta, observada desde los 7 días de infección con *M. tuberculosis* Beijing y a los 14 días cuando se infectó con *M. tuberculosis* H37Rv, reflejó la inducción de respuesta celular T más temprana. Sin embargo, la respuesta de hipersensibilidad no correlacionó con el control de la infección y el desarrollo de la patología para los 2 y 4 meses. Esta controversia es ampliamente estudiada por un gran número de investigadores y ahora se acepta que la relación entre hipersensibilidad y respuesta inmune celular son eventos que comparten vías de señalización, pero con mecanismos independientes <sup>74</sup>.

En el grupo inmunizado con rBCG38, se encontró el doble de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los detectados en la cepa homóloga (Figura 18). En este grupo también se observó un perfil de citocinas Th1 indicado por la presencia de 2.5 veces más células productoras de IFN- $\gamma$ , así como el cambio de respuesta, de Th1/Th2 en los animales vacunados con BCG, a la Th1 en los animales inmunizados con esta vacuna recombinante (Figura 19).

Los eventos inmunológicos responsables de la protección contra la tuberculosis en los sujetos con infección latente, quedan aún sin resolverse, sin embargo el desarrollo de la respuesta inmune Th1 es

---

indispensable en el control de la tuberculosis. Esta respuesta, caracterizada por la producción de IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  (principalmente) determina el isotipo IgG2a en los anticuerpos producidos contra el agente infeccioso en los ratones vacunados con rBCG38. Aunque la función de los anticuerpos en el control de la infección por *M. tuberculosis* es incierta, estos pueden participar en la contención de los microorganismos mediante la opsonización de la micobacteria y su posterior destrucción por los macrófagos activados o por fijación del complemento. En este estudio, en el grupo vacunado con rBCG38 se observó un cambio de isotipo a IgG2a desde los primeros días de infección con *M. tuberculosis* Beijing, con el título máximo a los 28 días de infección.

El incremento en la protección observado con la vacuna recombinante rBCG38 requiere estudios complementarios, ya que la simple sobre-expresión de la proteína de 38-kDa no explica el incremento en protección. En estos casos resulta imprescindible conocer el efecto que tienen la producción de este antígeno sobre la expresión de otras proteínas y su modulación, ya que estas interactúan con el sistema inmune y por lo tanto están relacionadas a la protección.

De igual forma, en este estudio se manifestó la necesidad de continuar estudiando estas nuevas vacunas contra la tuberculosis en modelos susceptibles y resistentes, en los que se usen aislamientos de los genotipos de *M. tuberculosis* más prevalentes en los brotes epidémicos. En nuestro caso al evaluar la capacidad de las vacunas recombinantes para controlar la infección con *M. tuberculosis* Beijing, actualmente considerado el genotipo contemporáneo más prevalente en Asia y uno de los más virulentos <sup>41</sup>, se observó cómo la respuesta inmune desarrollada por la vacunación fue capaz de controlar la progresión de la infección de forma distinta para la infección con *M. tuberculosis* H37Rv.

De las características más importantes de la vacuna rBCG38 es el posible



sostenimiento de la respuesta inmune a la proteína de 38-kDa por sensibilización continua con MNT en las regiones donde la tuberculosis tiene mayor prevalencia. En Malawi esto se demostró al evaluar la respuesta de linfocitos T contra la proteína de 38-kDa en sujetos con y sin historia de vacunación previa, encontrándose una respuesta proliferativa en ambos grupos caracterizada por la proliferación de linfocitos T antígeno específicos y la producción de IFN- $\gamma$ , lo que sugiere la inducción de una respuesta Th1 por sensibilización con antígenos compartidos con BCG <sup>13</sup>.

Concluimos que la vacuna rBCG38 indujo mayor protección por la inducción de respuesta Th1 desde los primeros días de infección, sin embargo será necesario realizar estudios de seguimiento de la respuesta inmunológica post infección con *M. tuberculosis* para confirmar si esta se mantiene durante la progresión de la enfermedad. Estos hallazgos deberán confirmarse en modelos animales más susceptibles para saber si esta nueva vacuna es segura y eficiente contra la infección con *M. tuberculosis* antes de proyectar su uso en estudios de fase uno con voluntarios sanos.

Adicionalmente, en este trabajo quedó manifiesto que la selección de antígenos inmunodominantes para su sobre-expresión por alguna de las subcepas BCG es fundamental para inducir una respuesta inmune capaz de contener la infección y prevenir la enfermedad.

El desarrollo y diseminación de cepas de *M. tuberculosis* con mayor virulencia, pertenecientes a un grupo homogéneo de aislamientos designado como genotipo Beijing, en este y otro estudio se demostró la incapacidad de la vacuna BCG de conferir protección contra esta cepa <sup>63</sup>. En estudios más recientes realizados en nuestro grupo se encontró que la subcepa Phipps también confiere mayor protección al compararse con la subcepa Tice contra la infección con *M. tuberculosis* Beijing. Esta protección fue significativamente mayor a la observada en el grupo control, pero menor a la encontrada en los animales inmunizados con rBCG38; sin

---

embargo, estos resultados preliminares requieren de mayores estudios.

La necesidad de evaluar las nuevas vacunas en modelos animales utilizando diversos aislamientos clínicos como infección, incrementará la certeza de obtener vacunas capaces de proteger contra gran diversidad de genotipos de *M. tuberculosis* que infectan al humano y definen la epidemiología actual de la enfermedad, o bien, construir vacunas *ad hoc* para cada región, cuyo dinamismo obligará una estrecha vigilancia pre y post vacunación para contar con vacunas que se apeguen a los cambios epidemiológicos de cada región. El surgimiento de cepas con mayor virulencia en regiones como la provincia de Beijing, China, donde la cobertura de vacunación es mayor al 99 % y el tratamiento tiene una eficiencia mayor al 80 %, representa una adaptación de *M. tuberculosis* para evadir la respuesta inmune desarrollada por vacunación. Esta hipótesis sustenta la ocurrencia de casos de tuberculosis con mayor severidad en sujetos con historia de vacunación previa con BCG e incrementa la necesidad de desarrollar nuevas vacunas capaces de proteger contra estas cepas.



## Conclusiones

### Primera Etapa

Las subcepas de BCG inducen diferentes grados de protección en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva de acuerdo a los criterios de supervivencia, UFC, porcentaje de tejido pulmonar con neumonía y DTH.

La vacunación con BCG protege de forma significativa contra un reto con *M. tuberculosis* H37Rv.

La protección conferida por las subcepas BCG evaluadas puede ser reconocida como de baja en las subcepas Tice, y Pasteur ó alta en las subcepas Phipps y Connaught, encontrando a las demás subcepas dentro de este intervalo.

La subcepa BCG Phipps presentó el menor porcentaje de neumonía, el cual se correlacionó con un reducido número de UFC en pulmón.

Las diferencias de protección observadas en el presente estudio no reflejan la genealogía de las subcepas BCG descrita por micro-arreglos.

---

## Segunda etapa

Las subcepas BCG pueden ser utilizadas eficientemente como vehiculos para la expresión de antígenos homólogos, previamente caracterizados como inmunodominantes en *M. tuberculosis*.

La producción de ESAT-6 en *M. bovis* BCG no incrementa la eficacia protectora de la vacuna, mostrando una mortalidad semejante a la encontrada en el grupo control y una respuesta mixta Th1/Th2.

La inmunización con rBCG38:

- Incrementa de forma significativa la supervivencia de los ratones infectados con *M. tuberculosis* Beijing.
- Reduce de forma significativa la carga bacilar en los pulmones de los ratones infectados.
- Induce el control de la infección eficientemente observándose el desarrollo de neumonía significativamente menor al encontrado en el grupo control.
- Induce una respuesta Th1, caracterizada por la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  en un gran porcentaje de las células obtenidas del infiltrado inflamatorio.

El perfil de citocinas Th1 promueve la producción de IgG2a y la disminución progresiva del título de IgG1 contra antígenos de *M. tuberculosis* H37Rv.

La respuesta inmune montada contra la infección con *M. tuberculosis* cambia dependiendo de la virulencia de la cepa utilizada. En los grupos retados con *M. tuberculosis* H37Rv se observó una respuesta celular con mayor participación de linfocitos CD8+, mientras que en el grupo retado con *M. tuberculosis* Beijing casi no participó esta subpoblación de linfocitos T.

## Bibliografía

1. Abou-Zeid C, Smith I, Grange J, Steele J, Rook G. **Subdivision of daughter strains of bacille Calmete-Guérin (BCG) according to several protein patterns.** J Gen Microbiol 1992;132:3047-3053.
2. Agrewala JN, Mishra GC. **A 38-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* predominantly induces the secretion of interleukin-2, interferon-gamma and IgG2a antibodies.** Microbiol Immunol 1995;39:801-808.
3. Ahmed N, Alam M, Rao KR, Kauser F, Kumar NA, *et al.* **Molecular genotyping of a large, multicentric collection of tubercle bacilli indicates geographical partitioning of strain variation and has implications for global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*.** J Clin Microbiol 2004;42:3240-3247.
4. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, *et al.* **Transmission of tuberculosis in New York City: An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiological methods.** N Engl J Med 1994;330:1710-1716.
5. Andersen BA, Hansen BE. **Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000 molecular weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*.** Infect Immun 1989;57:2481-2488.
6. Andersen P, Andersen BA, Sorensen A, Nagai S. **Recall of long-lived to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice.** J Immunol 1995;154:3359-3372.
7. Bala L, Anand S, Sinha S. **Enhancement of human T cell response to a peptide epitope of 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* by liposomes.** Immunopharmacol Immunotoxicol 2002;24:255-263.
8. Barnes PF, El-Hajj H, Preston-Martin S, Cave D, Jones BE, Oyata M, Pogoda J, Eisenach KD. **Transmission of tuberculosis among the urban homeless.** JAMA 1996;275:305-307.
9. Behr MA, Schroeder BG, Brinkman JN, Slayden RA, Barry CE 3<sup>rd</sup>. **A point mutation en the *mma3* gene is responsible for impaired methoxy mycolic acid production in *Mycobacterium bovis* BCG strains obtained after 1927.** J Bacteriol 2000;182:3394-3399.



10. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. **Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray.** *Science* 1999;284(5419):1520-1523.
11. Behr MA, Small PM. **A historical and molecular phylogeny of BCG strains.** *Vaccine* 1999;17:915-922.
12. Behr MA. **Correlation between BCG genomics and protective efficacy.** *Scand J Infect Dis* 2001;33:249-252.
13. Black GF, Weir RE, Chaguluka SD, Warndorff D, Crampin AC, *et al.* **Gamma interferon responses induced by a panel of recombinant and purified mycobacterial antigens in healthy, non-*Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated Malawian young adults.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:602-611.
14. Boesen H, Jensen NB, Wilcke T, Andersen P. **Human T cell responses to secreted antigen fraction of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Infect. Immun* 1995;63:1491-1497.
15. Braibant M, Lefevre P, de Wit L, Ooms J, Peirs P, Huygen K, Wattiez R, Content J. **Identification of a second *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding proteins of an ABC phosphate transporter.** *FEBS Lett* 1996;394(2):206-212.
16. Brandt L, Feino Cunha J, Weinreich Olsen A, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, Andersen P. **Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis.** *Infect Immun* 2002;70:672-678.
17. Brandt L, Oettinger T, Holm A, Andersen P. **Key epitopes on the secreted ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity *Mycobacterium tuberculosis*.** *J Immunol* 1996;157:3527-3533.
18. Brewer TF. **Preventing Tuberculosis with Bacillus Calmete-Guérin Vaccine: A Meta-Analysis of the Literature.** *Clin Infect Dis* 2000;31(suppl 3):S64-S67.
19. Burgos MV, Mendez JC, Ribon W. **Molecular epidemiology of tuberculosis: methodology and applications.** *Biomedica* 2004;24(Supp 1):188-201.
20. Chambers MA, Williams A, Gavier-Widen D, Whelan A, Hall G, *et al.* **Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG auxotrophic mutant that protects guinea pigs against *M. bovis* and haematogenous spread of *Mycobacterium tuberculosis* without sensitization to tuberculin.** *Infect Immun* 2000;68:7094-7099.



21. Coates ARM, Hewitt J, Allen BW, Ivanyi J, Mitchison DA. **Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies.** Lancet 1981;2:167-169.
22. Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, Fineber HV. **The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature.** Pediatrics 1995;96:29-35.
23. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F. **Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature.** JAMA 1994;171:698-702.
24. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, *et al.* **Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence.** Nature 1998;396:190-203.
25. Collins DM. **New tuberculosis vaccines based on attenuated strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex.** Immunol Cell Biol 2000;78:342-348.
26. Cooper MA, Flynn LJ. **The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*.** Curr Opin Immunol 1995;7:512-516.
27. Corbett EL, De Cock KM. **The clinical significance of interactions between HIV and TB: more questions than answers.** Int J Tuberc Lung Dis 2001;5:205-217.
28. Corbett EL, De Cock KM. **Tuberculosis in the HIV-positive patient.** Br J Hosp Med 1996;56:200-204.
29. Currie CS, Williams BG, Cheng RC, Dye C. **Tuberculosis epidemics driven by HIV: is prevention better than cure?.** AIDS 2003;17:2501-2508.
30. Daugelat S, Ladel CH, Kaufmann SH. **Influence of mouse strain and vaccine viability on T-cell responses induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin.** Infect Immun 1995;63:2033-2040.
31. De Cock KM, Dworkin MS. **HIV infection and TB.** World Health Organization 1998;51:14-25.
32. de Kantor IN, Latini O, Barrera L. **Resistance and multiresistance to antitubercular drugs in Argentina and in other Latin American countries.** Medicina (B Aires). 1998;58(2):202-208.

33. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. **Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000.** Bulletin of the World Health Organization 1994;72(2):213-220.
34. Dourado I, Rios MH, Pereira SM, Cunha SS, Ichihara MY, *et al.* **Rates of adverse reactions to first and second doses of BCG vaccination: results of a large community trial in Brazilian schoolchildren.** Int J Tuberc Lung Dis 2003;7:399-402.
35. Elhay MJ, Oettinger T, Andersen P. **Delayed-type hypersensitivity responses to ESTA-6 and MPT 64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig.** Infect Immun 1998;66:3454-3456.
36. Ellner JJ. **Review: The Immune Response in Human Tuberculosis-Implications for Tuberculosis Control.** J Infect Dis 1997;176:1351-1359.
37. Espitia C, Mancilla R. **Identification isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigen.** Clin Exp Immunol 1989;77:378-383.
38. Flynn JL, Chan J. **Immunology of tuberculosis.** Annu Rev Immunol 2001;19:93-129.
39. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. **Tuberculosis.** Lancet. 2003;362:887-899.
40. Genewein A, Telenti A, Bernasconi C, Mordasini C, Weiss S, *et al.* **Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community.** Lancet 1993;342:841-844.
41. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. **Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review.** Emerg Infect Dis 2002;8:843-849.
42. Gobin J, Wong DK, Gibson BW, Horwitz MA. **Characterization of exochelins of the *Mycobacterium bovis* type strain and BCG substrains.** Infect Immun 1999;67:2035-2039.
43. Goodfellow M, Minnikin DE. Circumscription of the genus. In: Dans P Kubica, Wayne LG. **The Mycobacteria: a sourcebook.** Marcel Dekker, Inc., New York. 1984. pp.
44. Griffin JF, Chinn DN, Rodgers CR, Mackintosh CG. **Optimal models to evaluate the protective efficacy of tuberculosis vaccines.** Tuberculosis (Edinb). 2001;81:133-139.



