



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA  
*Mycobacterium avium*.**

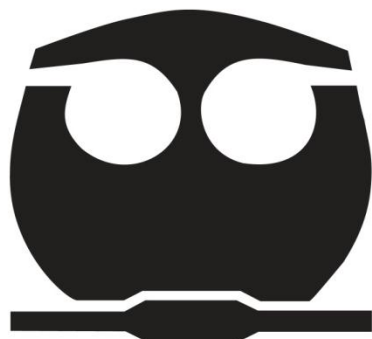
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**BRENDA ALEJANDRA MONTIEL ROJAS**



MÉXICO, D.F.

2011



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.

## JURADO ASIGNADO

**Presidente:** Luciano Hernández Gómez

**Vocal:** Marco Antonio Cerbon Cervantes

**Secretario:** Yolanda López Vidal

**1er Suplente:** Gonzalo Castillo Rojas

**2do: Suplente:** Antonia Isabel Castillo Rodal

**Sitio donde se desarrolló el tema:** Programa de Inmunología Molecular Microbiana, 4to piso del edificio de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.

**Asesor:** Dra. Yolanda López Vidal. \_\_\_\_\_

**Supervisor Técnico:** cDra. Patricia Orduña Estrada. \_\_\_\_\_

**Sustentante:** Montiel Rojas Brenda Alejandra. \_\_\_\_\_



## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y sus profesores.

A la Dra. Yolanda López Vidal por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su gran apoyo y asesoría para la realización de este trabajo.

A la cDra. Patricia Orduña Estrada por su asesoría, apoyo, paciencia y compañerismo durante la planeación y desarrollo experimental, por su ayuda incondicional gracias.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser, Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Experimental donde se realizó la inmunización y mantenimiento de los ratones.

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

Durante la realización de esta tesis gocé de una beca otorgada por el Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas del Macroproyecto “Nuevas estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública” dentro de la línea de investigación ENFERMEDADES INFECCIOSAS 10SDEI.PTID.05.4 y por DGAPA PAPIIT IN209708.

Este proyecto fue financiado por DGAPA IN209708 y CONACyT SALUD 2007-COI-68729.



## DEDICATORIA

Gracias a Dios por la vida, por darme las herramientas necesarias para cumplir con esta meta.

Dedico esta tesis a: mi papá, por apoyarme en todas las formas posibles, por su amor, por darme siempre todo lo que me hizo falta, por confiar en mí, por alentarme a seguir adelante, por sus consejos y por ser siempre el mejor papá del mundo; a mi mami preciosa, gracias mamá, por guiarme por el mejor camino, por tu ejemplo, por tu apoyo incondicional, por inculcarme valores que hacen de mi una gran persona.

Para mi hermano: Moncho!!, gracias por comprenderme, por tu paciencia y compañía, por hacer de cada momento malo algo mejor, por ser tan ocurrente y compartir tu alegría conmigo. Te amo hermano.

Con mucho cariño para: mi Abue y mi tía Horte, gracias por creer en mí, por su inmenso amor, por cuidarme, protegerme y hacerme muy muy feliz, gracias a ustedes soy lo que soy, las quiero inmensamente, para mi Tío Paco, mi Tía Mara y mi Tía Lulú por su infinito amor, por saber que cuento con ustedes, por comprenderme, por su apoyo incondicional y darme los mejores consejos y palabras que puedo recibir, por no dudar de mi ni un solo momento, a mi familia que es mi orgullo, a todos los manatís... Gracias por entenderme y por todo su apoyo.

Para mi amorcito hermoso: Gerardo, gracias por compartir conmigo estos años como Universitarios, gracias por cada momento, por crecer a mi lado, por tu apoyo y tu inmenso amor que me has demostrado, gracias por entenderme y alentarme a seguir adelante, mil gracias te amo!!

A mis amigos de siempre: Alan, Faby y Gaby, por estar conmigo en cada etapa de mi vida, por su apoyo incondicional cuando más lo necesité.

A mis mejores amigas: Saris, por ser mi ejemplo de fortaleza y valentía, por tratar de comprenderme, aceptarme como soy y por disfrutar de la vida juntas, a mi Anita bonita, por estar conmigo y hacer de esta vida estudiantil algo menos complicado, porque sin mi planeta favorita!! nunca lo hubiese logrado, a Xanic, por ser diferente, por ser como es, por compartir conmigo un



poco de su suerte al tenerla como amiga y compañera de clases, a Viri, por aceptarme como soy, por decirme siempre cosas muy bonitas como solo ella sabe hacerlo, por alegrarme cada día, por hacer en mi el querer ser mejor, por enseñarme a hacer las cosas lo más simples que puedo pero no más simples.

A mis amigos QFB's: Edgar, Alex, Ulises, Richard y Paco, los quiero!!, seremos colegas toda la vida!!!, gracias por tantas experiencias fuera y dentro de la Facultad.

A mis amigos de la Facultad de Química: Fer, Marina, Val, Beto, Dany, Jacks y Oscar, por hacer de estos años memorables y al mejor grupo de la Facultad de Química, el Grupo 4, donde conocí a personas maravillosas con los que inicié y siempre compartiré el gusto por la Química.

Al Programa de Inmunología Molecular Microbiana: Dr. Gonzalo, Dra. Maritona, Erick, Fu, Gaby, Germán, Karensita, Katya, Lalo, Lulú, Mary, Paco, Paty, René, Ricardo, Steph y Viri por su amistad, compañerismo y apoyo en la realización de ésta Tesis.

Para la Dra. Yolanda: Mil Gracias.



## INDICE

RESUMEN .....	4
ABREVIATURAS.....	5
1. INTRODUCCIÓN .....	8
1.1 MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS.....	8
1.2 COMPLEJO <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> .....	15
1.3 IDENTIFICACIÓN DE MNT. ....	18
1.4 ANTICUERPO MONOCLONAL.....	28
2. JUSTIFICACIÓN .....	31
3. OBJETIVO .....	32
4. HIPÓTESIS .....	33
5. METODOLOGÍA.....	34
6. RESULTADOS.....	45
6.1 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS Y MACROSCÓPICAS DE <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> .....	45
6.2 INMUNIZACIÓN Y ANÁLISIS DE SUERO DE LOS RATONES INMUNIZADOS. ....	46
6.3 FUSIÓN, CLONACIÓN, SELECCIÓN Y PROLIFERACIÓN DEL HIBRIDOMA. ....	49
6.4 CARACTERIZACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL.....	52
<i>Ensayo de reacción cruzada con otras micobacterias</i> .....	52
<i>Inmunoproteoma</i> .....	53
7. DISCUSIÓN.....	58
8. CONCLUSIONES.....	65
ANEXO 1 .....	66
ANEXO 2 .....	68
ANEXO 3 .....	70
ANEXO 4 .....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	76



---

---

## RESUMEN

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) se encuentran ampliamente distribuidas en el ecosistema, causan patologías en individuos inmunocompetentes pero principalmente en inmunocomprometidos. El complejo *Mycobacterium avium* (CMA) es la principal causa de enfermedades en el humano por MNT. *M. avium* forma parte del CMA, es la principal causa de enfermedad pulmonar ocasionada por MNT también es causa de linfadenitis y enfermedad diseminada, los síntomas y signos de estas enfermedades son indistinguibles de los causados por *Mycobacterium tuberculosis*, por lo que su identificación ha cobrado gran importancia. Actualmente los métodos para su identificación presentan inconvenientes en la especificidad, tiempo de realización y costo; la utilización de un anticuerpo monoclonal (AcMo) puede ser una opción más para la identificación de *M. avium*. El objetivo del presente trabajo fue la producción de Ma contra *M. avium* y su caracterización mediante un ensayo de reactividad cruzada con otras MNT y micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) y un inmunoproteoma para la identificación de las proteínas de *M. avium* reconocidas por el anticuerpo.

Para producir el anticuerpo se inmunizó ratones hembras BALB/c con *M. avium*, el ratón que produjo una mayor respuesta humoral se seleccionó para realizar la fusión entre esplenocitos y células de mieloma. Posteriormente, se seleccionó seis clonas con el hibridoma productor de anticuerpo que presentaron la mayor reactividad a *M. avium*, la clona AcMa:3H1 tuvo el mayor reconocimiento y fue la clona utilizada para su expansión y caracterización.

En el ensayo de reactividad cruzada el mayor reconocimiento se obtuvo para *M. avium* proveniente de un aislamiento ambiental y un aislamiento clínico, las MNT que no tuvieron reactividad fueron *M. nonchromogenicum* y *M. kansasii*, las cepas pertenecientes al CMT mostraron reactividades variadas. A partir del inmunoproteoma se identificaron y secuenciaron cuatro proteínas reconocidas por el anticuerpo producido, se encontró que estas proteínas son comunes con otras especies de micobacterias y que hay secuencias de aminoácidos conservadas entre ellas. En conclusión, se produjo y caracterizó anticuerpo contra *M. avium* que muestra reactividad cruzada contra otras micobacterias ya que los epítopes reconocidos son comunes entre las cepas estudiadas.





---

**ABREVIATURAS**

CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfato
AAR	Ácido alcohol resistencia
ADN	Ácido desoxirribonucléico
ARN	Ácido ribonucleico
APRT	Adenina fosforribosil transfersa
H2O <sub>d</sub>	Agua desionizada
BSA	Albúmina sérica bovina
AcMo	Anticuerpo monoclonal
AcMa: 3H1	Anticuerpo monoclonal contra <i>M. avium</i>
aa	Aislamiento ambiental
ac	Aislamiento clínico
BCG	Bacilo de Calmette y Guerin
CMA	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
CMT	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CG	Cromatografía de gases
CCF	Cromatografía en capa fina
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
SDS	Dodecil sulfato de sodio
2-DE	Electroforesis de doble dimensión
2-D PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida de doble dimensión
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
EPOC	Enfermedad obstructiva crónica
ELISA	Ensayo Inmuno-absorción ligado a enzimas
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
GPL	Glicopeptidolípidos
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
HAT	Hipoxantina Aminopterina y Timidina



---



---

HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
Ip	Intraperitoneal
IAA	Iodoacetamida
MNT	Micobacteria no tuberculosa
MOTT	Micobacterias diferentes al bacilo de la tuberculosis
MAI	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>
TEMED	N, N, N, N'-tetrametilendiamina
HRP	Peroxidasa de rábano
APS	Persulfato de amonio
PVC	Policloruro de vinilo
PEG	Polietilenglicol
PVDF	Polivinilidenofluoruro
pH	Potencial de Hidrógeno
RCF	Radial fuerza centrífuga
SIDA	Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida
ATS	Sociedad de Tórax Americana
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBS-T	Solución amortiguadora de fosfatos con Tween 20
TBS-T	Solución amortiguadora de Tris con tween 20
SSI	Solución salina isotónica
SFB	Suero fetal bovino
T	Tiempo
TMP	Timidilato
TK	Timidina cinasa
TG	Tracto gastrointestinal
TR	Tracto respiratorio
TB	Tuberculosis
UR	Unidades relativas
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana



## Unidades

A	Amperio
° C	Grado Celisius
G	Gramo
H	Hora
L	Litro
µg	Microgramo
µl	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milimetro
Mm	Milimolar
min	Minutos
M	Molar
V	Volt
V/h	Volt/hora
W	Watt
kGy	Kilogray



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Micobacterias no tuberculosas.

Las Micobacterias no tuberculosas (MNT) pertenecen al género *Mycobacterium* de la familia mycobactereacea del orden de los actinomicetales, son ubicuas ya que han sido aisladas de ambientes terrestres, acuáticos y de vegetación como son: *suelo, plantas, animales, fuentes naturales de agua y fuentes de agua elaboradas por el humano como suministros de agua potable, contenedores de agua como cisternas, albercas, tuberías, regaderas, unidades de agua para uso dental de comida y de animales.* [1-3]

El número de especies y subespecies del género *Mycobacterium* está en permanente aumento llevando a la descripción de más de 180 miembros [4]. El género *Mycobacterium* es clasificado de diferentes formas, una de ellas es de acuerdo a su característica de patogenicidad conformando tres grupos: las pertenecientes al “complejo *Mycobacterium tuberculosis*” (CMT), *Mycobacterium leprae*, especies patógenas para el humano y las MNT ó micobacterias ambientales consideradas como patógenos oportunistas aisladas de fuentes naturales.[5, 6]

Las MNT ó micobacterias ambientales han sido nombradas de diferentes formas: micobacterias atípicas (termino concedido por Pinner, 1935), ambientales, oportunistas, no clasificadas, micobacterias diferentes al bacilo de la tuberculosis (MOTT por sus siglas en ingles) y Micobacterias No Tuberculosas (MNT); de acuerdo a la Sociedad de Tórax

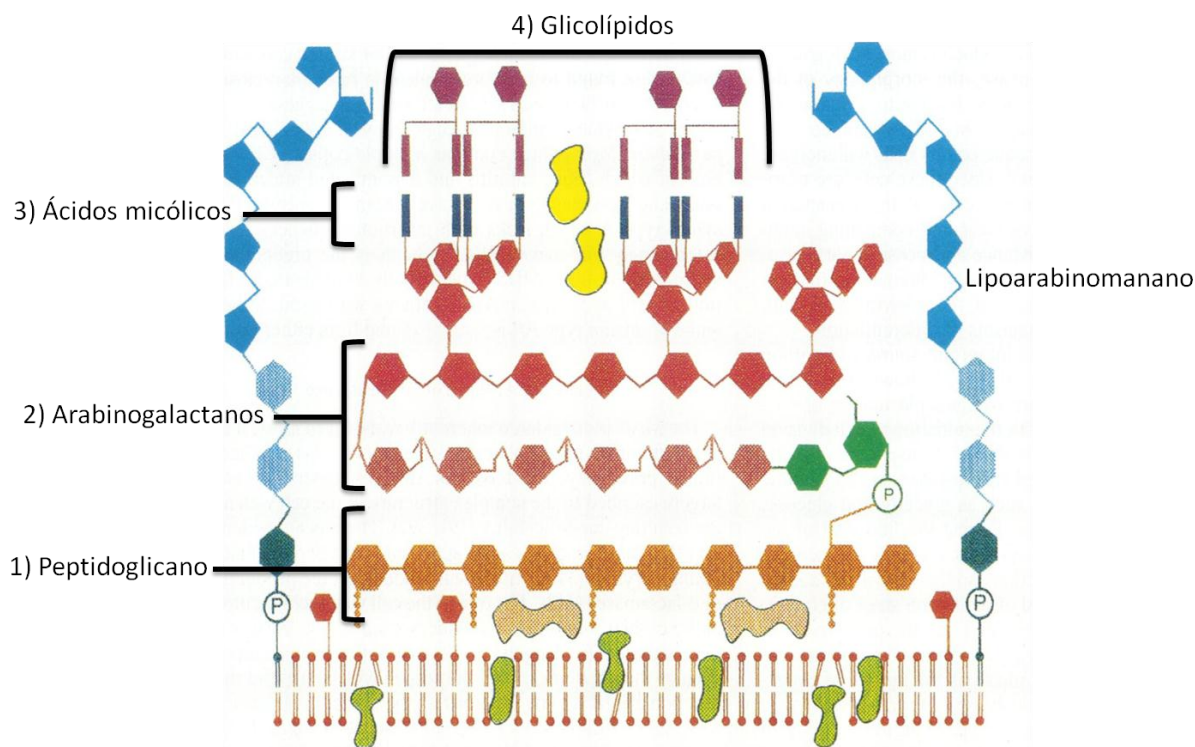


Americana (ATS) este último término es el que se prefiere para nombrar a esta clase de micobacterias.

Las especies de este género presentan un alto contenido de G+C en su ADN (61-71%, excepto *M. leprae* que contiene 55%), característica compartida por otros géneros que también poseen ácidos micólicos en la pared celular, como son: *Nocardia*, *Actinomices* y *Rhodococcus*.

Las micobacterias poseen una pared celular gruesa con un elevado contenido lipídico que constituye el 60% del peso seco de la misma, la pared consta de cuatro envolturas: la más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico; la segunda está constituida por arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera envoltura formada por ácidos grasos de cadena larga (60 a 90 átomos de carbono); la envoltura más externa es constituida por glicolípidos, en conjunto, esta composición de la pared confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad que es responsable de la ineficiencia de múltiples agentes antimicrobianos, así como la característica de ácido-alcohol resistencia (AAR) en tinciones para su visualización microscópica; la Figura 1 corresponde a una representación esquemática de la estructura de la pared celular de las micobacterias que muestra su orientación y relación entre los diferentes componentes.[7]





**Figura 1 Representación esquemática de la pared celular de las micobacterias.** Se muestran las 4 envolturas de la pared celular: 1) Peptidoglicano, 2) Arabinogalactano, 3) Ácidos micólicos, 4) Glicolípidos. (Modificado de Inderlied, 1993). [7]

### 1.1.1 Clasificación de micobacterias no tuberculosas.

Las especies de MNT fueron clasificadas en el año de 1959 por Runyon, que divide a las MNT en cuatro grupos: I) *Fotocromógenos*, II) *Escotocromógenos*, III) *No Fotocromógenos* y IV) *de rápido crecimiento*; esta clasificación se basa en la velocidad de crecimiento, la morfología de las colonias y en la capacidad de producir o no un pigmento. La clasificación de Runyon se presenta en la Tabla 1.[5, 8]

La clasificación de Runyon es utilizada por microbiólogos como la herramienta principal para la identificación de especies de MNT. En los últimos años esta clasificación adquirió menor relevancia debido a los avances en las técnicas rápidas de cultivo, pruebas



de ADN, cromatografía etc, además esta clasificación tiene poco valor clínico ya que los organismos clasificados dentro de un determinado grupo de Runyon son causa de diferentes enfermedades.

**Tabla 1 Clasificación de Runyon.**

	<b>Grupo I Fotocromógenos</b>	<b>Grupo II Escotocromógenos</b>	<b>Grupo III No fotocromógenos</b>	<b>Grupo IV De rápido crecimiento</b>
<b>Características</b>	Colonias visibles en un periodo de 2 a 4 semanas. Producen pigmento en presencia de luz.	Colonias observables en un periodo de 2 a 4 semanas. Forman pigmento tanto en presencia de luz como en ausencia de ella.	Colonias perceptibles en un lapso de 2 a 4 semanas. No producen pigmento ni bajo la luz ni en la oscuridad.	Colonias visibles después de 3 a 5 días. Carecen de Pigmentación
<b>Ejemplos</b>	<i>M. kansasii</i> <i>M. mariun</i> <i>M. simiae</i>	<i>M. gordonae</i> <i>M. aurum</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. celatum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i>	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. abcessus</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. smegamatis</i> <i>M. mucogenicum</i>

Un sistema de clasificación más apropiado para la clínica es el que agrupa a las MNT de acuerdo a la enfermedad que causan, esta clasificación divide a las MNT en cinco grupos: a) enfermedad pulmonar, b) linfadenitis, c) enfermedad cutánea, d) enfermedad diseminada ó



miliar y e) *otras enfermedades* como Paratuberculosis; algunas de las principales MNT que causan las enfermedades mencionadas se muestran en la Tabla2.[5, 8, 9]

**Tabla 2 Clasificación de las principales MNT de acuerdo a la enfermedad que causan.[5]**

Enfermedad	MNT causantes de la enfermedad
a) Enfermedad pulmonar.	<p><b>CMA (Complejo <i>M. avium</i>)</b></p> <p><i>M. kansasii</i></p> <p><i>M. abscessus</i></p> <p><i>M.chelonae</i></p> <p><i>M. fortuitum</i></p> <p><i>M. simiae</i></p> <p><i>M. xenopi</i></p>
b) Linfadenitis.	<p><b>CMA (Complejo <i>M. avium</i>)</b></p> <p><i>M. kansasii</i></p> <p><i>M. scrofulaceum</i></p>
c) Enfermedad cutánea.	<p><i>M. abscessus</i></p> <p><i>M. chelonae</i></p> <p><i>M.nonchromogenicum</i></p> <p><i>M. szulgai</i></p> <p><i>M. marinum</i></p> <p><i>M. ulcerans</i></p> <p><i>M. vaccae</i></p>
d) Enfermedad diseminada.	<p><b>CMA (Complejo <i>M. avium</i>)</b></p> <p><i>M. kansasii</i></p> <p><i>M. chelonae</i></p> <p><i>M. scrofulaceum</i></p>
e) Otras enfermedades. (Paratuberculosis).	<p><i>M. avium subsp. paratuberculosis</i></p>





### 1.1.2 Importancia clínica de las Micobacterias no tuberculosas.

A partir de 1982 el número de casos de infecciones en humanos asociados a MNT incrementó notoriamente asociado a personas con deficiencia inmunológica producida por diferentes causas pero especialmente aquellos con el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), las infecciones ocasionadas por estas micobacterias son responsables de una causa importante de mortalidad.[3, 10-13]. Las MNT son reconocidas en la actualidad como agentes causales de patologías en individuos inmunocompetentes pero principalmente con deficiencia inmunológica.[6, 14, 15]

Existen diferentes causas que predisponen a las infecciones por MNT, algunas son alteraciones a nivel local secundarias a un procedimiento quirúrgico, traumatismos en tejidos blandos o huesos, alcoholismo, afectaciones del sistema inmune local como es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) ó alteraciones del sistema inmune a nivel general como la diabetes ó SIDA entre otros, algunas de estas alteraciones se mencionan en la Tabla 3.[5, 10]

**Tabla 3 Clasificación de las principales MNT de acuerdo a la enfermedad que causan.[5]**

Alteraciones a nivel local.	Alteraciones del sistema inmune.
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.</li> <li style="padding-left: 40px;">-Enfisema pulmonar.</li> <li>-Aspiraciones realizadas previamente debido a enfermedades esofágicas.</li> <li>-Procedimientos quirúrgicos.</li> <li style="padding-left: 40px;">-Daño en piel.</li> <li style="padding-left: 40px;">-Alcoholismo crónico.</li> <li style="padding-left: 40px;">-Tabaquismo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li style="text-align: center;">-SIDA</li> <li style="padding-left: 40px;">-Uso de agentes inmunosupresores utilizados en pacientes con enfermedades autoinmunes y aquellos que fueron sometidos a trasplantes.</li> </ul>



En ausencia de evidencia de la transmisión de persona a persona en enfermedades debidas a MNT se propone que los humanos son infectados vía inhalación de aerosoles, ingestión por agua ó alimentos contaminados ó por la adquisición directamente secundaria a un traumatismo por lo que el tracto respiratorio (TR) y el tracto gastrointestinal (TGI) son las principales rutas de contagio para la mayoría de las enfermedades causadas por MNT.[5, 10, 16].