45. Groenen PMA, Bunschoten AE, van Embden JDA, van Soolingen D. **Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method.** Mol Microbiol 1993;10:1057-1065.
46. Gruft H, Johnson R, Claflin R, Loder A. **Phage-typing and drug-resistance patterns as tools in mycobacterial epidemiology.** Am Rev Respir Dis 1984;130:96-97.
47. Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinson DM, Smith S, Sherman DR. **Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*.** Mol Microbiol 2004;51(2):359-370
48. Harboe M, Malin SA, Dockrell SH, Wiker GH, Ulvund G, *et al.* **B-Cell Epitopes and Quantification of the ESAT-6 Protein of *Mycobacterium tuberculosis*.** Infect. Immun 1998;66:717-723.
49. Harboe M, Oettinger T, Wiker GH, Rosenkrands I, Andersen P. **Evidence of occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG.** Infect Immun 1996;64:16-22.
50. Harboe M, Wiker HG. **The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review.** J Infect Dis 1992;166:874-884.
51. Haslov K, Andersen A, Nagai S, Gottschau A, Sorensen T, Andersen P. **Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*.** Infect Immun 1995;63:804-810.
52. Hernandez Pando R, Orozco H, Samperi A, Pavon L, Velasquillo C, *et al.* **Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis.** Immunology 1996;89:26-33.
53. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic'S. **Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model.** Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:13853-13858.
54. Horwitz MA, Harth G. **A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis.** Infect Immun 2003;71:1672-1679.

55. Howard AD, Zwilling BS. **Cytokine production by CD4 and CD8 T cells during the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice.** Clin Exp Immunol 1998;113:443-449.
56. Hussey GD, Watkins ML, Goddard EA, Gottschalk S, Hughes EJ, *et al.* **Neonatal mycobacterial specific cytotoxic T-lymphocyte and cytokine profiles in response to distinct BCG vaccination strategies.** Immunology 2002;105:314-324.
57. Jackson M, Phalen SW, Lagranderie M, Ensergueix D, Chavarot P, *et al.* **Persistence and protective efficacy of a *Mycobacterium tuberculosis* auxotroph vaccine.** Infect Immun 1999;67:2867-2873.
58. Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, Brioscole H, Brotton WJ. **Differential protective Efficacy of DNA Vaccines Expressing Secreted Proteins of *Mycobacterium tuberculosis*.** Infect Immun 1999;67:1702-1707.
59. Lagranderie M, Balazuc AM, Abolhassani M, Chavarot P, Nahori MA, *et al.* **Development of mixed Th1/Th2 type immune response and protection against *Mycobacterium tuberculosis* after rectal or subcutaneous immunization of newborn and adult mice with *Mycobacterium bovis* BCG.** Scand J Immunol 2002;55:293-303.
60. Lagranderie MA, Chavarot P, Balazuc AM, Marchal G. ***Mycobacterium bovis* BCG induces similar immune responses and protection by rectal and parenteral immunization routes.** Infect Immun 2000;68:5657-5662.
61. Lagranderie MRR, Balazuc AM, Deriaud E, Leclerc CD, Gheorghiu M. **Comparison of immune response of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains.** Infec Immun 1996;64:1-9.
62. Li H, Ulstrup JC, Jonassen TO, Melby K, Nagai S, Harboe M. **Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG.** Infect Immun 1993;61:1730-1734.
63. Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, *et al.* **A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes.** Clin Exp Immunol 2003;133:30-37.
64. Lopez-Vidal Y, de Leon-Rosales SP, Castanon-Arreola M, Rangel-Frausto MS, Melendez-Herrada E, Sada-Diaz E. **Response of IFN-gamma and IgG to ESAT-6 and 38 kDa recombinant proteins and their peptides from *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients and asymptomatic household contacts may indicate**



- possible early-stage infection in the latter.** Arch Med Res 2004;35(4):308-317.
65. Luo Y, Chen X, Han R, O'Donnell MA. **Recombinant bacille Calmette-Guerin (BCG) expressing human interferon-alpha 2B demonstrates enhanced immunogenicity.** Clin Exp Immunol 2001;123:264-270.
  66. Matsuo T, Matsumoto S, Ohara N, Kitaura H, Mizuno A, Yamada T. **Differential transcription of the MPB70 genes in two major groups of *Mycobacterium bovis* BCG substrains.** Microbiol 1995;141:1601-1607.
  67. McMurray DN. **A coordinated strategy for evaluating new vaccines for human and animal tuberculosis.** Tuberculosis 2001;81:141-146.
  68. McMurray DN. **Disease model: pulmonary tuberculosis.** Trends Mol Med 2001;7:135-137.
  69. Middlebrook G, Cohn, ML. **Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods.** Amer J Publ Hlth 1958;48:844-853.
  70. Moreira AL, Tsenova L, Aman MH, Bekker LG, Freeman S, et al. **Mycobacterial antigens exacerbate disease manifestations in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice.** Infect Immun 2002;70:2100-2107.
  71. Narayanan S. **Molecular epidemiology of tuberculosis.** Indian J Med Res 2004;120(4):233-247.
  72. Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, Haslov K, Andersen P. **Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree.** Tuber Lung Dis 1999;79:243-250.
  73. Ohara N, Yamada T. **Recombinant BCG vaccines.** Vaccine 2001;19:4089-4098.
  74. Okkels LM, Andersen P. **Protein-protein interactions of proteins from the ESAT-6 family of *Mycobacterium tuberculosis*.** J Bacteriol 2004;186(8):2487-2491
  75. Orme IM, Cooper AM. **Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis.** Immunol Today 1999;20:307-312.
  76. Osborn TW. **BCG vaccine: an investigation of colony morphology from four different strains after their introduction as seed for**



- vaccine preparation in four production laboratories.** J Biol Stand 1983;11:19-27.
77. Palendira U, Bean AG, Feng CG, Britton WJ. **Lymphocyte recruitment and protective efficacy against pulmonary mycobacterial infection are independent of the route of prior *Mycobacterium bovis* BCG immunization.** Infect Immun 2002;70:1410-1416.
78. Petricevich VL, Ueda C, Alves RC, da Silva MA, Moreno C, *et al.* **A single strain of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) grown in two different media evokes distinct humoral immune responses in mice.** Braz J Med Biol Res 2001;34:81-92.
79. **Phenotypes of BCG-vaccines seed lot strains: results of an international cooperative study.** International Union against Tuberculosis. Tubercle 1978;59:139-142.
80. Pollock MJ, Andersen P. **Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle.** Infect Immun 1997;65:2587-2592.
81. Pollock MJ, Andersen P. **The potential of ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria specific diagnosis of tuberculosis.** J Infect Dis 1997;175:1251-1254.
82. Ramalingam B, Uma DK, Swaminathan S, Raja A. **Isotype specific antibody response in childhood tuberculosis against purified 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*.** J Trop Pediatr 2002;48:188-199.
83. Rappuoli R. **Reverse vaccinology.** Curr Opin Microbiol 2000;3:445-450.
84. Rastogi N, McFadden JJ. **Mycobacteria and AIDS: epidemiological and genetic markers, virulence factors and interactions with the immune system.** Res Microbiol 1992;143:361-372.
85. Raviglione MC, Luelmo F. **Update on the global epidemiology of tuberculosis.** Curr Issues Public Health 1996;2(4):192-197.
86. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. **Global epidemiology of tuberculosis, morbidity and mortality of a worldwide epidemic.** JAMA 1995;273:220-226.
87. Ritacco V, Di Lonardo M, Reniero A, Ambroggi M, Barrera L, *et al.* **Nosocomial spread of HIV-related multidrug resistant tuberculosis in Buenos Aires.** J Infect Dis 1997;176:637-642.
-

88. Ross C., Raios K., Jackson K., Dwyer B. **Molecular cloning of a highly repeated element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool.** J Clin Microbiol 1992;30:942-946.
89. Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs Jr WR, Hopewell PC. **An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus: an analysis using restriction fragment length polymorphisms.** N Engl J Med 1992;326:231-235.
90. Small PM, Moss A. **Molecular epidemiology and the new tuberculosis.** Infect. Agents Dis 1993;2:132-138.
91. Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, Singh SP, *et al.* **Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection.** N Engl J Med 1993;328:1137-1144.
92. Smith D, Wiegshaus E, Balasubramanian V. **Animal models for experimental tuberculosis.** Clin Infect Dis 2000;31(Suppl 3):S68-S70.
93. Sorensen LA, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen BA. **Purification and characterization of a low molecular mass T cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*.** Infect Immun 1995;63:1710-1717.
94. Thoen CO, Karlson AG and Himes EM. **Mycobacterial infections in animals.** Rev Infect Dis. 1981;3(5):960-972.
95. Torres A, Juarez MD, Cervantes R, Espitia C. **Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1).** Microb Pathog 2001;30(5):289-297.
96. **Tuberculosis drug resistance: summary report for 2003.** Can Commun Dis Rep 2004;30(10):93-95.
97. Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ, Narayanan PR, Raja A. **Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* 38kDa antigen in pulmonary tuberculosis.** Tuberculosis 2001;81:249-253.
98. Van Embden JDA, van Soolingen D, Small PM, Hermans PWM. **Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis.** Res Microbiol 1992;143:385-391.



99. Van Soolingen D, Haas PEW de, Hermans PMA, Groenen MA, van Embden JDA. **Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis***. J Clin Microbiol 1993;31:1987-1995.
  100. Van Soolingen D, Haas PEW, Hermans PWM, van Embden J. **DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis***. Methods Enzymol 1993;235:196-205.
  101. Van Soolingen D, Hermans PWM, Haas PEW de, Soll DR, van Embden J. **Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis**. J Clin Microbiol 1991;29:2578-2586.
  102. Van Soolingen D, Qian L, Haas PEW de, Douglas JT, Traore H, et al. **Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia**. J Clin Microbiol 1995;33:3234-3238.
  103. Velarde VH, Rossier ML, Salazar AM, et al. **El control de la tuberculosis en la República Mexicana**. Neumología y Cirugía de Tórax 1995;54(1):13-20.
  104. Vincent V. **Taxonomie des mycobactéries**. Revue fran Vaise des laboratoires 1995;27-32.
  105. Vincent V, Levy-Frébault and Portaels F. **Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species**. Int J Syst Bacteriol 1992;42:315-323.
  106. Vordermeier HM, Harris DP, Friscia G, Roman E, Surcel HM, et al. **T cell repertoire in tuberculosis: selective anergy to an immunodominant epitope of the 38-kDa antigen in patients with active disease**. Eur J Immunol 1992;22:2631-2637.
  107. Vordermeier MH, Harris PD, Roman E, Lathigra R, Moreno C, Ivanyi J. **Identification of T cell stimulatory peptides from the 38kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis***. J Immunol 1991;147:1023-1029.
  108. Wards BJ, de Lisle GW, Collins DM. **An *esat6* knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine**. Tuber Lung Dis 2000;80:185-189.
  109. Weinrich Olsen A, van Pinxteren LA, Meng Okkels L, Birk Rasmussen P, Andersen P. **Protection of mice with a tuberculosis subunit**
-

**vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and ESAT-6.** Infect Immun 2001;69:2773-2778.

110. WHO Global Tuberculosis Control Programme. **Anti-tuberculosis drug resistance in the world.** The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1994-1997. WHO/TB/97.229.WHO, Geneva, 1997.
111. WHO Global Tuberculosis Control Programme. **Groups at risk, WHO report on the tuberculosis epidemic.** 1996, pp 1-28.
112. Wilkinson JR, Haslow K, Rappuoli R, Giovannoni F, *et al.* **Evaluation of the recombinant 38-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential immunodiagnostic reagent.** J Clin Microbiol 1997;35:553-557.
113. Wu-Hsieh BA, Chen CK, Chang JH, Lai SY, Wu CH, *et al.* **Long-lived immune response to early secretory antigenic target 6 in individuals who had recovered from tuberculosis.** Clin Infect Dis 2001;33:1336-1340.
114. Young S, O'Donnell M, Lockhart E, Buddle B, Slobbe L, *et al.* **Manipulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* by vaccination with IL-2- and IL-18-secreting recombinant bacillus Calmette Guerin.** Immunol Cell Biol 2002;80:209-215.





## A new vaccine against tuberculosis shows greater protection in a mouse model with progressive pulmonary tuberculosis

Mauricio Castañon-Arreola<sup>a</sup>, Yolanda López-Vidal<sup>a,\*</sup>,  
Clara Espitia-Pinzón<sup>b</sup>, Rogelio Hernández-Pando<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México

<sup>b</sup>Department of Immunology, Biomedical Research Institute, Universidad Nacional Autónoma de México, México

<sup>c</sup>Experimental Pathology Section, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition 'Salvador Zubirán', México

Received 22 October 2004; accepted 22 October 2004

### KEYWORDS

BCG;  
Tuberculosis;  
38 kDa;  
Cytokines;  
Beijing;  
Survival

**Summary** *Setting:* The effectiveness of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccination in reducing tuberculosis (TB) prevalence rates is poor, resulting in urgent need for improved immunization programs, with new and more effective vaccines against TB.

*Objective:* To develop a recombinant Tice BCG vaccine against TB that overexpresses the 38-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in order to protect against infection by *M. tuberculosis* H37Rv and hyper-virulent *M. tuberculosis* Beijing genotype.

*Design:* *M. tuberculosis* 38-kDa protein was cloned into a mycobacterial shuttle plasmid, which was used to overexpress the 38 kDa protein in BCG Tice to produce the recombinant vaccine, rBCG38 Tice (rBCG38).

*Results:* Compared with BCG Tice, which conferred little protection against the Beijing strain of *M. tuberculosis*, vaccination with the rBCG38 increased survival of mice infected with either *M. tuberculosis* H37Rv or a Beijing strain of *M. tuberculosis*, isolate 9501000.

Vaccination with either BCG Tice or rBCG38 resulted in enhanced protection against mycobacterial growth in lung tissue by reducing the number of colony-forming units (CFU). The vaccine induced a strong and highly significant Th1 response, shown by the high level of IL-2 and IFN- $\gamma$  cytokine producer cells found in the lungs of challenged mice, and an increase in the IgG2a:IgG1 ratio found in the pooled sera of the vaccinated mice.

\*Corresponding author. Tel./fax: +52 5556 160844.

E-mail address: [lvidal@servidor.unam.mx](mailto:lvidal@servidor.unam.mx) (Y. López-Vidal).

**Conclusions:** This study showed that rBCG38 vaccine induced a strong Th1 response, demonstrated by the high levels of IL-2 and IFN- $\gamma$  producer cells and IgG2a. Protection was mediated for as long as 6 and 4 months after challenge with *M. tuberculosis* H37Rv and Beijing genotypes, respectively.  
© 2004 Published by Elsevier Ltd.