Algunas evidencias de estos tipos de transmisión son resultado de la asociación de las MNT con enfermedades ocupacionales y nosocomiales. Se ha demostrado por diferentes autores que los trabajadores expuestos a aerosoles generados en la fundición de metales, aquellos que laboran como salvavidas en albercas y aquellos que están en contacto con materiales de construcción dañados por el agua son susceptibles a desarrollar infecciones diversas originadas por las MNT. Existe otro grupo de personas que presentan una enfermedad de base como se mencionó anteriormente y que resultan más susceptibles para desarrollar infecciones por MNT. En los hospitales, el desarrollo de infecciones respiratorias en pacientes con padecimientos pulmonares crónicos ó inmunodeficiencias y también infecciones en la piel como abscesos cutáneos puede deberse a la contaminación de abastecimientos de agua, a la formación de biopelículas en equipo médico y a la contaminación de soluciones utilizadas en la desinfección de la piel.[2, 10, 16, 17]

Los diferentes estudios realizados reportan que del total de micobacterias descritas en la actualidad, las especies más comúnmente aisladas en laboratorios pertenecen al Complejo *M. tuberculosis*, al Complejo *M. avium* (CMA) y al grupo de las MNT de rápido crecimiento. De las MNT aisladas de muestras clínicas se ha reportado que las del CMA son la principal causa de enfermedades en el humano (70%). [10, 15, 18-20]



---

---

## 1.2 Complejo *Mycobacterium avium*.

Los miembros del CMA son implicados en enfermedades nosocomiales y ocupacionales, las rutas de infección comunes son la inhalación de aerosoles y la ingestión de agua y comida contaminada. La caracterización y definición de la especie *M. avium* ocurrió en el año de 1990 con un estudio publicado por Thorel y Col., en el cual se definen cuatro subespecies principales: *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. intracellulare* y *M. avium* subsp. *avium*, a continuación se menciona brevemente la definición para cada una.[7, 8, 10, 18, 20-23]

***M. avium* subsp. *silvaticum*:** Es el organismo causante de lesiones similares a la TB en palomas.

***M. avium* subsp. *paratuberculosis*:** Es el agente etiológico de la enfermedad de Johne o paratuberculosis en rumiantes y ganado; esta enfermedad representa un problema serio para la ganadería.

***M. intracellulare*:** Es causa casi exclusivamente de enfermedad diseminada en humanos enfermos de SIDA y contribuye a ocasionar infecciones pulmonares asociadas al MAC.

***M. avium* subsp. *avium*:** Esta subespecie incluye a *M. avium* causante de enfermedad en aves y al agente que causa enfermedades en el humano; recientemente se ha propuesto la introducción de la denominación *M. avium* subsp. *hominissuis* para distinguir organismos aislados de humanos y puercos de los encontrados en aves ya que estudios a nivel fenotípico y genético han demostrado evidencia en la diferencia entre estas cepas. Es la subespecie del CMA más prevalente en muestras clínicas y ambientales, es de importancia



clínica para humanos y animales llamada recientemente “Micobacteria ambiental potencialmente patógena” ya que diferentes reportes señalan que es la principal causa de *enfermedad pulmonar por MNT, linfadenitis en niños y enfermedad diseminada ó miliar* en pacientes enfermos de SIDA, por lo que su identificación es de gran importancia.[7, 10, 20]

### **Enfermedad pulmonar**

Es la manifestación clínica más común causada por MNT, el Complejo *M. avium* y *M. kansasii* son las principales especies identificadas como causantes de esta enfermedad. El primer caso reportado de enfermedad en humanos a causa del CMA se reportó en el año de 1943 por enfermedad pulmonar por *M. avium*. Al iniciar la emergencia del SIDA en 1980 la infección pulmonar fue la presentación clínica más común a causa del CMA.

La enfermedad pulmonar producida por *M. avium* se presenta preferentemente en mujeres blancas entre 45 y 65 años de edad aunque hay variación considerando el sexo y edad en la cual se presenta ésta enfermedad; la adquisición ocurre por diversas vías como se ha mencionado y las personas más susceptibles presentan mayor riesgo para desarrollarla (ver Tabla 3).

El establecer que el agente causal de la neumonía es por *M. avium* se dificulta ya que los síntomas de la enfermedad pulmonar a causa de *M. avium* no son específicos, la enfermedad pulmonar es indistinguible de la producida por *Mycobacterium tuberculosis* y otras neumonías bacterianas. En los enfermos con SIDA la determinación del agente etiológico se dificulta ya que puede estar involucrado más de un organismo patógeno.

En el año de 1997 la ATS publicó los criterios para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad pulmonar causada por MNT, el criterio para el diagnóstico de la enfermedad



---

---

incluye la evaluación de los síntomas clínicos, el análisis bacteriológico de muestras clínicas y estudios radiográficos. La falla en la identificación de la micobacteria causante de la enfermedad y en consecuencia el no dar un tratamiento farmacológico específico y oportuno es causa de un daño pulmonar grave.

El tratamiento para la enfermedad pulmonar debida al CMA no tratada consiste en tres o cuatro fármacos (*claritromicina o azitromicina, rifampicina, etambutol, y amikacina*) prescritos por un lapso de 12 a 24 meses y cuando un paciente no responde a este tratamiento debe realizarse una prueba de susceptibilidad a los fármacos.[7, 10, 12, 14, 22, 24-26]

### **Enfermedad diseminada**

La mayoría de las MNT causan infecciones diseminadas, el agente etiológico más frecuente es el CMA. En un estudio realizado en 1990 se encontró que en los casos de enfermedad diseminada asociada a MNT en pacientes enfermos de SIDA, la gran mayoría (96 al 98%) era a causa de microorganismos del CMA de los cuales el 98% de aislamientos correspondían a *M. avium*. Los microorganismos del CMA son comúnmente aislados de muestras clínicas de pacientes con SIDA sin presentar ninguna enfermedad aparente y su aislamiento es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad diseminada.

La infección comienza como un proceso localizado comúnmente en el TGI o en el TR ya que es adquirida frecuentemente por la ingestión de agua contaminada o la inhalación de aerosoles que contienen a *M. avium*. El diagnóstico de la enfermedad se confirma por el aislamiento y la identificación de *M. avium* en cultivos de sangre, medula ósea o biopsias. A



pesar del uso de diferentes agentes antimicrobianos la mayoría de los casos son mortales. [7, 10, 18, 20, 22, 26]

## **Linfadenitis**

La linfadenitis es la inflamación de los ganglios submandibulares, cervicales, submaxilares y preauriculares; la forma más conocida es la linfadenitis cervical la cual involucra a niños de 1 a 5 años de edad. La mayoría de los casos de linfadenitis son causados por microorganismos del CMA, que generalmente son resistentes a varios fármacos incluyendo los antibióticos de primera elección para la tuberculosis. El tratamiento de elección consiste en la cirugía de los ganglios linfáticos afectados; en caso de alguna contraindicación para la cirugía se da el tratamiento farmacológico que consiste en un macrólido, rifampicina, y etambutol por un periodo mínimo de seis meses.[7, 10, 22]

### **1.3 Identificación de MNT.**

#### **1.3.1 Técnicas convencionales.**

##### **Microscopía (Tinciones).**

Las micobacterias son microorganismos difíciles de teñir con los colorantes habituales a causa del alto contenido de lípidos de su pared celular. Las tinciones que se utilizan en el examen microscópico de micobacterias son la de Ziehl-Neelsen y la tinción con Auramina-rodamina; para lograr la penetración del colorante al interior de la micobacteria se debe



recurrir al calor o a determinados detergentes según el método utilizado. Una vez dentro, el colorante no podrá ser extraído tras la exposición al alcohol-ácido o ácidos minerales; esta propiedad se denomina ácido-alcohol resistencia (AAR) y es útil para la visualización de este grupo específico de bacterias.

Existen diversos factores que condicionan estas técnicas: a) tipo de muestra, b) cantidad de muestra procesada, c) concentración de bacterias en la muestra, d) tipo de tinción realizada, e) experiencia del observador y f) otros microorganismos que pueden presentar diferentes grados de AAR como: *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordona*, *Legionella micdadei* y los ooquistes de *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Sarcocystis* y *Cyclospora*. [1]

### **Cultivo.**

La identificación de las micobacterias en base a la clasificación de Runyon se basa en la velocidad de crecimiento (crecimiento lento y crecimiento rápido) y en las características macroscópicas de las colonias (producción de pigmento y morfología de las colonias). Las micobacterias no tuberculosas presentan un amplio rango de variabilidad morfológica en sus colonias lo que dificulta la diferenciación de especies mediante la observación de la morfología del cultivo. [1, 19]

### **Pruebas bioquímicas.**

En el año de 1992 se propusieron los requisitos mínimos para la identificación de especies de micobacterias de crecimiento lento, entre estos se encuentra la utilización de un



número limitado de pruebas bioquímicas como son: la catalasa semicuantitativa y termotolerancia de la misma, hidrólisis del Tween 80, ureasa, producción de niacina, reducción de nitratos, actividad fosfatasa ácida, actividad arilsulfatasa, actividad pirazinamidasas, actividad  $\pm$ -esterasa, resistencia a la isoniazida, hidroxilamina,  $\pm$  ácido *p*-nitrobenzoico, NaCl, tiacetazona, picrato y oleato, así como la capacidad de crecer a diversas temperaturas (Tabla 4). Las pruebas bioquímicas mencionadas muestran resultados variables dentro de una misma especie y entre micobacterias de crecimiento rápido por lo que se ha propuesto un esquema de identificación para las especies no pigmentadas de crecimiento rápido basado fundamentalmente en la capacidad de crecer en medios con determinados azúcares como única fuente de carbono. Sin embargo, este esquema no es válido para el amplio grupo de MNT de crecimiento rápido pigmentadas ya que la variabilidad de los resultados hace virtualmente imposible una caracterización correcta, teniendo que recurrir a técnicas moleculares (Tabla 5).[1]

El empleo de las pruebas bioquímicas para la identificación de MNT presenta diversas desventajas entre las que se encuentran: perfiles bioquímicos compartidos entre diferentes especies de MNT, la necesidad de un gran inóculo (cultivos muy crecidos) y la lentitud en la obtención de resultados. Los resultados de las pruebas bioquímicas en el caso del CMA son poco útiles para la diferenciación debido a la alta variabilidad en los resultados, a pesar de ello, las pruebas bioquímicas se siguen utilizando por diferentes razones: una ventaja es que son sencillas de realizar, económicas y no requieren de un gran equipo aunque la identificación de las micobacterias mediante pruebas bioquímicas exige experiencia y conocimiento de su fundamento; además de que la identificación no se basa sólo en una prueba por muy específica que parezca (caso de la niacina y *M. tuberculosis*), sino en los resultados coherentes de un conjunto de ellas.[1, 18, 19]





### 1.1.1 Métodos cromatográficos.

El análisis cualitativo de la composición lipídica de la pared de las micobacterias mediante técnicas cromatográficas permite diferenciar especies o grupos de especies.

Existen tres tipos de técnicas cromatográficas utilizadas: cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de gases (CG) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La muestra a analizar se obtiene a partir de una cepa a la cual se le realiza un proceso de extracción y separación de lípidos del resto de los componentes celulares y de un tratamiento que facilita su migración o volatilidad. Los métodos cromatográficos permiten la identificación de especies, con sus limitaciones, en un periodo razonablemente rápido (1-2 días).[1]

#### a) Cromatografía en capa fina (CCF)

La CCF es la de menor poder de discriminación, y por lo tanto es poco utilizada. Los extractos de las muestras se depositan en placas de cristal o de aluminio que actúan como soporte de una capa de gel de sílice, estas placas se someten a un proceso de difusión utilizando uno o dos eluyentes; posteriormente se revelan evidenciando de 1 a 3 manchas cromatográficas que definen patrones de migración de seis tipos de ácidos micólicos (I-VI).