## Introduction

Tuberculosis (TB) was the first disease to be declared a global emergency by the World Health Organization (WHO). It is an infectious disease in humans caused by members of the TB-complex, namely *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis* and *M. microti*. Human TB continues to be a major worldwide health problem, and is the leading killer of youths and adults in developing countries, causing about 3 million deaths each year.<sup>1</sup> The HIV epidemic and multi-drug-resistant strains of *M. tuberculosis* (MDRTB) have contributed to the resurgence of TB. The risk of developing TB has increased for HIV-positive patients, and TB enhances the progression of HIV infection to full-blown AIDS.<sup>2-4</sup>

*M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) is the only live bacterial vaccine in use that has shown no major side-effects. This vaccine has been given to more than 2 billion people worldwide, and has been shown to offer long-lasting immunity.<sup>5,6</sup>

In several clinical BCG vaccination trials in humans from different regions of the world, protection varied widely, ranging from 0–80%. In parts of the world where the disease is most widespread, BCG vaccination is ineffective against adult pulmonary TB and, therefore, the search for novel, more effective vaccines is a high priority.<sup>6,7</sup>

The 38-kDa protein in *M. tuberculosis* is a glycoprotein actively secreted by the bacteria. This protein has been identified as an important antigen, and was the first to be proposed as a candidate for new vaccine development.<sup>8</sup> This antigen contains specific T- and B-cell epitopes recognized in mice and people with TB. Vordermeier et al.<sup>9</sup> described the most important Th1 epitope, identified as peptide 38G and corresponding to residues 356–369. In people with TB, this peptide did not induce a proliferative T-cell response.<sup>10-12</sup>

Immunization with this antigen induces a triggered cellular immune response, which may be important for vaccine protection against TB. In past studies, a more well-defined cytokine profile, with higher production of IFN- $\gamma$  by mononuclear cells, was demonstrated in household contacts compared with the response of patients with TB.<sup>8,13-15</sup>

This antigen is also widely expressed by atypical mycobacteria. In non-vaccinated people from Malawi (an endemic geographic region for TB), who tested negative to purified protein derivative, response to this antigen increased, inducing IFN- $\gamma$  secretion in proliferative assays.<sup>16</sup> Interestingly, in all BCG substrains, a 10-fold decrease in the expression of the 38 kDa antigen was seen by immunoblotting assay.<sup>8</sup>

Recently, Horwitz et al.<sup>17,18</sup> reported an enhanced protective response in highly susceptible guinea pigs with pulmonary TB challenged with virulent *M. tuberculosis* after vaccination with recombinant Tice BCG that secreted the 30-kDa antigen of *M. tuberculosis*. Survival rates among these animals increased, and CFU decreased in their lungs and spleen. However, the investigators gave no consideration to the type of immune response induced by this vaccine.

In the current study, the protective efficacy of a BCG Tice recombinant vaccine with the immunodominant 38-kDa antigen of *M. tuberculosis*, designed as rBCG38, was evaluated in terms of survival rates, delayed-type hypersensitivity response, bacterial-load reduction in the lungs, percentage of lung area affected by pneumonia, level of IgG1 and IgG2a antibody-isotype-specific response to purified antigen or *M. tuberculosis* H37Rv cell lysates, T-cell subpopulation in the lungs, and cytokine profile. A well-characterized mouse model of pulmonary TB was challenged with *M. tuberculosis* H37Rv as the reference strain, and by a highly virulent isolate belonging to the Beijing genotype.

## Materials and methods

### Bacterial strains

*M. bovis* BCG Tice strain was kindly provided by Dr. Marcel A. Behr from Montreal General Hospital, Division of Infectious Diseases and Medical Microbiology, McGill University, Montreal, Canada. Two strains were used for infection assays: *M. tuberculosis* H37Rv reference strain and *M. tuberculosis* Beijing genotype isolate 95,1000. The bacteria was



grown to early mid-log phase in Middlebrook 7H9 medium (Difco, Detroit, Mich.) supplemented with albumin-dextrose-catalase (BBL, Cockeysville, Md.) and 0.05% Tween 80 (Sigma, St. Louis, USA). Cultures were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and continuously shaken. Micro-organisms were harvested by centrifugation at 5000 × g, washed three times in phosphate buffer saline (PBS) and stored at -70 °C in tubes containing 10<sup>7</sup> bacteria/ml<sup>-1</sup> until use. For vaccination and challenge, strains were thawed at 37 °C and diluted in phosphate PBS to a final concentration of 10<sup>6</sup> CFU/ml. Fluorescence microscopy (5 µg/ml of fluorescent diacetate stain) was used to investigate bacterial counts and viability in a Neubauer chamber. The CFU were determined by serial dilution plating, with each suspension of each strain being diluted in Middlebrook 7H10 agar plates supplemented with 2 oxo-acid dehydrogenase complex.

#### Animals used for the study

Specific pathogen-free BALB/c male mice were obtained from the National Institute of Medical and Nutritional Sciences, Mexico City, Mexico. The mice were 6–8 weeks old at the time of vaccination. They were maintained under barrier conditions in a level III biohazard laboratory. The protocol was approved by the Ethical Committee for Experimentation in Animals of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition in Mexico.

#### Construction of recombinant *Bacillus Calmette-Guérin*

The *M. tuberculosis* 38-kDa gene sequence was cloned in a PMV261 shuttle plasmid, such that the 38 kDa protein was expressed under the control of an *hsp60* promoter. The recombinant plasmid was transformed into *M. bovis* BCG Tice by electroporation, and recombinant cells (rBCG38) were selected on Middlebrook agar plates containing 30 µg/ml of kanamycin. After 21 days growth at 37 °C, individual colonies were picked and grown in Middlebrook 7H9 medium, supplemented with ADC and containing 30 µg/ml of kanamycin. Recombinant rBCG38 colonies were confirmed by isolation and characterization of plasmid DNA from the recombinant cells.

#### Determination of 38 kDa protein expression

A competition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out to determine the amount of

38-kDa antigen expressed by BCG Tice and rBCG38. BCG Tice and Tice rBCG38 were grown in Middlebrook 7H9 medium, supplemented with 10% of albumin-dextrose-catalase for 14 days. The bacterial cells were harvested by centrifugation at 5000 × g for 15 min, and adjusted to an optical density 0.4 at 590 nm. Then, bacteria were sonicated at 24 kHz for 1 min/15 times at 4 °C [VibraCell, Sonics, USA], and the bacterial cell lysates were tested by competitive ELISA using MTB12 MAb against recombinant 38 kDa protein. Briefly, microplates were coated with 5 µg of recombinant 38-kDa antigen (for safety considerations *M. tuberculosis* strains not were included in this study), and kept overnight at 4 °C. Non-specific binding sites were blocked by 1% albumin free of gamma globulins (Gibco, BRL) diluted in PBS containing 0.05% Tween 20. Then, 30, 50, 20 µg of protein of each bacterial lysate were incubated in competition with MTB12 MAb at 1:125 dilution, for 1 h at 37 °C with continuous shaking. Then, 5x microplates were washed with PBS-Tween-20 at 0.05%. Horse-radish peroxidase or alkaline phosphate conjugated goat anti-mouse IgG1 or IgG2a (Dako Corporation, Carpinteria, California) antibody were used at 1:1000 dilution, and color was developed using diaminobenzidine as the substrate. The microplates were read at 492 nm on STL-RainBow (STL Labinstruments, Austria) reader, and optical density was expressed as reciprocal values to non-inhibition wells. At the same time, an inhibition curve using r38-kDa protein was carried out to determine the concentration of this antigen in the bacterial lysed.

#### Vaccination of mice

A frozen sample of Tice BCG or rBCG38 strains were thawed and diluted in 0.05% Tween 80 in PBS to give 10<sup>4</sup> of CFU per dose, which was used to vaccinate groups of 10 BALB/c mice subcutaneously.

#### Experimental mouse model of pulmonary tuberculosis

##### Mice infection

A pulmonary TB mouse model was used as previously described, but with some modifications.<sup>19,20</sup> Briefly, BALB/c mice aged 6–8 weeks were vaccinated with 10<sup>4</sup> CFU BCG or rBCG38. Two months later, using an intraperitoneal anesthetic

with pentotal (56 mg/kg), a mid-incision was made to separate the muscles until the trachea was exposed. Intratracheal challenge was carried out using  $2.5 \times 10^5$  CFU of *M. tuberculosis* H37Rv or *M. tuberculosis* isolate 950 1000. The incision was then sutured using sterile silk. The mice were kept in a vertical position in isolation boxes until their recovery. Groups of mice ( $n = 10$ ) were sacrificed on day 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 and 120 after challenge. The mice were anesthetized with ether and then sacrificed. Blood was collected and serum obtained by centrifugation and stored frozen at  $-70^\circ\text{C}$  until use. After extraction, one of the lungs was frozen for subsequent determination of bacterial load, whereas the other was infused with absolute ethanol and subsequently used for histological preparations as described below.

### Delayed-type hypersensitivity

Delayed-type hypersensitivity (DTH) responses of immunized BALB/c mice were tested at selected times after challenge as described previously.<sup>21</sup> Briefly, antigens consisting of soluble culture filtrate proteins from *M. tuberculosis* H37Rv were cultivated in the Proskauer-Beck-Youmans medium over 5–6 weeks. Four mice from each vaccinated and control group were randomly selected and injected with 20  $\mu\text{l}$  (20  $\mu\text{g}$ ) of mycobacterial antigen into one footpad. The DTH reaction was measured according to the thickness of the plantar bearing of the mouse before antigen injection, and 24 h afterwards using a Matotuyo micrometer.

### Bacterial loads in the lung

Bacterial multiplication of *M. tuberculosis* H37Rv or *M. tuberculosis* isolate 950 1000 in non-vaccinated mice and in mice vaccinated with BCG Tice or rBCG38 was determined on day 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 120 after challenge. Lungs were homogenized with Polytron (Brinkmann Instruments, Rexteid, Can) in 3 ml of isotonic salt solution containing 0.05% Tween 80 (Sigma, St. Louis, USA) until the tissues were disrupted. CFU were counted by plating 10  $\mu\text{l}$  of 10-fold serial dilutions of the homogenates onto Middlebrook 7H10 nutrient agar. To distinguish bacterial clumps from single cells, colonies were incubated at  $37^\circ\text{C}$  and counted under dissection microscope (Carl Zeiss, Germany) after 10 days and 3 weeks. The data were representative of two experiments, and were expressed as the mean value of CFU counted.

### Histological analysis of lung pathology

Mice used for histological analysis were randomly selected. The lungs were separated, and one of them was infused with absolute ethanol for a minimum of 24 h, embedded in paraffin wax, and then sectioned for light microscopy as described previously.<sup>21</sup> Sections were stained with hematoxylin and eosin, and examined under a Leica DM LS microscope (Leica Microsystem, Wetzlar, GmbA, Germany) using Leica Q-win system software (Leica microsystem Imaging solutions Ltd, Cambridge, UK). A reading was made for each lung to establish the presence and distribution of pneumonia and granulomas as described previously.<sup>21</sup>

### Antibodies and flow-cytometry analysis

To assess the T-cell sub-population ratio in the lungs of mice vaccinated and challenged with *M. tuberculosis* H37Rv and *M. tuberculosis* isolate 950, 1000, lymphocytes were obtained from the lungs and stained with surface marker rat anti-mouse monoclonal antibodies from Pharmingen (BD Bioscience): CD8a (Ly 2) fluorescein isothiocyanate conjugated (FITC) clone 56-6.7, CD4 (L3T4) R-phycoerythrin (R-PE) clone RM4-5. The IFN- $\gamma$  FITC clone, XMG1.2, IL-4 R-PE clone, BVD4-1D11, and IL-2-R-PE clone, IL-10 allophycocyanin clone JES5-16E3, were used for intracellular cytokine staining.

After surface or intracellular labeling, cells and cytokine-producing cells were discriminated according to the specificity of the excitation and emission wavelengths of fluorophores used. Data were acquired on a flow cytometer FACS Epics Altra, and analyzed using Expo 2.0 software (Coulter, CA, USA). A lymphocyte gate was set to exclude debris, monocytes and macrophages. To determine lymphocyte percentage, 10,000 counts were measured for each lung in duplicate.

### Cell-surface markers

Lung cells were obtained from mice at 2 months after challenge with the *M. tuberculosis* isolate 950 1000 or 4 months after challenge in the case of the *M. tuberculosis* H37Rv strain. Lymphocyte purification was carried out after obtaining single-cell suspension. Lungs of infected mice were infused with RPMI-1640 culture media, and supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum, containing brefeldin A at 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , collagenase type IV 0.5 U/ml (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), and 0.025% DNase I. Then, lung tissue was cut into small pieces ( $<3\text{mm}$ ) and placed on the above



mentioned solution for 1 h at 37 °C with vigorous shaking. The resulting solution was separated on a Ficoll-Hypaque (Histoprep, Sigma, St Louis, USA) gradient, washed twice with PBS and adjusted to  $1 \times 10^7$  cell/ml diluted in PBS. Mononuclear cells were stained for cell-surface markers using monoclonal antibodies against CD8 (Becton & Dickinson, New Jersey, USA) and CD4 (Becton & Dickinson, New Jersey, USA) in PBS for 30 min at 4 °C according to manufacturer recommendations, and fixed with 4% para-formaldehyde for 16 h, before being analyzed by fluorescence-activated cell sorter using Expo Altra v.2 software (Beckman Coulter System, California, USA). Cells were gated on the lymphocyte population by size and forward side scatter. To determine the percentage of lymphocytes present, a total of 10,000 duplicate counts were measured for each sample.

### Intracellular staining

Single-cell lung suspensions were prepared as described above. Cells were washed twice and diluted in RPMI 1640 media, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 1% antibiotic and anti-mycotic solution (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) containing 3 µg/ml of Berfeldin A (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), incubated for 16 h and then treated with citofix/citoperm (BD Bioscience, NJ, USA) solution to fix and permeabilize lymphocytes, after which they were washed with cytoperm and wash solution. Finally, the cell suspension was incubated with monoclonal antibodies against IL-2 R-PE, IL-4 R-PE, IL-10 APC and IFN-γ FITC at 4 °C for 30 min. After intracellular staining, the cells were washed twice in PBS, and fixed with PBS containing 4% para-formaldehyde. Preserved cells were stored in the dark at 4 °C for 16 h before analysis.

### IgG1 and IgG2a enzyme-linked immunosorbent assay

Pooled sera from four mice per group were tested by indirect ELISA to determine IgG1 or IgG2a titers against *M. tuberculosis* cell extract and 38-kDa recombinant protein. IgG1 and IgG2a antibody titers from BCG or rBCG38 vaccinated mice, and mice challenged with *M. tuberculosis* H37Rv or Beijing genotype, were measured in 96 well microplates coated with 2 µg of *M. tuberculosis* H37Rv cell extract or 1 µg of recombinant 38-kDa protein (kindly provided by Dr. Mahavir Singh, from Lionex diagnostics and Therapeutics, GmbH, Braunschweig, Germany) per well. Reactions were carried out using pooled sera at a five-fold dilution

in PBS and then, those that developed goat anti-mouse IgG1 or IgG2a (ZYMED, Laboratories, San Francisco, California, USA) were conjugated with alkaline phosphate and horse-radish peroxidase, respectively, at a dilution of 1:1000. After 20 min, the microplates were read at 492 nm for IgG1 and 450 nm for IgG2a in an SLT-Rainbows reader (SLT Lab instruments, Austria).

### Statistical analysis

The SPSS 11.0 software program (lead technologies, Ltd, UK) was used to carry out statistical analysis. The one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the existing differences in the percentage of histological damage with the growth of *M. tuberculosis*. For punctual significance at days of sacrifice, Chi-square was used.

## Results

### Vaccine construction

A shuttle plasmid expressing the 38 kDa gene from *M. tuberculosis* H37Rv under the control of the mycobacterial *hsp60* promoter was used to over-express the 38 kDa protein in *M. bovis* BCG Tice. After electrophoration of BCG Tice with the recombinant shuttle plasmid PMV261-38-kDa, transformant colonies showed a normal morphology. Plasmid extraction gave an approximate product size of 5900 bp. To confirm 38-kDa expression in the recombinant strain, cell extracts were obtained from BCG Tice and rBCG38. The 38 kDa protein was determined in cell extracts using ELISA, which showed that the rBCG38 vaccine expressed three times more 38-kDa protein compared with the homologous non-transfected strain.

### Survival of mice after challenge

All of the mice challenged with  $2.5 \times 10^5$  CFU *M. tuberculosis* H37Rv survived throughout the 4-month study period. Mice that were not vaccinated and challenged with *M. tuberculosis* isolate 950,1000 (Beijing genotype) died between days 28 and 60. Similarly, all mice in the group vaccinated with BCG Tice and challenged with *M. tuberculosis* isolate 950,1000 were also dead 60 days after challenge. In contrast, rBCG38 vaccinated mice survived up to day 120 after infection, a result that was statistically significant ( $p < 0.05$ ). The mice were not monitored past day 120.

### Delayed-type hypersensitivity response in mice infected with *M. tuberculosis*

DTH responses were determined in BCG and rBCG38 vaccinated groups and compared with non-vaccinated mice. The strongest DTH responses were observed in the groups of vaccinated mice. Moreover, the DTH response was first observed in rBCG38 vaccinated mice on day 14 for *M. tuberculosis* H37Rv infection and on day 7 for the mice challenged with the Beijing genotype. In BCG vaccinated mice, the DTH response was observed on day 21 for Beijing genotype-infected mice. Interestingly, by day 120, no difference in DTH response was observed between the BCG vaccinated mice and non-vaccinated groups infected with *M. tuberculosis* H37Rv.

### Colony-forming units in lungs of infected mice

After 21 days, BCG and rBCG38 vaccinated mice showed a 1 log reduction of *M. tuberculosis* H37Rv and 950,1000 compared with unvaccinated controls, with a statistical significance of  $p < 0.05$ . For *M. tuberculosis*, H37Rv infected mice, vaccinated with either BCG or rBCG38, CFU decreased after day 21 (Fig. 1). When comparing the number of CFU between the different vaccinated mice, the BCG Tice vaccinated group showed double the number of CFU at day 120 compared with that of the rBCG38 vaccinated mice. Comparison between bacterial loads in BCG and rBCG38 vaccinated mice showed 0.5 log more CFU in the rBCG38 vaccinated group at day 28; at day 60 no difference was observed between the two groups and, by day 120,

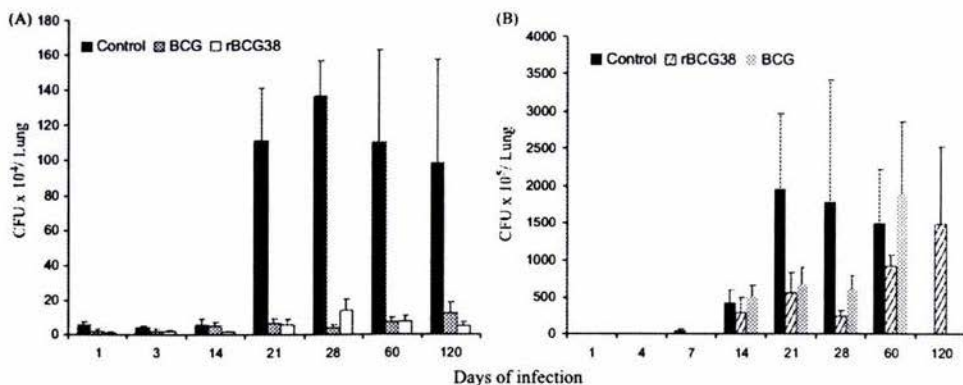
the BCG Tice vaccinated group had a 0.4 higher log of CFU than the rBCG38 group. When studying the results of mice challenged with *M. tuberculosis* isolate 950,1000, naive mice showed an exponential growth of mycobacteria between days 7 and 28, with the highest mortality due to increased CFU seen by day 60 (Fig. 1).

Four weeks after challenge with *M. tuberculosis* isolate 950,1000, mice vaccinated with either BCG or rBCG38 showed a statistically significant reduction in CFU compared with non-immunized mice ( $p < 0.05$ ). After 28 days, mice vaccinated with rBCG38 reduced their CFU by  $9.32 \times 10^7$  compared with a reduction of CFU in Tice BCG vaccinated mice of  $18.9 \times 10^7$ . By day 60, the difference in CFU between the vaccinated mice groups was not statistically significant. Groups vaccinated with rBCG38 survived 2 months longer than non-vaccinated mice or mice vaccinated with BCG Tice, producing a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

### Histological findings

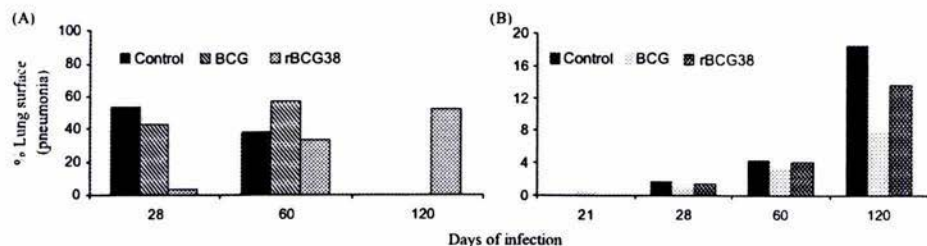
The presence of consolidated pneumonia was observed in all mice from day 28. However, comparisons using ANOVA multivariate analysis resulted in statistically significant differences (Fig. 2).

Histopathologically, vaccinated mice showed a decrease in CFU. Those mice challenged with *M. tuberculosis* H37Rv did not show any significant differences in pneumonic tissue between days 28 and 60, with the area being below 5%. The difference in pneumonic area was not observed until day 120, when 7.85% of pneumonia was observed in BCG-vaccinated mice compared with

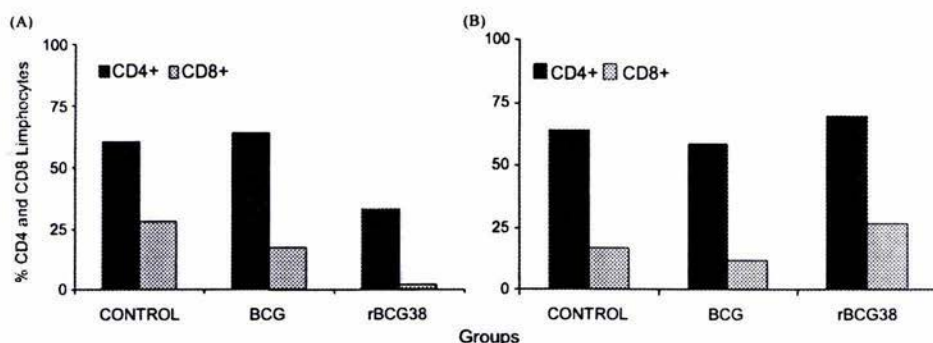


**Figure 1** Colony-forming units in lung homogenates during the course of infection with *M. tuberculosis* H37Rv (A) and *M. tuberculosis* 9501000 (Beijing genotype) (B) strains.





**Figure 2** Percentage of pneumonic areas observed in lung sections of vaccinated and unvaccinated mice. Two months after vaccination with either BCG Tice or rBCG38, mice were challenge with (A) *M. tuberculosis* strain 9501000 (Beijing genotype) or (B) *M. tuberculosis* H37Rv.



**Figure 3** Ratio of CD4+ and CD8+ T-cells in the monocyte infiltrate in lungs of unvaccinated mice or mice vaccinated with either BCG Tice or rBCG38 and challenge with (A) *M. tuberculosis* H37Rv and (B) *M. tuberculosis* strain 9501000 (Beijing genotype).

13.67% in rBCG38 vaccinated mice, and 18.57% in non-vaccinated mice.

In mice challenged with *M. tuberculosis* Beijing genotype, evidence of pneumonia consolidation and cellular aggregates with intense lymphocyte infiltrate was more intense than in mice infected with the H37Rv strain. In non-vaccinated mice, pneumonia was seen in 54% of lung tissue after day 28. In contrast, the rBCG38-vaccinated group showed a pneumonic area of only 3.76% at this time point. At day 60, mice in the non-vaccinated group had all died, whereas mice in the BCG38-vaccinated group showed a pneumonic area of 33.7% and BCG vaccinated mice an area of 57.3%. Finally, the rBCG38 vaccinated mice stayed alive until day 120, at which point they were sacrificed. At this time, the lungs of these animals showed 52.26% of pneumonia characterized by the presence of macrophages, multinuclear giant cells and lymphocytes. Also, the presence of granulomas was more frequent in this group compared with the non-vaccinated group (data not showed). In

BCG-vaccinated mice, granulomas were seen surrounded by extensive pneumonic areas.

### Cellular responses

Mononuclear cells isolated from lungs of challenged mice were characterized by monoclonal antibodies against surface markers labeled with specific fluorochromes and analyzed by flow cytometry. Fig. 3 shows the distribution of lymphocyte subsets at 4 months after *M. tuberculosis* H37Rv infection, and 2 months after challenge with *M. tuberculosis* isolate 950,1000.

The percentage of cytotoxic response mediated by CD8+ T cells determined in mice challenged with *M. tuberculosis* Beijing, and vaccinated with r38BCG, was 26.7% on day 60. For non-vaccinated mice challenged with *M. tuberculosis* H37Rv, the response was 28% on day 120. In mice vaccinated with rBCG38 and then challenged with

*M. tuberculosis* isolate 950,1000, the cytotoxic response mediated by CD8<sup>+</sup> T cells was 2.2%.

### Intracellular cytokine profile

In the natural setting, cytokine production by mononuclear cells is a characteristic indicator of the type of immune response that is developed to control disease after *M. tuberculosis* infection. In order to assess the immunological responses to disease by BCG and rBCG38 vaccination, the percentage of IL-2 and IFN- $\gamma$ -producing cells for Th1 response and IL-4 and IL-10-producing cells as indicators of Th2 response were measured at 4 months after H37Rv infection, and at 2 months after Beijing genotype infection. The times were selected according to survival rates obtained in each case.

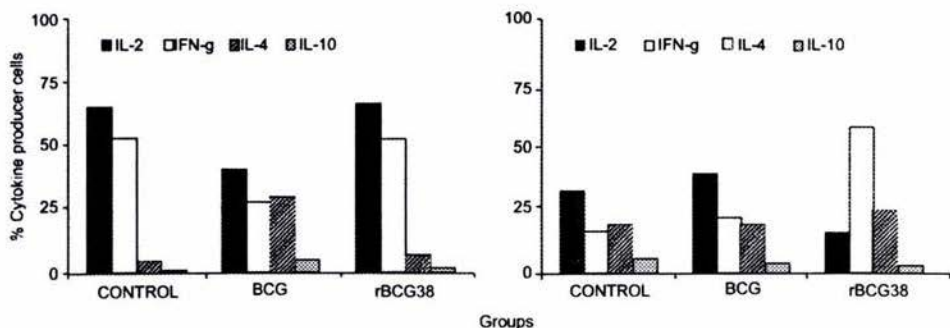
Mice vaccinated with rBCG38 showed a 52.4% increase in IFN- $\gamma$  producer cells, compared with a 27.5% increase in the BCG-vaccinated group. For Th2 cytokine-producing cells, 29.8% of IL-4 producing cells were observed in the BCG-vaccinated group challenged with *M. tuberculosis* H37Rv. A total of 66.4% and 65.1% of cells stained positive for IFN- $\gamma$  in the rBCG38 vaccinated and unvaccinated mice challenged with *M. tuberculosis* H37Rv, respectively, and 52% of each group were positive for IL-2-producing cells (Fig. 4(A) and (B)). However, only 25% IL-2 and 22% IFN- $\gamma$ -producing cells were observed in the mice vaccinated with BCG Tice. Moreover, the BCG Tice vaccinated mice showed a four-fold increase in the number of IL-4-producing cells compared with those for rBCG38 mice and a 5.9-fold increase over that observed in the non-vaccinated mice.

Cytokine profiles from mice challenged with *M. tuberculosis* Beijing genotype showed an increase in IL-2-producing cells of 40.1% and 16.2%

compared with the BCG Tice and non-vaccinated groups, respectively. The highest level of IFN- $\gamma$ -producing cells (60.9%) was seen in rBCG38 vaccinated mice, followed by 40.9% in BCG38 vaccinated animals and 16.9% in the control group. All the mice challenged with *M. tuberculosis* isolate 950,1000 displayed a mixed Th1/Th2 cytokine profile. In the rBCG38 vaccinated group, the number of infiltrate T-cells was one-half of those obtained in the control and BCG vaccinated groups. This was characterized by the presence of IL-2 and IFN- $\gamma$ -producer cells, giving rise to the highest Th1 environment.