El inconveniente de la CCF es que es una técnica de baja discriminación, sobre todo para las especies de crecimiento lento las cuales comparten el mismo patrón; su principal ventaja es la fácil estandarización y la necesidad de una infraestructura mínima.[1]





### Identificación bioquímica de las micobacterias de crecimiento lento más frecuentes.

Especie	NIA	NIT	AS	Tw	URE	NaCl	C-SQ	C-68°	INH	INH	HIDRO	P-NB	OLE	PZA	22°C	22°C	37°C	42°C	PIGMENTO
				80					1	1									
<i>M. avium</i>	-	-	-	-	-	-	-	V	S	S	V	+	+	+	+	+	+	+	NO
<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	-	-	V	+	S	S	+	+	+	+	+	+	+	V	NO
<i>M. ulcerans</i>	-	-	-	-	V	-	-	-	S	V	+	V	-	-	+	+	V	-	NO
<i>M. genavense</i>	-	-	-	-	+	ND	+	+	S	ND	ND	ND	ND	+	-	+	+	+	NO
<i>M. bovis</i>	-	-	-	V	+	-	-	-	R	R	-	-	-	-	ND	+	+	-	NO
<i>M. nonchromogenicum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	S	S	+	V	V	+	+	+	+	V	NO
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	-	V	+	-	-	-	R	R	-	-	-	+	ND	+	+	-	NO
<i>M. haemophilum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	S	ND	-	+	ND	+	+	+	-	-	NO
<i>M. celatum</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	S	R	-	+	ND	ND	-	+	+	+	NO
<i>M. terrae</i>	-	V	-	+	-	-	+	+	S	S	+	+	V	-	+	+	+	-	NO
<i>M. triplex</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	S	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	-	NO
<i>M. triviale</i>	-	+	-	V	-	+	+	+	S	S	ND	+	ND	-	+	+	+	-	NO
<i>M. africanum</i>	V	V	-	V	+	-	-	-	R	R	-	-	-	V	-	V	+	V	NO
<i>M. microtii</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	R	R	-	-	-	+	ND	ND	+	-	NO
<i>M. malmoense</i>	-	-	-	+	V	-	-	V	S	R	V	+	-	+	+	+	+	-	NO
<i>M. kansasii</i>	-	+	V	+	+	-	+	+	R	R	-	+	-	-	+	+	+	V	FOTO
<i>M. marinum</i>	-	-	V	+	+	-	V	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	V	-	FOTO
<i>M. asiaticum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	S	V	+	-	+	-	+	+	+	-	FOTO
<i>M. simiae</i>	v	-	-	-	+	-	+	+	S	V	+	+	V	+	+	+	+	+	FOTO
<i>M. lentiflavum</i>	-	-	-	-	-	ND	V	V	S	ND	+	+	V	V	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. scrofulaceum</i>	-	V	-	-	+	-	+	+	S	S	+	+	+	+	ND	+	+	+	ESCOTO
<i>M. goodii</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	S	V	V	+	V	-	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. xenopi</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	S	R	-	V	-	+	-	V	+	+	ESCOTO
<i>M. szulgai</i>	-	+	-	V	+	-	+	+	S	ND	-	+	+	+	+	+	+	-	ESCOTO

**Tabla 4 Identificación bioquímica de las micobacterias de crecimiento lento más frecuentes.**

NIA: Niacina; NIT: Nitratos; AS: Arilsulfatasa (3 días); Tw80: Tween 80; URE: Ureasa; NaCl: NaCl 5%; C-SQ: Catalasa semicuantitativa; C-68°: Catalasa termoestable (68°C); INH 1: Isoniacida 1 µg/ml; INH 10: Isoniacida 10 µg/ml; HIDRO: Hidroxilamina; P-NB: ácido p-nitrobenzoato; OLE: Oleato; PZA: Pirazinamidasas; 22°C, 30°C, 37°C, 42°C: Temperaturas de incubación; +: Positivo; -: Negativo; V: Variable; ND: no determinado; S: Sensible; R: Resistente; FOTO: Fotocromógeno; ESCOTO: Escotocromógeno; NO: No cromógeno. [1]



### Identificación fenotípica de micobacterias de crecimiento rápido.

Especie	AS	CINa	McC	Captación de Fe	Manitol	Inositol	Sorbitol	Citrato	Nitratos	30°	37°	42°	Pigmento
<i>M. thermoresistibile</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	ESCOTO
<i>M. aurum</i>	V	V	-	+	+	+	-	+	V	+	+	-	ESCOTO
<i>M. neoaurum</i>	-	ND	-	ND	+	+	ND	+	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. gadium</i>	-	ND	ND	-	ND	+	+	-	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. flavescens</i>	-	+	-	-	V	-	+	-	+	+	+	V	ESCOTO
<i>M. novocastrense</i>	-	+	+	-	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	FOTO
<i>M. alvei</i>	+	-	-	-	-	-	ND	-	+	+	+	-	NO
<i>M. brumae</i>	-	-	-	+	-	+	ND	+	+	+	+	-	NO
<i>M. elephantis</i>	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	+	+	NO
<i>M. porcinum</i>	+	+	ND	ND	+	+	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. peregrinum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. fortuitum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	NO
<i>M. boenickei</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. houstonense</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NO
<i>M. neworleansense</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. brisbanense</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+		NO
<i>M. mucogenicum</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	V	+	+	-	NO
<i>M. mageritense</i>	+	+	+	V	+	V	ND	V	V	+	+	+	NO
<i>M. canariensis</i>	+	-	+	-	+	+	ND	-	-	+	+	-	NO
<i>M. abscessus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	NO
<i>M. chelonae</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	NO
<i>M. immunogenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	NO
<i>M. septicum</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. smegmatis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NO
<i>M. wolinskyi</i>	-	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	NO
<i>M. goodii</i>	-	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	NO/ESCOTO

**Tabla 5. Identificación fenotípica de las micobacterias de crecimiento rápido más frecuentes.** AS: Arilsulfatasa (3 días); CINa: crecimiento en 5% de CINa; McC: crecimiento en agar de McConkey sin cristal violeta; 30°C, 37°C y 42°C: temperaturas de incubación; +: Positivo; -: Negativo; V: Variable; ND: No determinado; ESCOTO: Escotocromógeno; FOTO: Fotocromógeno; NO: No

**b) Cromatografía de gases (CG).**

El poder de resolución de la CG es mayor que el de la CCF, permite la detección cualitativa de metil-ésteres de ácidos grasos de los ácidos micólicos. La CG consiste en la inyección de la muestra previamente tratada en un cromatógrafo equipado con una columna capilar o semicapilar, la muestra se volatiliza por efecto de la temperatura de inyección y viaja con un gas transportador a través de la columna que a su vez consta de un relleno interior que es la fase estacionaria capaz de interactuar con diversos componentes de la muestra, de forma que sustancias que no interesen pueden quedarse retenidas en la columna. Los ácidos grasos son los productos a analizar que en la columna se separan según la longitud de su cadena, siendo expulsados en orden de menor a mayor tamaño. Un sistema de detección permite establecer el tiempo de retención que cada ácido graso ha tenido en el interior de la columna y los resultados se registran en forma de una línea continua interrumpida por picos, de mayor o menor amplitud o altura dependiendo de su concentración y rapidez de salida, representando cada uno a un ácido graso. La mayoría de las especies de importancia clínica tienen un patrón específico, otros compartidos por más de una especie (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*) y el resto, entre ellas las especies del CMT patrones inespecíficos que únicamente tienen valor de exclusión.

La CG es una técnica muy útil en la identificación de aislamientos clínicos, pero compleja en su estandarización, requiere de un equipo costoso y personal calificado; las condiciones para el funcionamiento del cromatógrafo (temperaturas de inyección, de columna, de detección, tipo de columna utilizada), condicionan el resultado. Estas dificultades impiden su uso generalizado.[1]



**c) Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).**

Guarda muchas similitudes con la CG con algunas diferencias técnicas y una mayor rentabilidad diagnóstica, por lo que su uso es más común.

El proceso de extracción de los ácidos grasos de la muestra varía, presentándose éstos como ésteres de bromofenacil capaces de adsorber la luz UV; las muestras son transportadas a lo largo de la columna mediante una fase móvil líquida (metanol y diclorometano) produciéndose la separación de los ácidos grasos que son detectados al final por un espectrofotómetro UV. Al igual que en la CG, los ácidos grasos aparecen en el registro en forma de picos de amplitud y altura variable, cada uno de ellos representa a cada ácido graso; el patrón cromatográfico de cada muestra constituye el elemento identificador. La interpretación de los resultados se realiza por inspección visual del cromatograma obtenido y comparación con patrones conocidos, en los últimos años se han desarrollado programas informáticos para la identificación de los perfiles cromatográficos obtenidos. La existencia de un mayor número de picos respecto a la CG le confiere un mayor potencial diagnóstico, existen patrones de referencia validados para la identificación de al menos 23 especies con mayor importancia clínica.

Su inconveniente principal son las posibles variaciones inter-especie y las similitudes entre algunas especies, lo que obliga a mantener los programas permanentemente actualizados e introducir las variaciones entre especies. Al igual que para la CG otros inconvenientes son el costo del equipo, la necesidad de estandarización en cada centro, aprendizaje de la técnica y tener un patrón propio de referencia.[1, 19]



### **1.1.2 Serotipificación.**

La serotipificación fue el método preferido para identificar a los miembros del CMA antes de los métodos moleculares, se basa en detectar las diferencias que existen en los residuos de azúcar que componen los glicopeptidolípidos de la pared celular de las micobacterias. El CMA está compuesto por los siguientes serotipos: los serotipos del 1-6, 8-11 y 21 corresponden a *M. avium*; los serotipos 7, 12-20 a *M. intracellulare*. [19]

La serotipificación es un método de identificación rápido y sencillo, sin embargo, la reproducibilidad interlaboratorio es pobre y algunas cepas no tienen reacción para algún serotipo, y otras tienen reacción para dos o más. Además, la serotipificación no está indicada para fines clínicos ya que su principal interés es epidemiológico y sólo está disponible en algunos laboratorios de referencia. [19]

### **1.1.3 Métodos moleculares.**

#### **a) Sondas de ácidos nucleicos.**

Entre las sondas comerciales más utilizadas para la identificación de micobacterias está AccuProbe que permite identificar por hibridación con el ARN ribosomal genómico el CMT, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. goodii*. La identificación es rápida (2 h) y específica, sin embargo, su aplicación queda limitada a un grupo aunque importante de microorganismos reducido, requiere de una orientación presuntiva para la elección de la sonda correspondiente al poder tan sólo realizar una identificación por prueba. Es importante



---

---

no olvidar la frecuencia de cultivos micobacterianos mixtos en pacientes inmunodeprimidos lo que obliga a realizar un subcultivo a pesar de una identificación positiva con la sonda de ADN para *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. tuberculosis*.

Los métodos INNO-LibcyPA MYCOBACTERIA y GenoType Mykobacterien permiten la identificación del CMT, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. celatum* y *M. malmoense*; a ellos se añade el nuevo INNO-LiPA que incluye *M. simiae*, *M. marinun*, *M. haemophilum* y *M. smegmatis*. El GenoType incluye *M. peregrinum* y *M. phlei*. Ambos sistemas se basan en la amplificación de un fragmento de gen específico para cada especie (espacio intergenético 16S-23S para el INNO-LiPA y el 23S rADN para el GenoType). Posteriormente se realiza la hibridación del producto de amplificación sobre las diferentes sondas dispuestas en una tira de nitrocelulosa, que son de fácil lectura e interpretación. Reportes previos señalan que ambos sistemas son muy similares, con buena sensibilidad y especificidad a partir de cultivos líquidos y sólidos, obteniéndose los resultados en 5-6 h. Una ventaja adicional de estos métodos es la detección de posibles coinfecciones por diversas especies en una misma muestra. Estas sondas se pueden utilizar con cultivos de medios sólidos y líquidos incluso con contenido hemático. En la actualidad, en combinación con los nuevos sistemas de cultivo automatizados, constituyen uno de los modelos de referencia en la detección e identificación micobacteriana clínica rutinaria. Los principales inconvenientes son que son laboriosos y el costo de ambos es alto.[1]



## **1.4 Anticuerpo monoclonal.**

La utilización de un anticuerpo monoclonal es una buena opción para la identificación de diversos microorganismos debido a que tiene una especificidad muy alta, solo reacciona y detecta una clase de antígeno y cuando se usa como reactivo para detectar un agente patógeno no se producen reacciones inespecíficas. La producción de Ma es llevada a nivel industrial; aunque los métodos de producción son elaborados y el costo de producción elevado.

### **1.1.4 Obtención del anticuerpo monoclonal.**

El primer método descrito para la producción de anticuerpo monoclonal (AcMo) fue descrito por Georges Köhler y Cesar Milstein en el año de 1975; esta técnica se basa en el hecho de que cada linfocito B estimulado con algún antígeno produce anticuerpo específico para ese antígeno, cuando esta célula es fusionada con una célula de mieloma, la línea celular resultante de la fusión es nombrada hibridoma. Ésta célula se multiplica indefinidamente y produce anticuerpo monoclonal.[27]

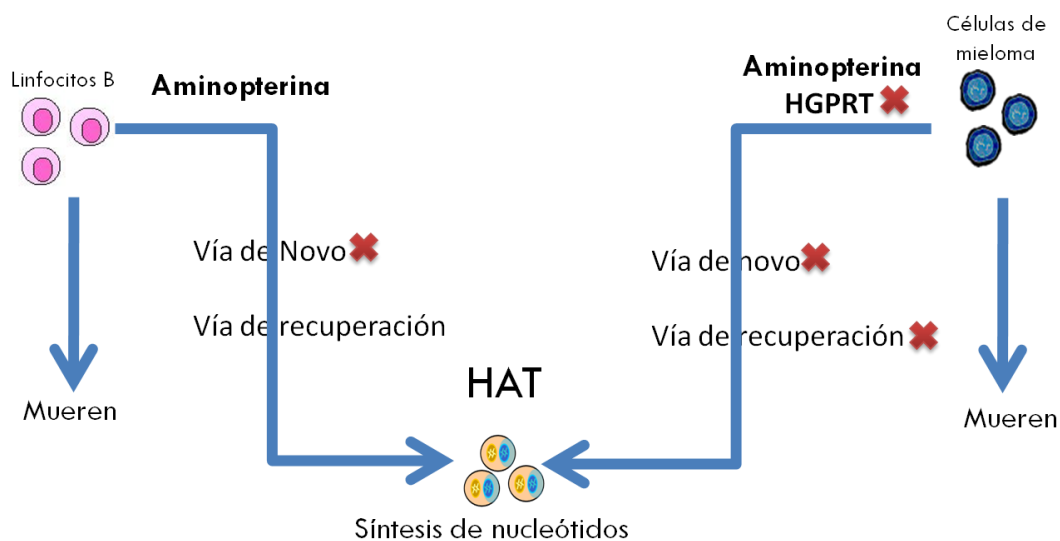
La fusión de las células requiere el uso de un agente fusógeno como el polietilenglicol. Las células resultantes son cultivadas en un medio selectivo que contiene Hipoxantina, Aminopterina y Timidina (HAT) con la finalidad de que solo puedan crecer las células fusionadas entre linfocito B y célula de mieloma. Para ello se emplean células de mieloma que carecen de enzimas necesarias para la síntesis de ADN utilizando bases nitrogenadas





de origen exógeno por la vía de *recuperación* ó *salvamento* como la enzima Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) en la línea celular SP2/0-Ag14. El medio selectivo también contiene Aminopterina que es un fármaco antifolato que bloquea la activación del tetrahidrofolato necesaria en la síntesis de nucleótidos que estructuran el ADN a través de la vía de *Novo*. [27-32]

Los linfocitos B presentan la información genética para llevar a cabo la síntesis de ADN por la vía de *recuperación* o *salvamento* utilizando hipoxantina y timidina; el re-arreglo cromosómico que se lleva a cabo en el proceso de fusión entre los linfocitos B y las células de mieloma proporcionará las enzimas necesarias para la síntesis de ADN generando una línea celular inmortalizada (Figura 2). [27, 29, 30, 32]



**Figura 2. Selección del hibridoma mediante el medio de cultivo HAT.**

El Ma tiene diversas aplicaciones algunas de ellas se mencionan a continuación:

**a) Identificación y estudio de moléculas.**



Permite la identificación de antígenos en membranas celulares y muestras complejas, define antígenos de diferenciación celular o de poblaciones celulares y determina sitios de producción, expresión y actividad de moléculas en células y tejidos.

**b) Diagnóstico.**

Permite el diagnóstico de enfermedades infecciosas y sistémicas como cáncer a través de la detección de antígenos, niveles altos de complejos inmunes, marcadores de cáncer, endocrinopatías etc. Además es utilizado para la clasificación y diferenciación de microorganismos mediante la detección de antígenos específicos.

**c) Purificación de moléculas y células.**

En cromatografía de afinidad, como anticuerpo para purificar una proteína de interés.

**d) Aplicaciones terapéuticas.**

El Ma se usa para neutralizar toxinas, para la inmunoterapia tumoral al dirigirlo contra antígenos de células tumorales que permitan su localización y visualización e inducir citotoxicidad, en trasplantes de órganos y enfermedades autoinmunes.[27, 29, 30, 32]



## 2. JUSTIFICACIÓN

El complejo *Mycobacterium avium* es el segundo agente causal de enfermedades pulmonares ocasionadas por micobacterias, las pruebas utilizadas actualmente para su identificación son limitadas en especificidad. Una alternativa para el desarrollo de métodos de identificación a nivel de subespecie es la producción de un anticuerpo monoclonal que reconozca proteínas específicas de *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*.



### 3. OBJETIVO

Producción y caracterización de anticuerpo monoclonal contra *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*.

#### **Objetivos particulares.**

- Inmunización de ratones BALB/c con *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* para producir una respuesta humoral en el ratón y la titulación de anticuerpo IgG2a producidos.
- Obtención de hibridomas por la fusión de células de mieloma con linfocitos productores de anticuerpos.
- Seleccionar el hibridoma productor de anticuerpo IgG2a contra *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*.
- Evaluar la especificidad del anticuerpo monoclonal mediante el ensayo de reactividad cruzada.
- Identificar las proteínas reconocidas por el anticuerpo.



#### 4. HIPÓTESIS

El hibridoma secretará un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer a una proteína de *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*.



---

---

## 5. MÉTODOLÓGÍA.

La cepa utilizada en el desarrollo experimental fue *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* recuperada a partir de un aislamiento ambiental (aa) de agua de riego realizado previamente en el programa de Inmunología Molecular Microbiana. Para los fines de éste texto se utilizará la terminología *Mycobacterium avium* para referirse a *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* que se refiere a la cepa que causa enfermedades en el humano.

### 5.1 Características macroscópicas y microscópicas de *Mycobacterium avium*.

A partir del cultivo de *M. avium* en medio 7H10 se realizó la caracterización macroscópica de las colonias de acuerdo a su tamaño, forma, borde, color, consistencia, elevación y velocidad de crecimiento. Las características microscópicas se observaron al microscopio de campo claro con una tinción de Ziehl-Neelsen para la cual se realizó un frotis del cultivo bacteriano, se fijó calentando el portaobjetos 30 min, el portaobjetos se cubrió con fucsina fenicada y se calentó a emisión de vapores durante 5 min, se lavó con agua y se decoloró con alcohol ácido durante 1 min, se realizó otro lavado con agua y se cubrió el portaobjetos con solución de azul de metileno por 1 min; el portaobjetos se lavó con agua y se dejó secar al aire.

### 5.2 Inmunización.

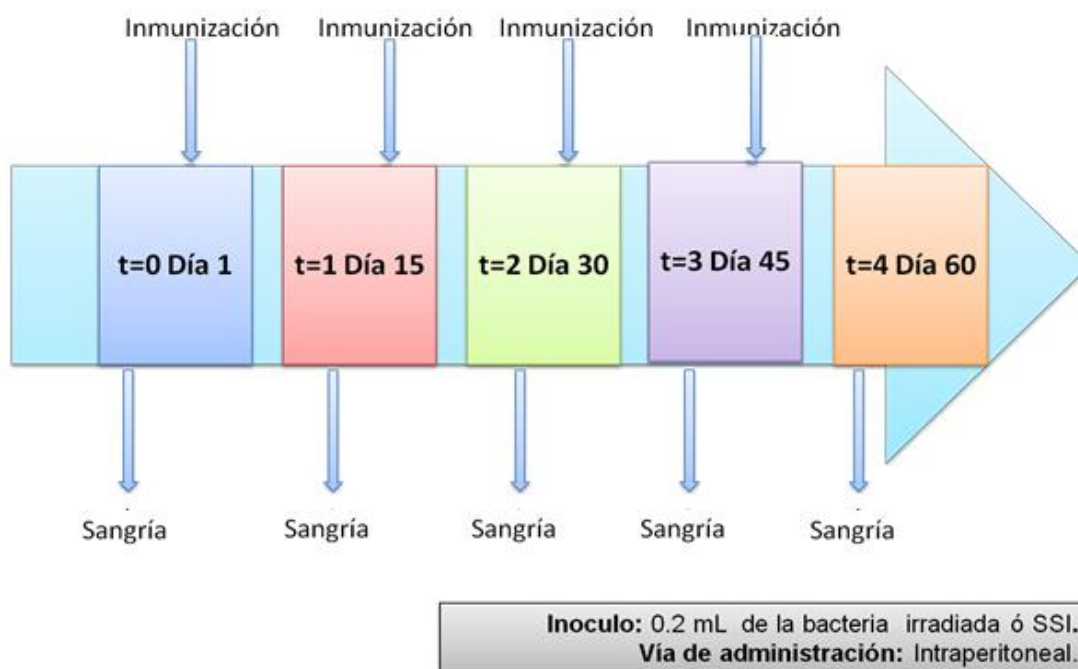
La bacteria *M. avium* se cultivó en medio Sauton (150 rpm, 37° C) y se cosechó durante la fase media logarítmica (día 20 con una  $DO_{600nm}$  de 1.2) mediante centrifugación a



5000 RCF, 10 minutos a 4° C. (La determinación de la fase media logarítmica fue realizada previamente en el laboratorio). La micobacteria fue irradiada con rayos gamma a una intensidad de 12kGy. Se hicieron alícuotas en solución salina isotónica (SSI) ajustando a una  $DO_{600nm}$  a 0.740.

### Esquema de inmunización.

Se utilizaron 10 ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad; 5 fueron utilizados en el grupo control y 5 en el grupo experimental. Previo a cada inmunización, se obtuvo una muestra de sangre de un volumen aproximadamente de 0.2 mL de la vena maxilar. Se inyectó vía intraperitoneal (ip) un volumen de 0.2 mL de la muestra irradiada a cada ratón y en el grupo control se les inyectó SSI. El esquema de inmunización que se siguió se muestra en la Figura 3.



**Figura 3 Esquema de inmunización.**

Se muestra el día que debe tomarse la muestra de sangre previa a cada inmunización con el inoculo correspondiente así como la vía de administración.



### 5.3 Análisis de suero de los ratones inmunizados.

Los sueros de los ratones fueron analizados por la técnica de ELISA para determinar el incremento en la respuesta inmune humoral después de cada inmunización y el título de anticuerpo IgG2a al final del esquema de inmunización.

#### **Titulación de anticuerpo por el método de inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA).**

- 1) Se obtuvo el extracto celular de *M. avium*, se cuantificó (ver Anexo 1) y se verificó la calidad e integridad de éstas proteínas (ver Anexo 2) para sensibilizar placas de 96 pozos a una concentración de  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína en solución amortiguadora de carbonatos.
- 2) Las placas sensibilizadas fueron bloqueadas con solución de PBS-Albumina al 1%.
- 3) Se eliminó la solución de bloqueo para agregar  $100\mu\text{L}$  de PBS-Tween (PBS-T) en cada pozo y  $25\mu\text{L}$  del suero del ratón a analizar, a partir de esta dilución se hicieron cuatro diluciones seriadas de 1/5 cada una.
- 4) Las placas fueron incubadas con el anticuerpo secundario IgG2a Anti-ratón marcado con peroxidasa (HRP) (Invitrogen®).
- 5) Se adicionó sustrato para HRP a cada pozo de la placa y se incubó en la oscuridad. La placa fue leída en el intervalo máximo de quimioluminiscencia.





## 5.4 Fusión, clonación, selección y proliferación del hibridoma.

### Fusión.

Se cultivaron células de mieloma SP2/0-Ag14 en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) a una densidad celular de  $2 \times 10^5$  células viables/mL en un volumen final de 100mL. Las células de mieloma se recolectaron por centrifugación (37° C, 1100 rpm, 10 min) llevándolas a un volumen final de 25 mL del mismo medio; se evaluó la viabilidad de las células se cuantificaron utilizando azul de tripano. El volumen fue ajustado para tener una densidad celular de  $2 \times 10^7$  células viables.