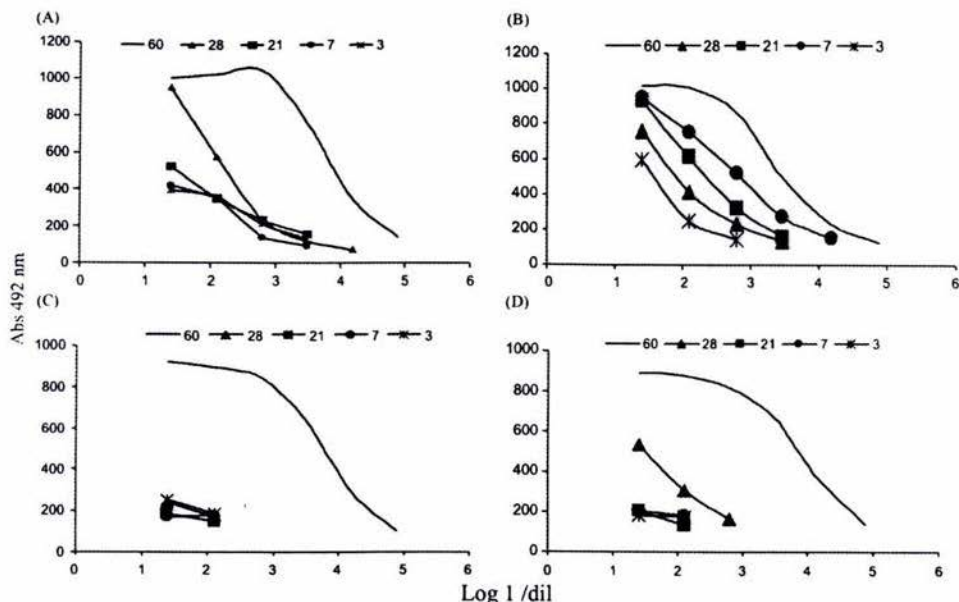
### Humoral response

Pooled serum from groups of mice challenged with either *M. tuberculosis* H37Rv or with *M. tuberculosis* isolate 950,1000 were tested for IgG2a and IgG1-specific responses to the 38 kDa protein. In general, vaccinated mice showed a similar ELISA titre for IgG1 antibodies against *M. tuberculosis* H37Rv cell lysates at day 120 for *M. tuberculosis* H37Rv infected mice and at day 60 in mice infected with *M. tuberculosis* Beijing genotype. In contrast, the results obtained in response to purified 38 kDa antigen were not uniform among the vaccinated groups. The ELISA titre for IgG2a antibodies against r38-kDa displayed higher production at day 28 (Fig. 5(D)). The response to mycobacterial antigens were marked by a substantial decrease in IgG1 ELISA titres between days 7 and 60, whereas the non-vaccinated group elicited an ELISA titre for IgG1 of only 1/10,000 (Fig. 5(B)). This same group showed ELISA titre levels for IgG2a of 1/79 by day 28, which correlated with the responses and control of mycobacterial growth observed in the DTH and CFU loads, respectively.



**Figure 4** Cytokine profile in the monocyte infiltrate in lungs of unvaccinated mice or mice vaccinated with either BCG Tice or rBCG38 and challenge with (A) *M. tuberculosis* H37Rv and (B) *M. tuberculosis* strain 9501000 (Beijing genotype).





**Figure 5** Comparison of IgG1 and IgG2a titer against *M. tuberculosis* H37Rv cell extracts and 38-kDa recombinant protein by ELISA in mice challenged with *M. tuberculosis* Beijing genotype. IgG1 titers against *M. tuberculosis* H37Rv cell extract in (A) unvaccinated and (B) rbcg vaccinated mice. Panels (C) and (D) show IgG2a titers against r38kDa protein in mice vaccinated with BCG and rBCG, respectively.

## Discussion

The global re-emergence of TB, and the increased incidence of disease caused by multidrug resistant strains, have resulted in a renewed need for TB vaccine development. The results of this study provide evidence of a recombinant BCG vaccine that overexpresses the 38-kDa protein of *M. tuberculosis* (a phosphate transporter belonging to the super family of ABC transporters), can confer increased survival to challenge from a highly virulent Beijing strain of *M. tuberculosis* compared with that conferred by BCG Tice. This protection was associated with induction of a Th 1 cytokine profile, as immune responses induced by rBCG38 vaccination were characterized by IFN- $\gamma$  production and increased IgG2a antibody response against the 38-kDa protein. These data support the use of the BCG vaccine as a vehicle to overproduce immunogenic antigens of *M. tuberculosis*.

After the introduction of *M. bovis* BCG for immunization programmes against TB, the first randomized clinical trial provided protective efficacy data worldwide but, in some cases, contradictory results gave an efficacy range between 0

and 80%.<sup>5,6</sup> After the WHO's declaration of TB as the first world emergency caused by a re-emerging infectious disease in 1993, several laboratories have focused their efforts in developing a new vaccine against TB with improved protective efficacy.

A number of BCG sub-strains have been used as vehicles to express immunodominant antigens or cytokines, and have given protective efficacies greater or equal to BCG alone. The 38-kDa protein has been proposed as a promising candidate for new vaccine development or as a part of a sub-unit vaccine. Several studies have shown 38-kDa to be an immunodominant antigen recognized by memory T cells of TB patients and household contacts, inducing the release of IFN- $\gamma$ .<sup>8,14,15</sup> The 38-kDa antigen is present in all BCG vaccine sub-strains, and homologous proteins have been found in atypical mycobacteria. However, the expression of the 38 kDa antigen in BCG vaccines is several times lower than in *M. tuberculosis*.<sup>8,16</sup> Recently, Horwitz et al.<sup>17,18</sup> constructed a new recombinant Tice BCG that expresses five times more 30-kDa antigen. This strain was found to induce enhanced protective efficacy against infection by the Erdman strain of

*M. tuberculosis* in mouse and guinea-pig models of pulmonary tuberculosis.

The use of animal models that mimic TB disease is fundamental to evaluating the activity of a particular vaccine. The use of different animal models to measure the potency of old and new vaccines against TB revealed discrepancies in the efficacy of vaccines in terms of measuring potency and interpreting immune response.<sup>22</sup> To optimize the animal models used to assess vaccine efficacy against TB, the models need to standardized vaccination route, vaccination dose, time and number of immunizations, the interval between the last immunization and infection, the route of challenge, the challenge dose and the strain used for challenge.<sup>23,24</sup> Recently, Lopez et al.<sup>25</sup> demonstrated that representative isolates of the genotypes of *M. tuberculosis* observed around the world produce different survival rates in mouse models of pulmonary TB, reflecting the particular characteristics of each strain to infect and grow in mice. Dormans et al.<sup>21</sup> have also reported similar observations. This research highlights the need to test the protective efficacy of newly developed vaccines against infection by *M. tuberculosis* reference strains and extant human isolates in animal models.

As reported by Lopez et al.,<sup>25</sup> BCG vaccination was incapable of protecting mice against infection by the *M. tuberculosis* Beijing genotype. This study showed that mice vaccinated with rBCG38 increase their survival time by 100% after infection with a Beijing genotype of *M. tuberculosis* (isolate 950,1000).

The improved protective activity of the recombinant strain of BCG expressing increased levels of the 38 kDa antigen was expressed in terms of its capacity to confer increased survival and resistance to bacterial multiplication in the lungs. For rBCG38 vaccinated mice, bacterial growth was controlled from day 21 after infection with the *M. tuberculosis* H37Rv or Beijing genotype strains tested. In the group challenged with the H37Rv strain, the bacterial loads reduced after day 60, whereas a gradual increase in CFU counts was observed after day 28 for the mice infected with the Beijing genotype of *M. tuberculosis*. The short-term reduction in bacterial counts, survival and pathological data are the clearest indications of protection induced by this vaccine.

As overexpression of the 38 kDa antigen in BCG Tice resulted in increased protection, the immune responses induced by this vaccine were analyzed and compared with the responses induced by BCG Tice vaccination, in an attempt to identify immunological changes induced by overexpressing this antigen. Slight differences were detected in

the CD4 and CD8 T cell lymphocyte sub-populations. For the rBCG38 vaccinated mice, a one-fold increase in CD8+ cells was observed compared with BCG Tice vaccinated mice 4 months after challenge with *M. tuberculosis* H37Rv. The most important changes were seen in the cytokine profile of these cells, changing from mixed Th 1/Th 2 response with similar levels of IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$  cytokine-producing cells representative of a Th 0 balance in BCG Tice-vaccinated mice to a characteristic Th 1 cytokine profile in mice vaccinated with rBCG38. This change in response was characterized by a 2.5-fold increase in the number of IFN- $\gamma$ -producing cells.

The capacity of rBCG38 to protect mice against challenge with *M. tuberculosis* Beijing genotype strain is possibly the result of enhanced activation of macrophages by an increased lymphocyte population expressing IFN- $\gamma$ . However, this hypothesis needs to be tested in further studies of natural killer cell activity, macrophage in-vitro activation, and proliferative responses specific to the 38 kDa protein. The reduction in the number of IL-2-producing cells observed in rBCG38 vaccinated mice has been previously observed as a characteristic profile in a well-developed Th 1 response, in which IL-2 and IFN- $\gamma$  production are regulated in an inverse way (personal communication).

In mice, one characteristic effect of the development of the cytokine environment during immune response against any microorganism is the switching between IgG1 and IgG2a antibody isotypes. IgG1 is identified in a Th 2 response, characterized by increased expression of certain cytokines such as IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and IL15. The production of IgG2a antibodies is part of a Th 1 response enriched by IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  and the cytokines that drive cell-mediated immune response. However, the role of antibodies in immune protection against TB remains uncertain.<sup>26</sup> Antibodies may play a fundamental role in mycobacterial contention and elimination by increasing opsonization of the organism. In this study, vaccination with rBCG38 induced significant changes in the antibody isotype switch to IgG2a ELISA titers at day 28 after infection with the strain of *M. tuberculosis* with the Beijing genotype along with a corresponding sequential decrease in the titre of IgG1.

This study has shown the importance of testing new vaccines designed to replace the existing BCG vaccine in animal models by challenging with extant human isolates of *M. tuberculosis*. The most prevalent and representative *M. tuberculosis* strain in the epidemiological surveys of TB is the Beijing genotype used in this study.<sup>27</sup> This strain has been



shown to be more virulent than the *M. tuberculosis* H37Rv reference strain, although the mechanism by which this strain becomes more virulent is still unknown.<sup>25</sup>

Finally, we suggest that the expression of 38-kDa in the rBCG38 vaccine induced increased immunogenic responses to this antigen through induction of the Th 1 cytokine profile. However, the data need to be supported further by using animal models with differing susceptibility profiles to *M. tuberculosis*, such as the guinea pig. If safety studies of rBCG38 show that there is no increased virulence associated with overexpressing the 38 kDa antigen in BCG Tice, this vaccine could be used in clinical trials in human populations. In a recent study, Black et al.<sup>16</sup> showed that sensitization with atypical mycobacteria in Malawi, a highly burdened region of TB, produced a strong response to recombinant 38-kDa protein in the non-vaccinated population. Therefore, it is possible that there would be no deleterious effects on vaccination with rBCG38 caused by pre-sensitization to environmental mycobacteria in the high endemic regions of the world, as these atypical mycobacteria would serve to boost T-cell response to 38-kDa antigens in these individuals.

## Acknowledgments

We acknowledge Dr. Mahavir Singh for providing us with r38-kDa protein, MTB12 Mab and M. D. Hector Orozco for his assistance with animal work.

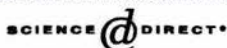
This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of Mexico City, Mexico, grants No. 36923-M and No. 144121 and by the Universidad Nacional Autónoma de México, from DEGEP support to Postgraduate studies Programme (PAEP) grant No. 202366.

## References

- Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet* 2003;362:887-9.
- Currie CS, Williams BG, Cheng RC, Dye C. Tuberculosis epidemics driven by HIV: is prevention better than cure? *AIDS* 2003;17:2501-8.
- Corbett EL, De Cock KM. Tuberculosis in the HIV-positive patient. *Br J Hosp Med* 1996;56:200-4.
- Corbett EL, De Cock KM. The clinical significance of interactions between HIV and TB: more questions than answers. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:205-17.
- Brewer TF. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guérin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis* 2000;31:564-77.
- Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994;271:698-702.
- Dourado I, Rios MH, Pereira SM, et al. Rates of adverse reactions to first and second doses of BCG vaccination: results of a large community trial in Brazilian school-children. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7:399-402.
- Harboe M, Wiker HG. The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *J Infect Dis* 1992;166:874-84.
- Vordermeier HM, Harris DP, Roman E, Lathigra R, Moreno C, Ivanyi J. Identification of T cell stimulatory peptides from the 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1991;147:1023-9.
- Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ, Narayanan PR, Raja A, editors. *Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to Mycobacterium tuberculosis 38 kDa antigen in pulmonary tuberculosis. Tuberculosis (Edinb)* 2001;81:249-53.
- Ramalingam B, Uma DK, Swaminathan S, Raja A. Isotype specific antibody response in childhood tuberculosis against purified 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Trop Pediatr* 2002;48:188-99.
- Vordermeier HM, Harris DP, Frisca G, et al. T cell repertoire in tuberculosis: selective anergy to an immunodominant epitope of the 38-kDa antigen in patients with active disease. *Eur J Immunol* 1992;22:2631-7.
- Bala L, Anand S, Sinha S. Enhancement of human T cell response to a peptide epitope of 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* by liposomes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2002;24:255-63.
- López-Vidal Y, Ponce de León-Rosales S, Castañón-Arreola M, Rangel-Frausto MS, Meléndez-Herrada E, Sada-Díaz E. Response of IFN- $\gamma$  and IgG to ESAT-6 and 38 kDa Recombinant Proteins and their Peptides from *Mycobacterium tuberculosis* in Tuberculosis Patients and symptomatic Household contacts May Indicate Possible Early-Stage Infection in the Latter. *Arch Med Res* 2004;35:308-17.
- Agrewala JN, Mishra GC. A 38-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* predominantly induces the secretion of interleukin-2, interferon-gamma and IgG2a antibodies. *Microbiol Immunol* 1995;39:801-8.
- Black GF, Weir RE, Chaguluka SD, et al. Gamma interferon responses induced by a panel of recombinant and purified mycobacterial antigens in healthy, non-mycobacterium bovis BCG-vaccinated Malawian young adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:602-11.
- Horwitz MA, Harth G. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 2003;71:1672-9.
- Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant bacillus calmette-guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13853-8.
- Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997;90:607-17.
- Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, et al. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in

- a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996;89:26-33.
21. Dormans J, Burger M, Aguilar D, et al. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol* 2004;137:460-8.
  22. Griffin JF, Chinn DN, Rodgers CR, Mackintosh CG, editors. *Optimal models to evaluate the protective efficacy of tuberculosis vaccines. Tuberculosis (Edinb)* 2001;81:133-9.
  23. Daugelat S, Ladel CH, Kaufmann SH. Influence of mouse strain and vaccine viability on T-cell responses induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Infect Immun* 1995;63:2033-40.
  24. Petricevich VL, Ueda C, Alves RC, et al. A single strain of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) grown in two different media evokes distinct humoral immune responses in mice. *Braz J Med Biol Res* 2001;34:81-92.
  25. Lopez B, Aguilar D, Orozco H, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003;133:30-7.
  26. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129.
  27. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002;8:843-9.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)





## Review

## Open Access

### A second-generation anti TB vaccine is long overdue

Mauricio Castañón-Arreola and Yolanda López-Vidal\*

Address: Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

Email: Mauricio Castañón-Arreola - xmaurice@hotmail.com; Yolanda López-Vidal\* - lvidal@servidor.unam.mx

\* Corresponding author

Published: 03 June 2004

Received: 24 January 2004

Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2004, 3:10 doi:10.1186/1476-0711-3-10

Accepted: 03 June 2004

This article is available from: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/3/1/10>

© 2004 Castañón-Arreola and López-Vidal; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article: verbatim copying and redistribution of this article are permitted in all media for any purpose, provided this notice is preserved along with the article's original URL.