Paralelamente se sacrificó el ratón que presentó el mayor título de anticuerpo IgG2a elegido para la fusión y se extrajo el bazo el cual fue disgregado en una suspensión celular en DMEM. Las células fueron recolectadas por centrifugación (37° C, 1350 rpm, 10 min) y se adicionó 25 mL de medio; el volumen de la suspensión celular fue ajustado para tener una densidad celular de  $1 \times 10^8$  células viables.

En un tubo Falcom (Labcon®) de 25 mL se agregó  $2 \times 10^7$  células de mieloma viables y  $1 \times 10^8$  esplenocitos viables, la mezcla se centrifugó (37° C, 1350 rpm, 10 min) y se retiró el sobrenadante, el paquete celular se disgregó suavemente y se adicionaron lentamente 0.5 mL de solución de polietilenglicol (PEG), la mezcla se centrifugó (37° C, 800rpm, 3 min) y se eliminó todo el PEG. El paquete celular se disgregó con 5 mL de DMEM y lentamente se adicionó 5 mL de DMEM con 10% de SFB. La suspensión celular se



---

---

transfirió a una botella de cultivo celular con 40 mL de medio DMEM con 10% de SFB y se incubó por 24h a 37° C en 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Clonación y selección.**

Las células fusionadas fueron recolectadas por centrifugación (37° C, 1350 rpm, 10 min) y el paquete celular se disgregó en 10 mL de DMEM, a esta suspensión de células se adicionaron 90 mL de DMEM con 10% de SFB suplementado con Hipoxantina, Aminopterin y Timidina (HAT); una vez mezclada la suspensión se colocó 70  $\mu$ L de la suspensión celular en cada pozo de una placa de cultivo celular de 96 pozos, realizando de esta forma el proceso de clonación. Las placas obtenidas fueron incubadas por 8 días a 37° C en 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Proliferación del hibridoma.**

#### **a) Primer escrutinio de las clonas con reactividad a *M. avium*.**

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó un primer escrutinio del total de las clonas obtenidas en base a la reactividad del anticuerpo contenido en el sobrenadante de cada una de las clonas a *M. avium* evaluada por el método de ELISA, el cual se describe a continuación.

- 1) Se obtuvo el extracto celular de *M. avium*, se cuantificó (ver Anexo 1) y se verificó la calidad e integridad de éstas proteínas (ver Anexo 2) para sensibilizar placas de 96



---

---

pozos a una concentración de  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína en solución amortiguadora de carbonatos.

- 2) Las placas sensibilizadas fueron bloqueadas con PBS-Albumina 1%.
- 3) Se eliminó la solución de bloqueo para agregar el sobrenadante de cada pozo a analizar y medio de cultivo celular como control negativo.
- 4) Las placas fueron incubadas con el anticuerpo secundario, IgG2a anti-ratón marcado con HRP (Invitrogen®).
- 5) Se adicionó sustrato para HRP en cada pozo y se incubó en la oscuridad. La placa fue leída en el intervalo máximo de quimioluminiscencia.

El contenido de los pozos que resultaron positivos al ensayo de reactividad fue transferido a placas de 24 pozos de DMEM con 10% de SFB suplementado con HT.

#### **b) Segundo escrutinio de las clonas candidatas a proliferar.**

Se realizó un segundo escrutinio de las clonas candidatas a proliferar tomando como base la reactividad del anticuerpo contenido en el sobrenadante de cada clona a *M. avium* evaluada por el método de ELISA y la evaluación visual al microscopio de la confluencia celular contenida en los pozos.

El análisis de reactividad a *M. avium* fue el mismo que se describió para el primer escrutinio de las clonas. Las células fueron observadas al microscopio invertido para evaluar la confluencia celular cada tres días.



El contenido de los pozos que resultaron positivos al ensayo de reactividad y que presentaron una confluencia mayor al 75% fue transferido a placas de 6 pozos con DMEM con 10% de SFB.

## 5.5 Caracterización del anticuerpo monoclonal.

### a) Ensayo de reacción cruzada.

- 1) Se obtuvo el extracto celular de diferentes micobacterias pertenecientes a los grupos de MNT provenientes de aa y aislamientos clínicos (ac) y del CMT (Tabla6), se cuantificó (ver Anexo 1) y se verificó la calidad e integridad de éstas proteínas (ver Anexo 2) para sensibilizar por triplicado placas de 96 pozos a una concentración de  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína en solución amortiguadora de carbonatos.
- 2) Se retiró la solución de extracto celular de las placas y se bloqueó con PBS-Albumina 1%.
- 3) Se eliminó la solución de bloqueo para agregar sobrenadante del medio de cultivo de la clona seleccionada para su caracterización y medio de cultivo celular como control negativo.
- 4) Las placas fueron incubadas con el anticuerpo secundario IgG2a anti-ratón marcado con HRP (Invitrogen®).
- 5) Se adicionó sustrato para HRP en cada pozo y se incubó en la oscuridad. La placa fue leída en el intervalo máximo de quimioluminiscencia.



**Tabla 6. Micobacterias utilizadas en el ensayo de reacción cruzada.**

Grupo	Cepa	
	Aislamiento ambiental (aa)	Aislamiento clínico(ac)
<b>Micobacterias no tuberculosas</b>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>hominissuis</i> <i>M. nonchromogenicum</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i>
<b>Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<i>M. microti</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> BCG Japón <i>M. bovis</i> BCG México <i>M. bovis</i> BCG Phipps	

**b) Inmunoproteoma.**

La obtención del inmuno-proteoma se divide en 3 etapas: 1) electroforesis de doble dimensión (2-DE) 2) Western Blot e 3) Inmunodetección.

**Primera dimensión (1D): isoelectroenfoque.**

El extracto celular de *M. avium* cuantificado (ver Anexo 1) y 160µg de proteína se solubilizaron en 360µL de solución amortiguadora de rehidratación la cual contiene: UREA 9 M, CHAPS 4%, Ditiotreitrol (DTT) 100 mM, anfolinas 0.1% (Bio-Lyte pH 3-10; Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) y azul de Bromofenol 0.001%. La mezcla obtenida fue utilizada para rehidratar dos tiras de Gradiente de pH Inmóvil (IPG) de un intervalo de pH 4-7



y 11 cm de longitud (ReadyStrip™, IPG strips. Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) por alrededor de 16h. Transcurrido el tiempo de rehidratación se llevó a cabo el isoelectroenfoque bajo las siguientes condiciones: i) 500 V, 1 mA, 5W a 1 V/h; ii) 2500 V, 1 mA, 5 W y iii) 2500 V, 1 mA, 5W para 49,500 V/h. (Multiphor II Electrophoresis Unit (flatbed system); Amersham Biosciences, Uppsala Sweden).

### **Segunda dimensión (2D): Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).**

Una vez concluido el isoelectroenfoque las tiras fueron introducidas en una solución de Ditiotretitol (DTT) y después en Iodoacetamida (IAA) a una concentración de 70 mM y 193 mM respectivamente en 5 mL de solución amortiguadora de equilibrio (Urea 6M; glicerol 30% v/v; Tris pH 8.8 50 mM; Dodecil sulfato de sodio (SDS) 2% y azul de bromofenol 0.002%). Posteriormente, las tiras se colocaron sobre geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12.0 % con marcador de masa molecular (MM) (Precision Plus Protein™ Standars Dual Color; 250-10 kDa. Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara Hoeffer SE 600 Pharmacia Biotech, USA) en solución amortiguadora de corrida (Glicina 192 mM, Tris base 25 mM y SDS 0.1%), programando la corrida a 50 V 30 min, y 100 V 2h y 150V 3h.

#### **1) Western blot.**

Uno de los geles resultantes de la 2-DE fue transferido por electroforesis a una membrana de Polivinilidenofluoruro (PVDF) (Amersham Hybond-P PVDF Membrane) en



---

---

solución amortiguadora de transferencia (Tris-base 48 mM, Glicina 39Mm metanol 20%) a 100 V por 1 h (Bio-Rad Trans-Blot®).

## 2) Inmunodetección.

La membrana con las proteínas transferidas fue colocada en solución de bloqueo (solución amortiguadora de Tris con tween 0.1% (TBS-T) y leche en polvo 5%) durante toda la noche a 4°C, posteriormente se colocó durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario que fue el sobrenadante de la clona a probar diluido en TBS-T. La membrana se incubó durante 60 min a 37°C con el anticuerpo secundario IgG2a Anti-ratón marcado con HRP (Invitrogen®). Se adicionó el sustrato para HRP, la membrana fue expuesta a una película de autoradiografía para su revelado. Los antígenos que reaccionaron con el anticuerpo de la clona fueron identificados en un gel de dos dimensiones por estimación de la masa molecular y pI obtenido por SDS-PAGE y se secuenciaron por espectrometría de masas.

### 5.5.1 Tinción de geles con plata.

Al término de la electroforesis y la transferencia, los geles fueron colocados en solución de fijación (agua, etanol 40%, ácido acético 10%) a 4° C durante al menos 1h; posteriormente se realizaron 3 lavados (etanol 50%) y un pre-tratamiento con tiosulfato de sodio pentahidratado (0.2 g/L) durante 1 min. Los geles se impregnaron con solución de nitrato de plata (2 g/L) y 0.75 mL de formaldehído al 37% durante 20 min, enseguida se revelaron con una solución de revelado (carbonato de sodio (60 g/L), tiosulfato de sodio



(4 mg/L) y formaldehído al 37% (0.5 mL/L)) hasta visualizar los puntos de las proteínas, la reacción se detuvo con una solución de ácido acético al 1%. Finalmente, la imagen se capturó en formato digital mediante un densitómetro (Molecular Imager GS-800TM Calibrated Densitometer Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) con el programa Quantity One TM 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA).



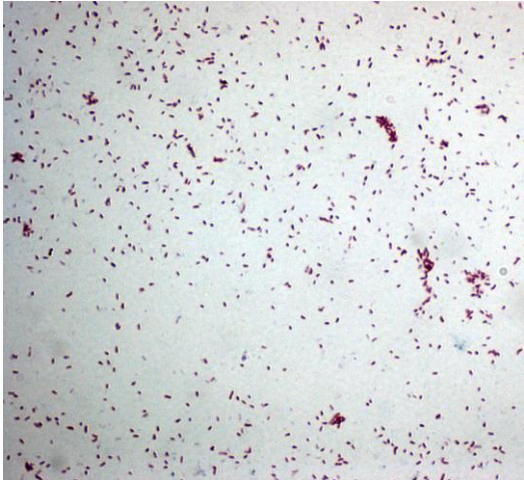


## 6. RESULTADOS.

### 6.1 Características microscópicas y macroscópicas de *Mycobacterium avium*.

Se evaluaron las características macroscópicas de las colonias contenidas en agar Middlebrook 7H10 y las microscópicas con la observación al microscopio de una preparación teñida por Ziehl-Neelsen; la morfología microscópica mostró un cultivo puro de bacilos cortos ácido alcohol resistentes. En la Tabla 7 se muestran las características macroscópicas y microscópicas evaluadas.

**Tabla 7. Características macroscópicas y microscópicas de *Mycobacterium avium*.**

<b>Morfología colonial</b>	Colonias de tamaño pequeño (2-5 mm), circulares, con bordes irregulares, color blanco mate, de consistencia cremosa, ligeramente elevadas.						
<b>Velocidad de crecimiento</b>	16 días						
<b>Características microscópicas</b>	<div style="text-align: center;">  </div> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td data-bbox="621 1738 829 1780"><b>Aumento:</b></td> <td data-bbox="829 1738 1281 1780">100 x</td> </tr> <tr> <td data-bbox="621 1780 829 1822"><b>Tinción:</b></td> <td data-bbox="829 1780 1281 1822">Ziehl-Neelsen</td> </tr> <tr> <td data-bbox="621 1822 829 1864"><b>Observaciones:</b></td> <td data-bbox="829 1822 1281 1864">Bacilos cortos ácido alcohol resistentes.</td> </tr> </table>	<b>Aumento:</b>	100 x	<b>Tinción:</b>	Ziehl-Neelsen	<b>Observaciones:</b>	Bacilos cortos ácido alcohol resistentes.
<b>Aumento:</b>	100 x						
<b>Tinción:</b>	Ziehl-Neelsen						
<b>Observaciones:</b>	Bacilos cortos ácido alcohol resistentes.						