## Summary

*Mycobacterium bovis* BCG vaccine significantly reduces the risk of tuberculosis by 50% and continues to be used to prevent tuberculosis around the world. However, it has been shown to be ineffective in some geographical regions. The existence of different BCG strains was described more than 60 years ago, these vary in their antigenic content but the genetic mutations in BCG strains have yet been shown to affect their protection. After the declaration of tuberculosis as a global emergency in 1993, current research attempts to develop a novel more-effective vaccine. Using new technologies, recombinant, auxotroph, DNA, subunit and phylogenetically closely related mycobacteria, naturally or genetically attenuated, have been used as vaccines in animal models, but their protective efficacy, is less than that offered by the current BCG vaccine. Today it is mandatory that a major effort be made to understand how different BCG vaccine strains influence immune response and why in some cases vaccines have failed, so we can rationally develop the next generation of tuberculosis vaccines to reduce the prevalence from 10% to less than 2 % for developed countries.

## Introduction

Tuberculosis (TB) was the first disease to be declared a global emergency by the World Health Organization (WHO). It is an infectious disease caused by 3 closely related *Mycobacterium* strains (*M. tuberculosis*, *M. africanum* and *M. bovis*), which are commonly known as the TB-complex. Human tuberculosis continues to be a major worldwide health problem and is the leading killer of youths and adults in developing countries, being responsible for approximately 3 million deaths each year. The HIV epidemic and the appearance of multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis* (MDRTB) have contributed to the resurgence of TB. The risk of developing TB has increased and for HIV positive patients, TB enhances the progression of HIV infection to AIDS [1].

The most well known form of disease prevention is BCG vaccination, for which a variable efficacy rate from 0% to 80% has been reported [2,3,5]. In regions of the world where the disease is most widespread, BCG vaccination is ineffective and therefore, the search for novel, more effective vaccines is paramount. There are a number of possible explanations for the discrepancies in BCG protector efficacy: (i) genetic host susceptibility [5], (ii) a wide range of virulence among *M. tuberculosis* strains, (iii) progressive loss of BCG capacity to stimulate a durable immune response (iv) prevalence of other mycobacterial infections in the study population, (v) variations in protection against different forms of tuberculosis, and (vi) the level of exposure to environmental mycobacteria [6,2], however, none of these have strong clinical and research support [3].

**BCG development**

Albert Calmette and Camille Guérin developed BCG between 1908 and 1921 by successfully passing an isolated strain of *M. bovis in vitro*. In the first half of the 20<sup>th</sup> Century, BCG vaccines were prepared and preserved by different manufacturing laboratories. This resulted in genotypic and phenotypic differences in the daughter strains with variations in tuberculin conversion and the frequency of adverse reactions. During this time, BCG showed a progressive decrease in virulence, the most important during the first 15 passes [7,8]. Over the next 40 years, until the freeze-dried process of the Pasteur strain in 1961 and after more than 1,000 passes, it was clear that the standardization and stability of vaccine strains needed to be enforced. This led to the adoption of the seed-lot system by the International BCG Technical Conference in 1956 [8]. Furthermore, Colditz, *et al* [3] independently quantified the detrimental or protective benefit of the vaccine in several prospective trials from case control studies and concluded that BCG significantly reduced the risk of active TB development by an average of 50%. The different criteria applied to interpret the confounding variables in the human trials make it difficult to identify the impact of BCG vaccines on protective efficacy [4].

In 1999, Behr *et al* [9] elucidate some of the molecular events that occur during BCG attenuation. Under laboratory conditions used for bacterial passes, and using microarray technology and genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv as a framework, they inferred the genealogy of

BCG strains in an evolutionary approach, which was supported by BCG historical records [10]. These studies only led to the understanding of the genes missing from *M. bovis* leaving deeper research to be carried out to explore the association between the 61 ORF genes deleted from BCG during evolution and virulence attenuation, and may be more importantly, research into the loss in protective efficacy over the last eight decades [11]. What remains unknown is the irrefutable role that the smallest deletions, duplications and polymorphisms in the nucleotide sequence play to induce protective efficacy, as well as the production of antigens in the overall attenuation of BCG [9,12].

**Polymorphism in BCG daughter strains**

Following adoption of the seed-lot system, several BCG sub-strains of the original vaccine strain are now in circulation. It is known that these sub-strains vary in certain characteristics (Table 1), such as their antigenic structure, secreted protein profiles [13-15], IS6110 copy number [11], mycolic acid pattern [16], and the characteristics and quantity of exoquelin [17]. Alterations in the mycolic acid subclass directly affect not only cell wall fluidity and permeability to hydrophobic agents, but also the ability of strains to grow within macrophages. In addition, strains with an altered cord factor have altered virulence [16,18].

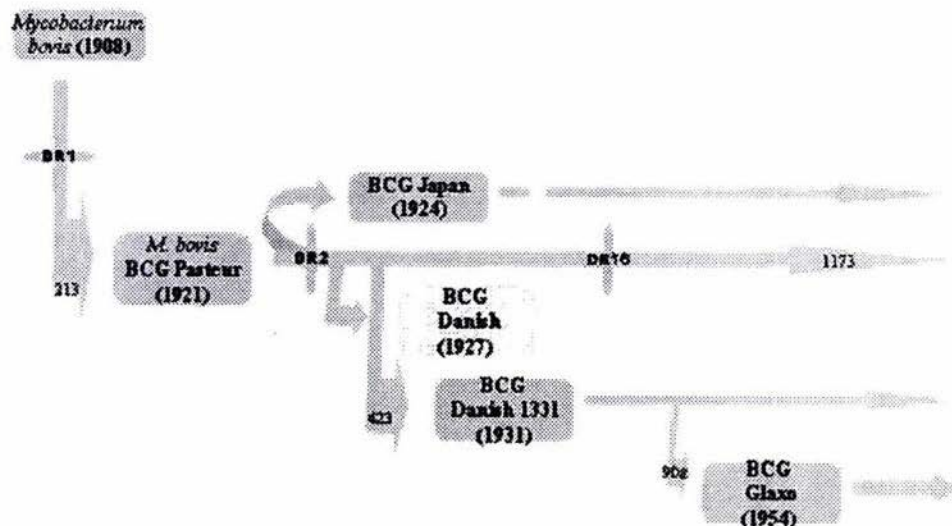
Today, the most commonly used BCG sub-strains are the Pasteur, Japanese and the Glaxo (Figure 1) but other daughter strains are/or were in use (Moreau, Montreal, Russian, Prague, Danish, Birkhaug, Australian) [12].

**Table 1: Listing of gene and antigen differences presented in *Mycobacterium bovis* BCG daughter strains. The data was taken from research and historical reports. Genetic and phenotypic differences of *M. bovis* BCG daughter strains.**

STRAIN	SYNONIMOUS	DELETIONS (ORF's)	MPB64	MPB70	Methoxymycolic acid's	EXOCHELIN'S µg/ml
PASTEUR		DR1, DR2, DR14 (28)	P	LOW	N	345
PHIPPS	PHILADELPHIA	DR1, DR2 (20)	P	LOW	N	ND
FRAPPIER	MONTREAL	DR1, DR2, DR8 (24)	P	LOW	N	ND
CONNAUGHT	TORONTO	DR1, DR2, DR8 (24)	P	LOW	N	ND
TICE	CHICAGO	DR1, DR2 (20)	P	LOW	N	390
DENMARK	DANISH 1331	DR1, DR2 (20)	P	LOW	N	140
GLAXO		DR1, DR2 (20)	P	LOW	N	75
PRAGUE		DR1, DR2 (20)	P	LOW	N	ND
BIRKHAUG		DR1, DR2 (20)	P	LOW	N	ND
SWEDEN	GOTHENBURG	DR1 (9)	N	HIGH	P	ND
JAPAN	TOKYO	DR1 (9)	N	HIGH	P	150
MOREAU	BRAZIL	DR1, DR 16 (15)	N	HIGH	P	ND
RUSSIA	MOSCOW	DR1 (9)	N	HIGH	P	ND
MEXICO		DR1, DR2 (20)	P	LOW	N	ND

**DR:** Deleted Regions, **ORF:** Open Reading Frame, **P:** Protein or antigen expression, **N:** Non protein or antigen expression, **ND:** Non determinate.



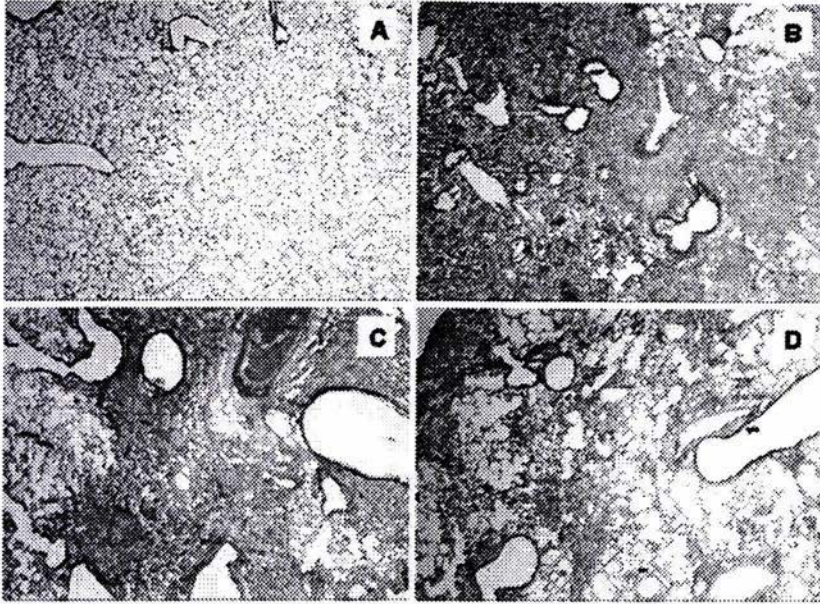
**Figure 1**

Documented evolution of the four *M. bovis* BCG strains currently licensed to produce for use in humans by the World Health Organization. The arrows indicate the chronologic evolution of Japanese and Danish strains from the original BCG Pasteur 1921 and Glaxo strain from Danish 1331. Boxes indicate occurrence of deletions of the genome during derivation of BCG. The year of derivation are indicated by (). The number in the arrows is the in vitro passages documented to have occurred during the evolution of BCG Pasteur and daughter strains since 1921 to the freeze dried of BCG in 60<sup>th</sup>.

Recently, Lagranderie *et al* [20] evaluated the capacity of five BCG sub-strains to trigger and maintain the immune response in mice and found statistically significant differences in their protective efficacy. However, the data are subject to the particular experimental conditions used in their mice model. In reality, vaccine candidates are tested in several models and under different evaluation criteria. It is clear that the strategies for the development and evaluation of the new vaccine candidates need to be standardized under shared criteria in order to understand their ability to induce protection [21] in animal models that mimic the key aspects of naturally occurring human tuberculosis [22]. Currently, work is being carried out to understand the differences in the major BCG vaccines being used in human trials. In these studies, BCG vaccines are being studied in a well-characterized mouse model of pulmonary tuberculosis, which tries to mimic natural human infection as much as possible [23]. Under these conditions 10 different daughter strains shown to induce a wide range of protection against *M. tuberculosis* intratracheal infection displaying differences in terms of colony

forming units (CFU's) reduction, delayed type hypersensitivity response and proportion lung surface affected by pneumonia going to be difficult correlate the protective response offered by the current disposable vaccines with the protective efficacy determined in previous human clinical trials (Figure 2 shown representative lung section of mice unvaccinated or vaccinated with these daughter strains) [unpublished data].

The availability of the complete genome sequence of two *M. tuberculosis* strains and the partial sequence of the BCG Pasteur sub-strain, may lead to the understanding of the principal source of antigenic variations, which would be significant for vaccine design and for inducing protective immunity in tuberculosis [24-26]. As seen in BCG sub-strains, variation in colony morphology among isolates of *M. tuberculosis* from patients is extremely common and multiple phenotypes are often apparent even from a microbial culture from a single sputum sample. However, attempts to correlate such differences with pathogenic potential cannot be sustained.



**Figure 2**

Representative cross-sections from lungs of BALB/c mice vaccinated and infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **A.** Typical lung section from health non infected mice, no pneumonic or infiltrate were detected. **B.** Lung from mice non vaccinated and challenge with *M. tuberculosis*. **C.** Lung from mice vaccinated with heat inactivated *Mycobacterium vaccae* a closely related Mycobacterial strains. **D.** Lung from mice vaccinated with BCG Phipps strain. Significant reduction in the tissue damage was seen only in the mice vaccinated with BCG, the use of saprophytic bacilli as vaccine no induce immune response capable to control infection and pneumonic development. Vaccines were evaluated under a mice model of pulmonary tuberculosis (unpublished data) (H:E stain 50 $\times$ ).

#### **Immunological considerations for new tuberculosis vaccine development**

The development of a new vaccine with improved protective immunity against *M. tuberculosis* depends on the efficient recruitment of antigen-specific T-cells principally CD4+ in the lungs, as well as on the cytokines that are released particularly IFN- $\gamma$ , which is important for inducing the macrophage killing activation mechanism [27].

Cell-mediated immunity plays the principal role in containing infection, and the routes of vaccine administration

and immunization influences immune response development. In infants, BCG vaccination generally induces a Th1 cytokine response and stimulates cytotoxic T-lymphocyte activity in neonates [28]. An alternative route of BCG administration, which does not induce the side effects associated with subcutaneous immunization, is via rectal delivery. This method induces a similar immune response and protection in several animal models [29,30] without altering the recruitment patterns of activated T-cells [31]. Intranasal immunization induces higher protection by rapid induction of IFN- $\gamma$  and T-cell response in the lung



tissue but there are some who have serious misgivings in using live bacilli. However, nasal administration of recombinant BCG as a means to deliver immune dominant antigens to the mucosa shows some promise for therapeutic use in HIV infection [32,33].

*M. tuberculosis* has a complex multiplicity of antigens with a diverse chemical and immune reactive nature as has been demonstrated in lipids, polysaccharides, and proteins. Some of these induce the granuloma formation, macrophage activation, and adjuvant activity while others are immunosuppressive and enhance host toxicity [27,34]. It should be remembered that the T-cell mediated immune response can result in protective immunity but it may also lead to pathological immunity that is detrimental to the host. The understanding of specific antigens expressed during early infection, disease, latency or reactivation and their immunological characterization are key for the development of new vaccines.

Looking back in the history of tuberculosis research, during the second half of 20<sup>th</sup> Century, various types of vaccines have been developed against mycobacterial infection to control bacilli replication and dissemination in order to stop tuberculosis transmission and future eradication. This vaccine development has been included the use of secreted proteins and surface exposed proteins, nucleic acid vaccination, rational attenuation of *Mycobacterium sp* strains, and recombinant BCG vaccines, all of which are currently being tested in a wide variety of animal models before future use in human clinical trials [25,35-37].

Now a day *M. bovis* BCG vaccine is the only live bacterial vaccine in use, which shows no major side effects. This is the most used vaccine and has been administered to more than two billion people worldwide and has showed long-lasting immunity.