## 6.2 Inmunización y análisis de suero de los ratones inmunizados.

Los ratones fueron inmunizados vía intraperitoneal (ip) de acuerdo al esquema de inmunización descrito en la metodología; las muestras de sangre fueron obtenidas en los tiempos establecidos.

Los valores de luminiscencia (UR) de la titulación de anticuerpo IgG2a contra *M. avium* de los ratones inmunizados con la bacteria y con SSI como grupo control estos últimos representados como el promedio de los 5 ratones inmunizados (Ver Anexo 2). de cada tiempo del esquema de inmunización se muestran en los Gráficos 1-5.

El Gráfico 1 corresponde a la titulación de anticuerpo al inicio del esquema de inmunización ó tiempo cero, de acuerdo al resultado del grupo control se observa que no hay producción de anticuerpo IgG2a.

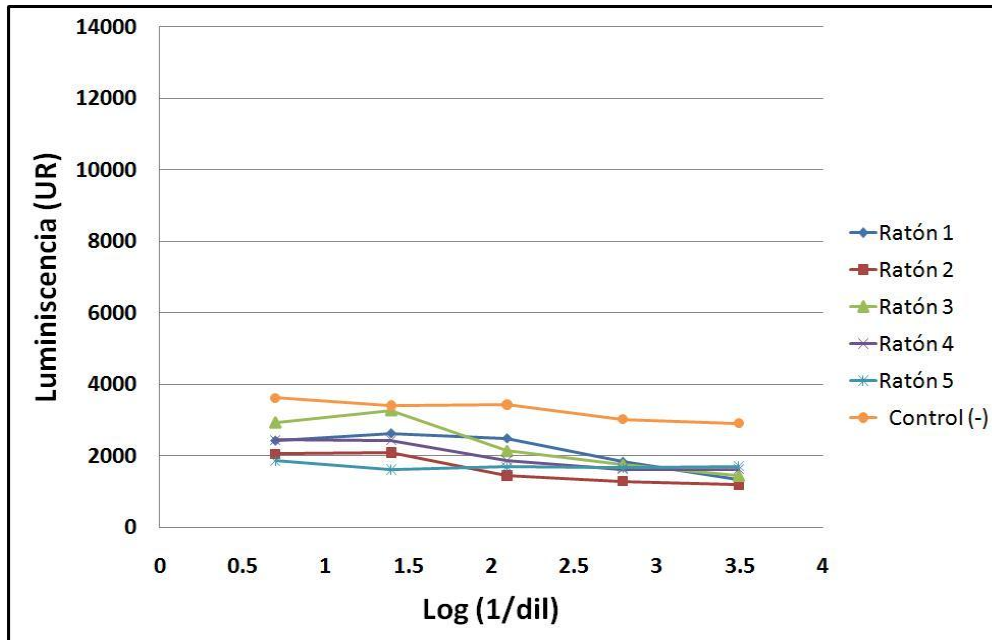
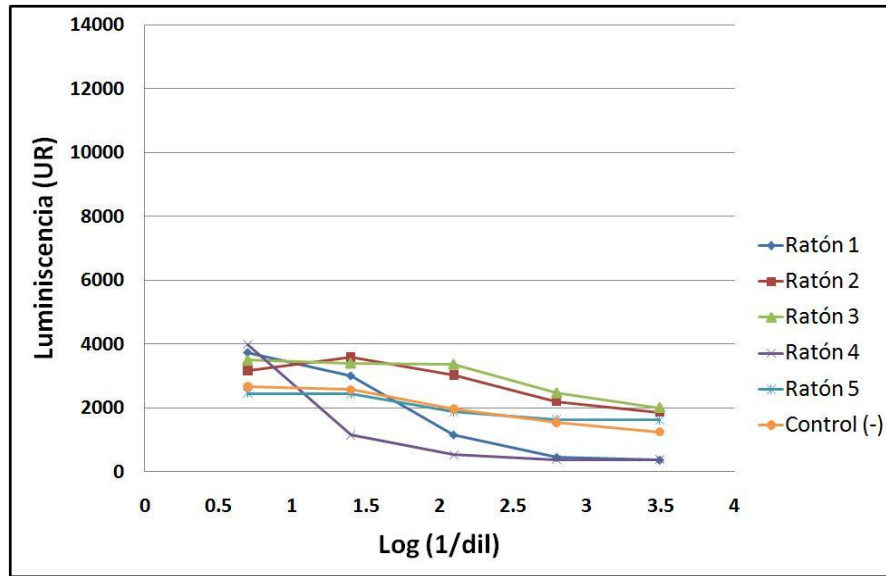


Gráfico 1 Titulación de anticuerpo IgG2a de los ratones inmunizados con *M. avium* y SSI como control al t=0.

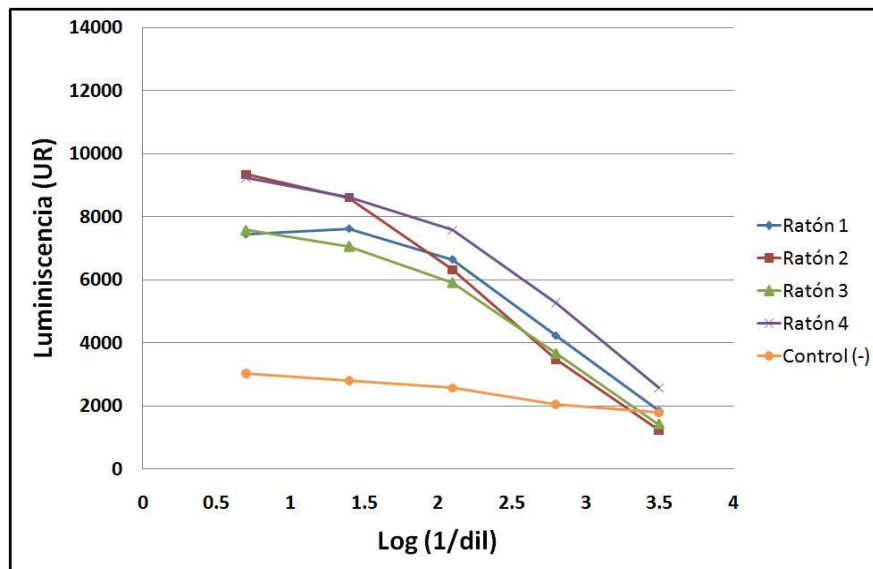
El Gráfico 2 corresponde al título de anticuerpo después de la primera inmunización a los 15 días (t=1), se observa que hay una baja producción de anticuerpo IgG2a.





**Gráfico 2** Titulación de anticuerpo IgG2a de los ratones inmunizados con *M. avium* y SSI como control al t=1.

El Gráfico 3 corresponde a la titulación de anticuerpo después de la segunda inmunización al día 30 (t=2) en la cual se observa un incremento en la producción de anticuerpo IgG2a.



**Gráfico 3** Titulación de anticuerpo IgG2a de los ratones inmunizados con *M. avium* y SSI como control al t=2.

El Gráfico 4 corresponde a la titulación de anticuerpo después de la tercera inmunización al día 45 (t=3) en la cual se observa una producción alta de anticuerpo IgG2a en comparación a los títulos obtenidos al inicio del esquema de inmunización.

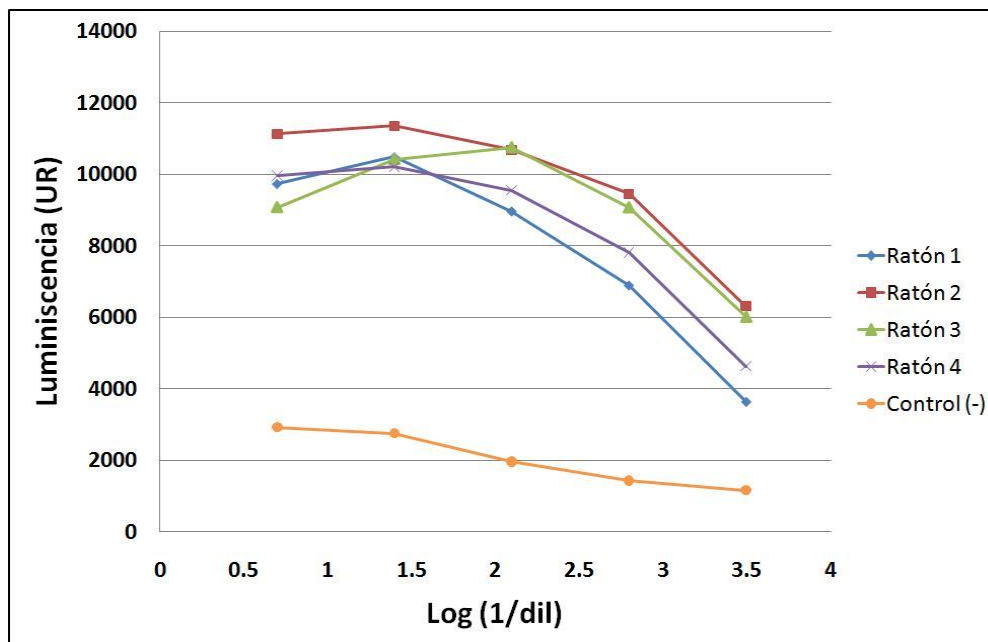


Gráfico 4 Titulación de anticuerpo IgG2a de los ratones inmunizados con *M. avium* y SSI como control al t=3.

El Gráfico 5 corresponde a la titulación de anticuerpo IgG2a contra *M. avium* al final del esquema de inmunización al día 60 (t=4), a partir de este grafico se obtuvieron los títulos de anticuerpo y se seleccionó al ratón con el mayor título.

Los títulos de anticuerpo para cada ratón inmunizado con *M. avium* al final del esquema de inmunización al día 60 (t=4) se muestran en la Tabla 8, en donde se puede observar que el ratón 3 presentó el mayor título de anticuerpo IgG2a contra el extracto celular de *M. avium*, con base a este resultado el ratón 3 fue seleccionado para realizar la fusión celular.

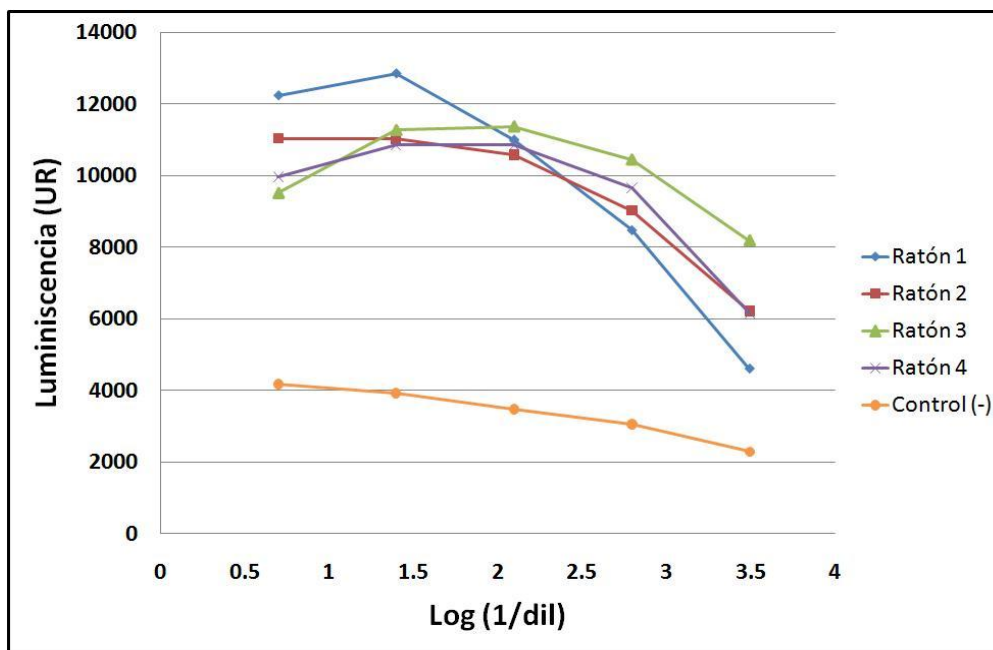


Gráfico 5 Titulación de anticuerpo IgG2a de los ratones inmunizados con *M. avium* y SSI como control al t=4.