Until now, medical staffs and health care workers accepted that BCG strains have been able to induce protection in the first year of life as well in all animal models that have been used; something that other vaccine candidates have still failed to achieve. Recent data of protective efficacy coming from more than 180 vaccine candidates put in perspective the evaluation of existing BCG vaccines in a way to identify potential candidate for a rationally designed recombinant BCG vaccine or an auxotroph vaccine by comparing protective efficacy [21]. These new designed recombinant vaccines have been shown to induce Th1 and long-lasting protective response with a smaller number and size of granulomas and a reduced load of colony forming units.

The development of new acellular vaccines composed of one or more antigens may offer a faster route for creating an alternative to BCG vaccines. However, this approach needs a distasting research to identify and defining those potential proteins recognized by human T-cells which are capable of inducing cell-mediated and long-lasting immunity. On last ten years attention has mainly been focused on the group of proteins secreted by the bacteria in culture media during the active replication of *M. tuberculosis* in early growth phase. These have been recognized in the early stages of tuberculosis infection in several animal models and may be the reason that viable mycobacteria are needed for effective vaccination against *M. tuberculosis* infection [25,35].

Various approaches are currently being analyzed using sub-unit vaccines based on culture filtrate proteins of *M. tuberculosis*, which when are administered with an adjuvant have been shown to induce protective immunity in mice, guinea pigs and non-human primate models [40]. Antigen isolation has depended on the use of monoclonal antibodies [39] or by direct chromatography of culture filtrates. Such isolation procedures are characterized by biochemical and immunological techniques, with the corresponding genes being sequenced and cloned for further use as a vaccine. Several antigens have been cloned and purified as recombinant proteins, due to the large-doses required for immunization. The choice of an antigen or several antigens to formulate optimal immunological cocktails for vaccine use needs to be tested through *in vitro* and *in vivo* studies. In *in vitro* human studies, ESAT-6, CFP-10, MPT64, MPB70 and fusion proteins of the ESAT-6 and antigen 85B have been tested to show their ability to induce protective T-cell response. The most used criteria for tuberculosis vaccine designs are antigen-specific proliferation and IFN- $\gamma$  secretion assays [35,40-42]. ESAT-6 was a promises in this area because is an immune dominant antigens most frequently recognized by TB patients, which contains a great number of T-cell epitopes. In animal models, ESAT-6 has been recognized in the first phase of infection and has been demonstrated to be a strong T-cell immunogen inducing prime memory immunity, which persisted in individuals who had recovered from disease [25,43]. The 30/32-kDa complex is among the most important secretor proteins of *M. tuberculosis* and has been shown to be protective in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. Their abundant production either extracellularly in broth culture or intracellularly in human monocytes, suggests a vital role in the physiology of the bacterium.

The recent elucidation of complete genome sequence of two *M. tuberculosis* strains and accelerated development of genetic tools for the study of *M. tuberculosis* has enabled the development of DNA vaccination, which has been



tested in several animal models [44,45]. Over the last few years, genetic immunization has become the most popular strategy in vaccine development and may be a successful alternative for the delivery of *M. tuberculosis* antigens that drive the cellular immune response. The DNA vaccines that expressed the 85B, MPT64 and ESAT-6 antigens has been demonstrated that they reduced the level of pulmonary infection following *M. tuberculosis* challenge, by the specific CD4+ and CD8+ T-cell response [44,46,47]. It was also shown that combined vaccination with three antigens was more effective than vaccination with a single vector. The use of cytokines to increase vaccine protection enhanced the specificity of the immune response triggered against these antigens, thereby potentially maintaining the Th1 response [46]. These results concur with previous studies concerning sub-unit vaccines that have shown them to be only equal at best to BCG vaccines. In these way, immunization using a DNA vaccine of the 32-kDa protein stimulated protective immunity against BCG and *M. tuberculosis* infection [47,48]. Plasmid vectors expressing the 38-kDa glycoprotein induce a comparable level of protection with other DNA vaccines and develop a strong antigen-specific Th1 response in human and murine lymphocytes, characterized by IFN- $\gamma$  secretion [45]. However, genetic vaccination with the 19-kDa lipoprotein resulted in a non-protective antibody response [49]. Even though 38 kDa and 19 kDa are important antigens that induce a Th1 type immune response, they do not protect mice from *M. tuberculosis* infection. Similarly, no protection was observed when immunization used chaperon-like proteins, in contrast with early works in which the heat-shock proteins like HSP60 and HSP70 resulted in a protective effect. Similar results to those using 38 kDa and 19 kDa have been obtained by immunizing with MPB83 DNA vaccines [50,51].

The major advance in DNA immunization is the notion that intramuscular vaccination is better for inducing a protective Th 1 type immune response against tuberculosis without sensitizing the animal to tuberculin testing. An alternative to DNA immunization is the use of recombinant vaccine viruses that express immune dominant antigens [52].

Although DNA vaccines are an attractive alternative for the development of a new vaccine, they do not surpass the protection conferred by BCG vaccination [53] and need further safety evaluation prior to testing in human populations.

The stable expression of foreign DNA in BCG on a plasmid vector established a basis for the construction of polyvalent recombinant BCG vaccine but the antibiotic resistance markers are not appropriate for the selection or maintenance of recombinant plasmid containing anti-

gens. An alternative would be to develop auxotroph mutants that would maintain stability, as they offer a genetic function required for the survival of the mycobacteria in their host. For this purpose defining mycobacterial promoter sequences is critical for expressing high levels of selected antigens responsible for cell-mediated immunity.

Recombinant BCG vaccines will have the excellent adjuvant activity of BCG and thus, significant levels of T-cell reactivity but it is uncertain whether they will be capable of generating high levels of cytotoxic T-cell response. The use of BCG as a live vaccine vector [60] for the presentation of heterologous and homologous antigens can be a powerful method for driving the immune response to the Th1 phenotype or for replacement of BCG target genes by homologous recombination [55].

Auxotroph and avirulent mutants of *M. tuberculosis* and *M. bovis* [56-59] have been developed showing wide variability in their avirulent character giving equivalent protection between them and comparable to that of BCG, which have also proved safe in individuals with immunodeficiency disease.

#### Post-genomic approach

With the complete genomic sequence and database comparisons, it is now possible to attribute tentative functions to roughly 40% of the 3924 protein coding genes for the genome of *M. tuberculosis* [24]. In addition, this information reveals new members of family proteins and potential variation between *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. bovis* BCG [60]. Until recently, there have been two principal ways to learn more about the role of new antigens in the immune pathology of tuberculosis. All primary results come from some biochemical or immune proliferative assays induced by individual proteins with further characterization under specific conditions in animal models. Studies using such tools have resulted in the identification of immune dominant antigens, which are strongly recognized in humans and with the potential for developing of a novel TB vaccine. An applied approach allowed the identification of deleted genes and the development of antigens that can distinguish between *M. tuberculosis* infection and BCG vaccination [61]. This offers the prospect of starting vaccine design using the genetic information by reverse vaccinology [26].

Comparative analysis of the complete genome sequence of *M. tuberculosis*, *M. bovis*, BCG strains and *M. leprae* and other mycobacterial species may allow the identification and development of subunit vaccines with an exceptional specificity, however the high similarity of these strains limit this potential window of antigens.



The recent development of recombinant BCG vaccines that secrete cytokines or specific antigens is one of the most secure routes in the development of improved vaccines against tuberculosis [36,62]. However, as seen in the sub-unit vaccine approach, adverse results from antigens which are capable of enhancing protection efficacy of the current BCG vaccine could be found. Using recombinant BCG that secretes, IFN- $\gamma$  or IL-2, which have been shown to reduce disease in a pre-infection vaccine model, as well as TNF-alpha which is indispensable for the formation of tuberculous granulomas, leading to an increase in lung pathology without reducing bacillary loads [48,63].

Other recombinant live vaccines that produce pore-forming cytolysin [64], Interferon alpha 2B [62] demonstrate enhanced immune genericity but not improved protection. Recently, Horwitz [65] reported enhanced protective response to challenges with virulent *M. tuberculosis* following vaccination with recombinant BCG that secreted 30-kDa antigen of *M. tuberculosis*.

The use of closely related species of *Mycobacterium* may be the second most interesting route to follow for vaccine improvement. *Mycobacterium microti* is a naturally attenuated strain with a narrow host range. In mice and rabbit models, vaccination with this strain resulted in significant reduction in the *M. tuberculosis* load and histopathology lesions [66]. Another approach is the use of different host vectors that express shared antigens [64,67] such as *Salmonella thymurium* that secretes ESAT-6, which is used as a vaccine and reduces the load of mycobacteria throughout the course of infection. *M. vaccae* is a saprophytic bacillus which, as other members of the *Mycobacterium* genera, share the major antigens and this was used recently as alternative immunotherapy in addition to chemotherapy in MDRTB cases [68].

Finally, little is known about the effect of vaccine boosters using some antigens and how this strategy may be able to drive the response to maintain a prorogued Th1-type memory T-cell response].

The use of atypical mycobacteria as hosts for the production of *M. tuberculosis* antigens needs to be designed with the same precautions as for BCG. Post *et al* [69], demonstrated the inefficacy of recombinant strains of *M. vaccae* and *M. smegmatis* that expressed the 19-kDa lipoprotein, and the abrogation of the protection conferred by host strains alone [49]. On the other hand, the deletion of these genes in *M. bovis* has a significant effect on the ability of BCG to protect against *M. tuberculosis* challenge [70].

The rational mutation of virulence genes or putative virulence factors is being evaluated for their biological function [71]. In order to develop better vaccines, several

mutants have been produced by transposon mutagenesis or illegitimate recombination. The current strategy is to use antibiotics to select mutant strains that better express antigens than induce protection. However, the use of antibiotics in this way and the possibility to revert their virulence or recombination events between these and the wild type strains means that this alternative is a long way from human trials [37]. The exciting aspect of this early research is the specificity of the response elicited by each one of these strains, which plays a key role in protection [59] through homologous or analogous challenge with the virulent strain.

## Discussion

BCG is an attenuated derivative of virulent bacilli generated by 230 serial passes of the parent strain through laboratory media. It is believed that attenuation is caused by chromosomal rearrangements such as small duplications or inversions. Such variations would have been difficult to detect by the genetic and molecular approaches that currently exist.

The mechanism by which BCG induces protective immunity has not been established. The mutation that affects BCG provides potential answers as to why there have been differences in protective efficacy during various human trials.

The development of new vaccines requires a clear understanding of the nature of both innate and acquired immunity in the lung and the role that these two sets of mechanisms play in the protective immune response against *M. tuberculosis*, as well as the construction of delivery vectors with the ability to elicit an optimal protective response that controls the pathogen. Despite the rapid development of molecular biology techniques, DNA vaccines have not proved to be better than live attenuated vaccines, such as BCG, for inducing protective immunity against tuberculosis. *M. tuberculosis* has evolved many interrelated processes that favour the particular ecological niche, which the organism occupies; the resistance of the bacilli to chemical injury, dehydration and certain antibiotics is directly related to the low permeability of its unique cell wall envelope, which also is a rich source of immunogenic antigens.

Some unresolved issues regarding BCG efficacy are the duration of protective immunity, the efficacy of the BCG daughter strains, the phenotypic differences among BCG vaccines, and their overall protection. In bovine studies, it has been demonstrated that BCG protection would be enhanced with repetitive immunization at short intervals [72]. Also, the prevalence of BCG infection is unknown because many laboratories cannot quickly differentiate between BCG and other members of the *M. tuberculosis*



complex. The development of a low-cost vaccine that immunizes efficiently with only one dose would be important for some developed countries, which do not offer a free national immunisation programme for BCG, especially considering that most (69.5%) of the TB cases in 1990 occurred among racial and ethnic minorities.

An improved BCG vaccine would help in fulfilling a number of established criteria: (i) the World Health Organization recommends that BCG should be administered at birth; (ii) one dose should be sufficient to confer long lasting immunity; (iii) it is the most effective known adjuvant in animals and man; (iv) the production cost is low (~\$0.55 per dose) (v) BCG is offered as an integral compound of the World Health Organization Expanded Program on Immunization (EPI).

It is necessary to identify the efficacy, safety and biochemical differences between the BCG sub-strains in use today. Understanding these characteristics involves much more than simply testing for growth in the spleen or lung of animal models used for this purpose. In addition, care must be taken when considering the very artificially high-dose intravenous infection models of the disease, which involves significant dissemination and in which it is impossible to evaluate factors that influence their efficiency, nature of the granulomatous response or cessation. BCG is the only TB vaccine currently licensed and administered to children. The development and eventual acceptance of a new TB vaccine is several years away with safety, protection and long-term efficacy still needing to be proved. The use of recombinant BCG vaccines that over produce secreted antigens may be of particular significance in the induction of a protective immune response but in the same way, they may produce increased tissue damage as they may enhance delayed-type hypersensitivity reaction following infection. Other mycobacterial genes still need to be defined in terms of their capacity to polarize Th1 type immune response and protect against tuberculosis. A careful integration of the biochemistry and pathogenesis of *M. tuberculosis*, in parallel with a complete study of the immune response and resistance to infection compiled during the last Century, may hold the key to the development of a really effective vaccine against tuberculosis.

## Conclusions

The development of a new attenuated vaccine that is more effective than BCG depends not only on the identification of genes and products that contribute to pathogenesis in order to drive the attenuating mutations, but also a precise definition of the antigenic machinery used by the immune system to develop a protective response. Another issue requiring consideration is the potential that a new vaccine has for clearing the infection because many cases

of clinically active tuberculosis arise from reactivation of an infection acquired years before and reflect the re-emergence of the actively growing organism from an apparently non-replicative state. In addition, there is no evidence that current TB vaccine protection lasts for more than 15 years in any population [15,73]. The number of patients developing tuberculosis through reactivation versus re-infection is a topic currently being investigated in developing countries.

Finally, we can conclude that developing of new vaccines would be directed in two ways, in one hand we need a vaccine that induce protective immunity in infants and control and clearance the infection, and in the other hand a vaccine to treat the high proportion of latent infected people. These approaches in the optimal scenery can be present in a new based BCG vaccine that could be administered at any time of life, as single dose infancy in high incidence countries and at the time of exposition in the developed countries when the rates of infected people are lesser than 10/ 100 000 people. Until development of this vaccine (s) the reduction of latent infection, and proportion of infected subjects (10%) whose develop tuberculosis In meanwhile, the actual incidence rate will no decreased promptly.

Before field introduction of any new vaccine, several researches should be focused to support the enhanced efficacy of NEW vaccines against tuberculosis, mainly in their capability to clearance initial tuberculosis infection named granuloma, due to many of the inefficacy of contemporary BCG vaccine to control tuberculosis infection where innate and acquired immune response play an important role in the develop of a vaccine success.

## References

1. De Cock KM, Dworkin MS: HIV infection and TB. *World Health* 1998, 51:14-25.
2. Brandt L, Feino Cunha J, Weinreich Olsen A, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, Andersen P: Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 2002, 70:672-678.
3. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F: Efficacy of BCG Vaccine in the Prevention of Tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994, 271:698-702.
4. Brewer TF: Preventing Tuberculosis with Bacillus Calmette-Guérin Vaccine: A Meta-Analysis of the Literature. *Clin Infect Dis* 2000, 31(Suppl 3):S64-S67.
5. Buu N, Sanchez F, Schurr E: The BCG host-resistance gene. *Clin Infect Dis* 2000, 31(Suppl 3):S81-S85.
6. Buddle BM, Wards BJ, Aldwell FE, Collins DM, de Lisle GW: Influence of sensitization to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 2002, 20:1126-1133.
7. Phenotypes of BCG-vaccines seed lot strains: results of an international cooperative study. *International Union against Tuberculosis. Tubercle* 1978, 59:139-142.
8. Osborn TW: BCG vaccine: an investigation of colony morphology from four different strains after their introduction as seed for vaccine preparation in four production laboratories. *J Biol Stand* 1983, 11:19-27.



9. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Samil PM: Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. *Science* 1999, **284**:1520-1522.
10. Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, Haslov K, Andersen P: Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber Lung Dis* 1999, **79**:243-250.
11. Behr MA, Small PM: A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999, **17**:915-922.
12. Behr MA: Correlation between BCG genomics and protective efficacy. *Scand J Infect Dis* 2001, **33**:249-252.
13. Abou-Zeid C, Smith I, Grange J, Steele J, Rook G: Subdivision of daughter strains of bacille Calmette-Guérin (BCG) according to several protein patterns. *J Gen Microbiol* 1986, **132**:3047-3053.
14. Matsuo T, Matsumoto S, Ohara N, Kitaura H, Mizuno A, Yamada T: Differential transcription of the MPB70 genes in two major groups of *Mycobacterium bovis* BCG substrains. *Microbiology* 1995, **141**:1601-1607.
15. Li H, Ulstrup JC, Jonassen TO, Melby K, Nagai S, Harboe M: Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1993, **61**:1730-1734.
16. Behr MA, Schroeder BG, Brinkman JN, Slayden RA, Barry CE 3rd: A point mutation in the *rrna3* gene is responsible for impaired methoxy mycolic acid production in *Mycobacterium bovis* BCG strains obtained after 1927. *J Bacteriol* 2000, **182**:3394-3399.
17. Gobin J, Wong DK, Gibson BW, Horwitz MA: Characterization of exochelins of the *Mycobacterium bovis* type strain and BCG substrains. *Infect Immun* 1999, **67**:2035-2039.
18. Barry CE 3rd, Lee RE, Madhukar K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA, Yuan Y: Mycolic acids: structure biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res* 1998, **37**:143-179.
19. Mustafa AS, Shaban FA, Abal AT, Al-Atyay R, Wilker HG, Lundin KEA, Ofung F, Huygen K: Identification and HLA restriction on Naturally Derived Th1-Cell Epitopes from the secreted *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 85B Recognized by Antigen-Specific Human CD4+ T-Cell Lines. *Infect and Immun* 2000, **68**:3933-3940.
20. Lagrandier MRR, Balazuc AM, Deriaud E, Leclerc CD, Gheorghiu M: Comparison of immune response of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *Infect Immun* 1996, **64**:1-9.
21. McMurray DN: Disease model: pulmonary tuberculosis. *Trends Mol Med* 2001, **7**:135-137.
22. Smith D, Wiegand S, Balasubramanian V: Animal models for experimental tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2000, **31**(Suppl 3):S68-S70.
23. Hernandez Pando R, Orozco H, Samperi A, Pavan L, Velasquillo C, Larriva-Shd J, Alcocer JM, Madrid MV: Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996, **89**:26-33.
24. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon S, Eigmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, et al: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998, **393**:537-544.
25. Louise R, Skjot V, Agger EM, Andersen P: Antigen discovery and tuberculosis vaccine development in the post-genomic era. *Scand J Infect Dis* 2001, **33**:643-647.
26. Rappuoli R: Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol* 2000, **3**:445-450.
27. Ellner JJ: Review: The Immune Response in Human Tuberculosis-Implications for Tuberculosis Control. *J Infect Dis* 1997, **176**:1351-1359.
28. Hussey GD, Watkins ML, Goddard EA, Gottschalk S, Hughes EJ, Itoni K, Kibel MA, Ress SR: Neonatal mycobacterial specific cytotoxic T-lymphocyte and cytokine profiles in response to distinct BCG vaccination strategies. *Immunology* 2002, **105**:314-324.
29. Lagrandier M, Balazuc AM, Abolhasani M, Chavart P, Nahori MA, Thouron F, Milon G, Marchal G: Development of mixed Th1/Th2 type immune response and protection against *Mycobacterium tuberculosis* after rectal or subcutaneous immunization of newborn and adult mice with *Mycobacterium bovis* BCG. *Scand J Immunol* 2002, **55**:293-303.
30. Lagrandier MA, Chavart P, Balazuc AM, Marchal G: *Mycobacterium bovis* BCG induces similar immune responses and protection by rectal and parenteral immunization routes. *Infect Immun* 2000, **68**:5657-5662.
31. Palendira U, Bean AG, Feng CG, Britton WJ: Lymphocyte recruitment and protective efficacy against pulmonary mycobacterial infection are independent of the route of prior *Mycobacterium bovis* BCG immunization. *Infect Immun* 2002, **70**:1410-1416.
32. Lyadova IV, Vordermeier HM, Eruslanov EB, Khaidukov SV, Apt AS, Hewinson RG: Intranasal BCG vaccination protects BALB/c mice against virulent *Mycobacterium bovis* and accelerates production of IFN-gamma in their lungs. *Clin Exp Immunol* 2001, **126**:274-279.
33. Hiroi T, Goto H, Someya K, Yanagita M, Honda M, Yamanaka N, Kiyono H: HIV mucosal vaccine: nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long term V3J1 peptide-specific neutralizing immunity in Th1- and Th2-deficient conditions. *J Immunol* 2001, **167**:5862-5867.
34. Rastogi N, McFadden J, Ottenhoff THM, van Eden W: First International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infections: A summary. *Clin Infect Dis* 1992, **14**:308-312.
35. Mustafa AS, Amoudy HA, Wilker HG, Abal AT, Ravin P, Ofung F, Andersen P: Comparison of Antigen-Specific T-Cell Responses of Tuberculosis Patients using Complex or Single Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 1998, **48**:535-543.
36. Ohara N, Yamada T: Recombinant BCG vaccines. *Vaccine* 2001, **19**:4089-4098.
37. Collins DM: New tuberculosis vaccines based on attenuated strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Immunol Cell Biol* 2000, **78**:342-348.
38. Pehler K, Braskey KM, Butler TM, Attanasio R: *Mycobacterium tuberculosis*-secreted protein antigens: immunogenicity in baboons. *J Clin Immunol* 2000, **20**:306-316.
39. Freer G, Florio W, Dallacasa B, Castagna B, Maisetta G, Batoni G, Corsini V, Senesi S, Campa P: Characterization of antigens recognized by new monoclonal antibodies raised against culture filtrate proteins of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *FEMS Immunology and Med Microbiol* 1998, **20**:129-138.
40. Harth G, Lee B-Y, Wang J, Clemens DL, Horwitz MA: Novel Insights into the Genetics, Biochemistry, and Immunocytochemistry of the 30-Kilodalton Major Extracellular Protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1996, **64**:3038-3047.
41. Moreira AL, Tsenova L, Aman MH, Bekker LG, Freeman S, Mangaliso B, Schroder U, Jagirdar J, Rom WN, Tovey MG, et al: Mycobacterial antigens exacerbate disease manifestations in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* 2002, **70**:2100-2107.
42. Weinrich Olsen A, van Pinxteren LA, Meng Okkels L, Birk Rasmussen P, Andersen P: Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and esat-6. *Infect Immun* 2001, **69**:2773-2778.
43. Wu-Hsieh BA, Chen CK, Chang JH, Lai SY, Wu CH, Cheng WC, Andersen P, Doherty TM: Long-lived immune response to early secretory antigenic target 6 in individuals who had recovered from tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2001, **33**:1336-1340.
44. Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, Brioscold M, Broton WJ: Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1999, **67**:1702-1707.
45. Zhu X, Venkataprasad N, Thangaraj HS, Hill M, Singh M, Ivanyi J, Vordermeier HM: Function and Specificity of T Cells Following Nucleic Acid Vaccination of Mice Against *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Immunol* 1997:5921-5926.
46. Morris S, Kelley C, Howard A, Li Z, Collins F: The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. *Vaccine* 2000, **18**:2155-2163.
47. Tanghe A, Denis O, Lambrecht B, Morce V, van der Berg T, Huygen K: Tuberculosis DNA Vaccine Encoding Ag85A Is Immunogenic and Protective When Administered by Intramuscular Needle Injection but Not by Epidermal Gene Gun Bombardment. *Infect Immun* 2000, **68**:3854-3860.



48. Palendira U, Kamath AT, Feng CG, Martin E, Chaplin PJ, Triccas JA, Britton WJ: Co expression of interleukin-12 chains by a self-splicing vector increases the protective cellular immune response of DNA and Mycobacterium bovis BCG vaccines against Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 2002, 70:1949-1956.
49. Post FA, Manca C, Neyrolles O, Ryffel B, Young DB, Kaplan G: Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton lipoprotein inhibits Mycobacterium smegmatis-induced cytokine production by human macrophages in vitro. *Infect Immun* 2001, 69:1433-1439.
50. Chambers MA, Williams A, Hatch G, Gavier-Widen D, Hall G, Huygen K, Lowrie D, Marsh PD, Hewinson RG: Vaccination of guinea pigs with DNA encoding the mycobacterial antigen MPB83 influences pulmonary pathology but not haematogenous spread following aerogenic infection with Mycobacterium bovis. *Infect Immun* 2002, 70:2159-2165.
51. Turner OC, Roberts AD, Frank AA, Phalen SW, McMurray DMM, Content J, Denis O, D'Souza S, Tanghe A, Huygen K, Orme IM: Lack of Protection in Mice and Necrotizing Bronchiolitis Pneumonia with Bronchiolitis in Guinea Pigs Immunized with Vaccines Directed against the hsp60 Molecule of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 2000, 68:3674-3679.
52. Zhu X, Venkataprasad N, Irazny J, Vordermeier HM: Vaccination with recombinant vaccinia viruses protects mice against Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunology* 1997, 92:6-9.
53. Delogu G, Li A, Repique C, Collins F, Morris SL: DNA vaccine combinations expressing either tissue plasminogen activator signal sequence fusion proteins or ubiquitin-conjugated antigens induce sustained protective immunity in a mouse model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 2002, 70:292-302.
54. McMurray DN: A coordinated strategy for evaluating new vaccines for human and animal tuberculosis. *Tuberculosis* 2001, 81:141-146.
55. Baulard A, Kremer L, Loch C: Efficient Homologous Recombination in Fast-Growing and Slow-Growing Mycobacteria. *J Bacteriol* 1996, 178:3091-3098.
56. Jackson M, Phalen SW, Lagranderie M, Ensergueix D, Chavaroc P, Marchal G, McMurray DN, Gicquel B, Guilhot C: Persistence and protective efficacy of a Mycobacterium tuberculosis auxotroph vaccine. *Infect Immun* 1999, 67:2867-2873.
57. Chambers MA, Williams A, Gavier-Widen D, Whelan A, Hall G, Marsh PD, Bloom BR, Jacobs WR, Hewinson RG: Identification of a Mycobacterium bovis BCG auxotrophic mutant that protects guinea pigs against M. bovis and haematogenous spread of Mycobacterium tuberculosis without sensitization to tuberculin. *Infect Immun* 2000, 68:7094-7099.
58. De Lisle GW, Wilson T, Collins DM, Buddle BM: Vaccination of guinea pigs with nutritionally impaired avirulent mutants of Mycobacterium bovis protects against tuberculosis. *Infect Immun* 1999, 67:2624-2626.
59. Wards BJ, de Lisle GW, Collins DM: An esa6 knockout mutant of Mycobacterium bovis produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. *Tuber Lung Dis* 2000, 80:185-189.
60. Gordon SV, Eigmeier K, Garnier T, Brosch R, Parkhill J, Barrrell B, Cole ST, Hewinson RG: Genomics of Mycobacterium bovis. *Tuberculosis* 2001, 81:157-163.
61. Spencer JS, Marques MAM, Lima MCBS, Junqueira-Kipnis AP, Gregory BC, Truman RV, Brennan PJ: Antigenic Specificity of the Mycobacterium leprae Homologue of ESAT-6. *Infect Immun* 2002, 70:1010-1013.
62. Luo Y, Chen X, Han R, O'Donnell MA: Recombinant bacille Calmette-Guérin (BCG) expressing human interferon-alpha 2B demonstrates enhanced immunogenicity. *Clin Exp Immunol* 2001, 123:264-270.
63. Young S, O'Donnell M, Lockhart E, Buddle B, Slobbe L, Luo Y, DeLisle G, Buchan G: Manipulation of immune responses to Mycobacterium bovis by vaccination with IL-2- and IL-18-secreting recombinant bacillus Calmette Guérin. *Immunol Cell Biol* 2002, 80:209-215.
64. Hess J, Kaufmann SH: Development of live recombinant vaccine candidates against tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 2001, 33:723-734.
65. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S: Recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the Mycobacterium tuberculosis 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:13853-13858.
66. Dannenberg AM, Bishai WR, Parrish N, Ruiz R, Johnson W, Zook BC, Boles JW, Pitt LM: Efficacies of BCG and vole bacillus (Mycobacterium microti) vaccines in preventing clinically apparent pulmonary tuberculosis in rabbits: a preliminary report. *Vaccine* 2000, 19:796-800.
67. Mielcarek N, Alonso S, Loch C: Nasal vaccination using live bacterial vectors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001, 51:55-69.
68. Stanford JL, Stanford CA, Grange JM, Lan NN, Etemadi A: Does immunotherapy with heat-killed Mycobacterium vaccae offer hope for the treatment of multi-drug-resistant pulmonary tuberculosis? *Res Med* 2001, 95:444-447.
69. Post FA, Manca C, Neyrolles O, Ryffel B, Young DB, Kaplan G: Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton lipoprotein inhibits Mycobacterium smegmatis-induced cytokine production by human macrophages in vitro. *Infect Immun* 2001, 69:1433-1439.
70. Yermeev VV, Stewart GR, Neyrolles O, Skrabal K, Avdienko VG, Apt AS, Young DB: Deletion of the 19 kDa antigen does not alter the protective efficacy of BCG. *Tuber Lung Dis* 2000, 80:243-247.
71. Williams A, Davies A, Marsh PD, Chambers MA, Hewinson RG: Comparison of the protective efficacy of bacille Calmette-Guérin vaccination against aerosol challenge with Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis. *Clin Infect Dis* 2000, Suppl 3:S299-S301.
72. Corner LA, Buddle BM, Pfeiffer DU, Morris RS: Vaccination of the brush tail possum (Trichosurus vulpecula) against Mycobacterium bovis infection with bacille Calmette-Guérin: the response to multiple doses. *Vet Microbiol* 2002, 84:327-336.
73. Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, Fineber HV: The efficacy of bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. *Pediatrics* 1995, 96:29-35.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
http://www.biomedcentral.com/info/publishing\_adv.asp