Tabla 8 Título de anticuerpo IgG2a de los ratones inmunizados con *Mycobacterium avium* al final del esquema de inmunización (t=4).

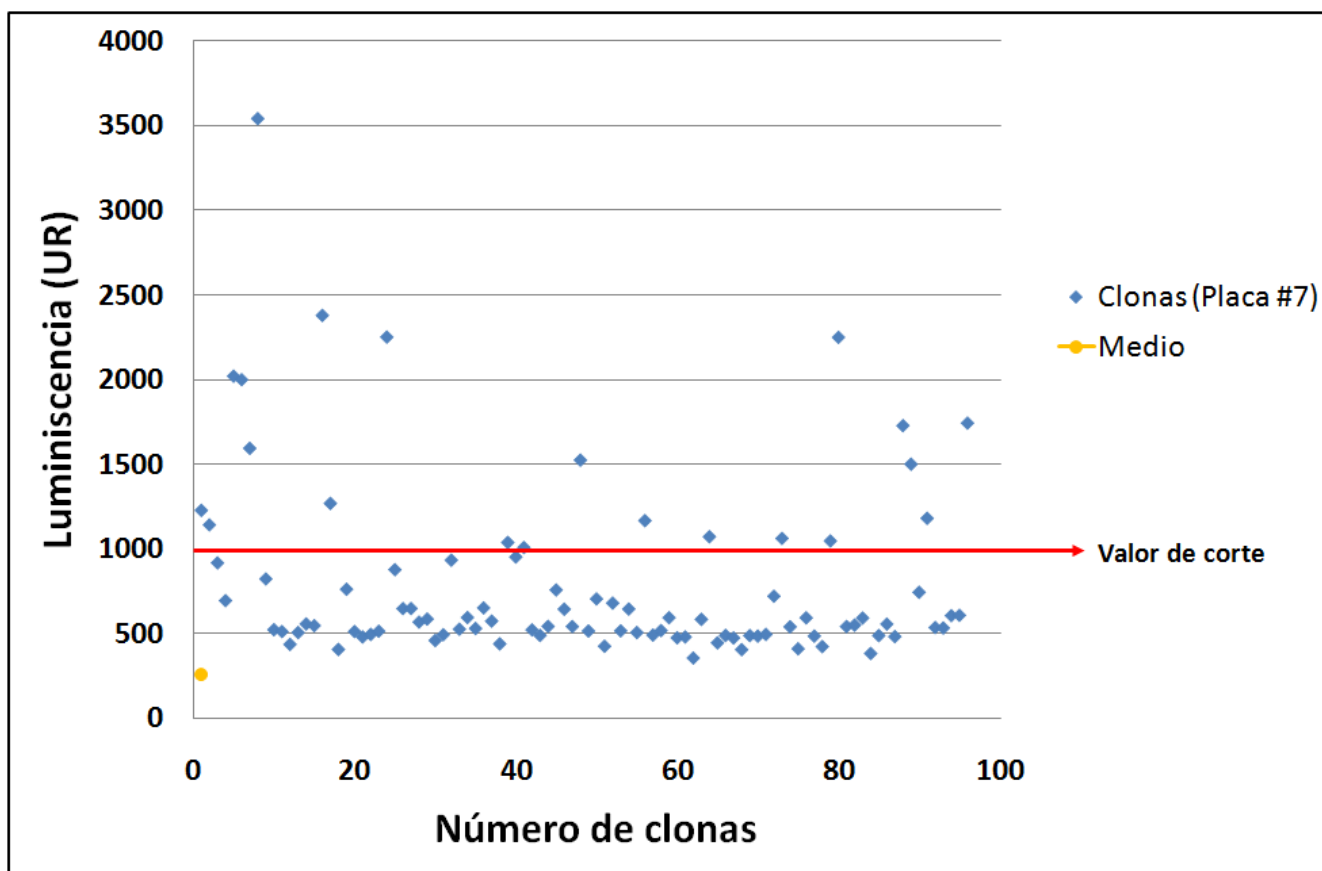
Ratón	Título de anticuerpo IgG2a
	Log ( $1/dil$ )
1	2.4
2	2.8
3	3.1
4	2.8

### 6.3 Fusión, clonación, selección y proliferación del hibridoma.

Se colocaron 70  $\mu L$  de las células obtenidas de la fusión celular en medio DMEM con 10% de SFB suplementado con Hipoxantina, Amonopterina y Timidina (HAT) en placas de 96 pozos, de esta forma se llevó a cabo el proceso de clonación y al mismo tiempo la selección de las clonas al incubarse con el medio selectivo, se obtuvo un total de 1415 clonas.



Se realizó un primer escrutinio de las clonas obtenidas de la fusión para seleccionar aquellas clonas positivas con base en la reactividad del anticuerpo contenido en el sobrenadante de cada clona a *Mycobacterium avium*. En la Figura 4 se muestran los valores de luminiscencia obtenidos para una de las 15 placas de ELISA realizadas (placa identificada como número 7). En este gráfico se observaron pocas clonas con valores de luminiscencia mayores a 1000 por lo que se estableció como punto de corte un resultado de luminiscencia mayor o igual a 1000. De esta forma, las clonas que cumplían con este criterio fueron seleccionadas como clonas positivas.



**Figura 4 Reactividad a *M. avium* del anticuerpo evaluada por el método de ELISA (placa #7).**

Los valores de luminiscencia (UR) para cada clona se muestran en azul, en amarillo el valor de luminiscencia (UR) del medio de cultivo celular utilizado como control negativo y en rojo la línea del punto de corte (1000). Checa ejes de las graficas

De este primer escrutinio se seleccionaron 98 clonas (6.9%) como positivas de un total de 1415 clonas de acuerdo al criterio ya descrito (Figura 5).



**Figura 5 Representación grafica de las clonas seleccionadas después del primer escrutinio basado en la reactividad contra *M. avium*.**

Debido a que se requería seleccionar un número bajo de clonas para su proliferación fue necesario realizar un segundo análisis de las clonas seleccionadas en el primer escrutinio en base a la reactividad del anticuerpo contenidos en el sobrenadante de cada clona a *Mycobacterium avium* y a la evaluación visual al microscopio de campo claro de la confluencia celular por campo contenida en los pozos.

Los resultados que se muestran en la Tabla 9 pertenecen a las seis clonas con la mayor reactividad a *Mycobacterium avium* evaluada por el método de ELISA y una confluencia celular todas mayor al 75% seleccionadas en el segundo escrutinio para su proliferación.

**Tabla 9 Resultados del segundo escrutinio de clonas.**

Clona	Luminiscencia (UR)
AcMa:3H1	1694
AcMa:9H6	1676
AcMa:8H12	1649
AcMa:7H10	1578
AcMa:7A6	1522
AcMa:11E1	1442
Medio	410

#### 6.4 Caracterización del anticuerpo monoclonal.

Para los ensayos implicados en la caracterización del anticuerpo monoclonal se optó por utilizar la clona AcMa:3H1 la cual presentó la mayor reactividad a *M. avium* y una confluencia mayor al 75%. Los resultados de los experimentos siguientes se refieren a los obtenidos para esta clona.

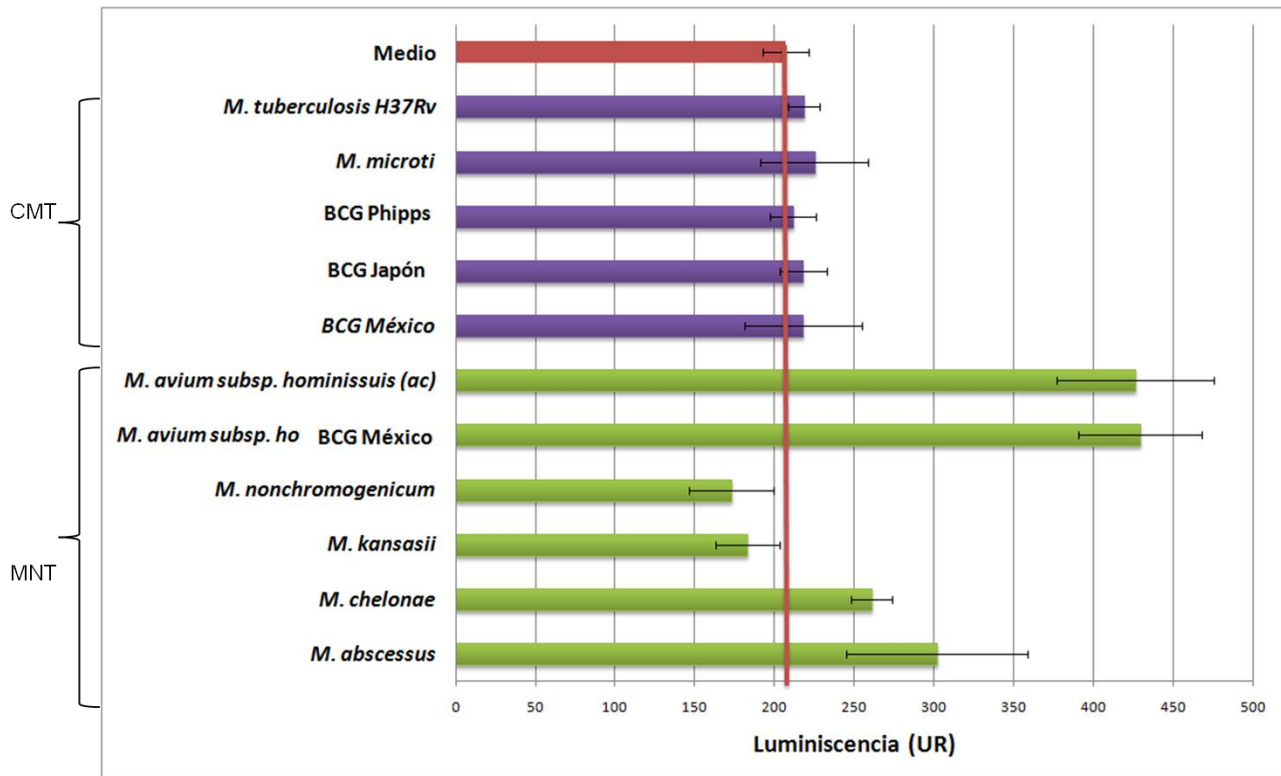
#### Ensayo de reacción cruzada con otras micobacterias.

Se evaluó la reactividad del anticuerpo producido por el hibridoma de la clona AcMa:3H1 a cepas de MNT y cepas del CMT, en la Figura 6 se muestran los resultados del ensayo de reacción cruzada. Los resultados obtenidos muestran que el anticuerpo evaluado reconoce principalmente a las cepas de *M. avium* provenientes de un aislamiento ambiental (aa) y de un aislamiento clínico (ac), al tomar como 100% el valor de luminiscencia obtenido con la cepa de *M. avium* proveniente de un aislamiento ambiental utilizada para la obtención





del anticuerpo monoclonal se encuentra que el anticuerpo evaluado no presenta reactividad contra *M. kansasii* y *M. nonchromogenicum*, tienen una reactividad del 42% a *M. abscessus* y del 25% con *M. chelonae*. Las cepas del CMT presentaron una reactividad cruzada menor al 10%.

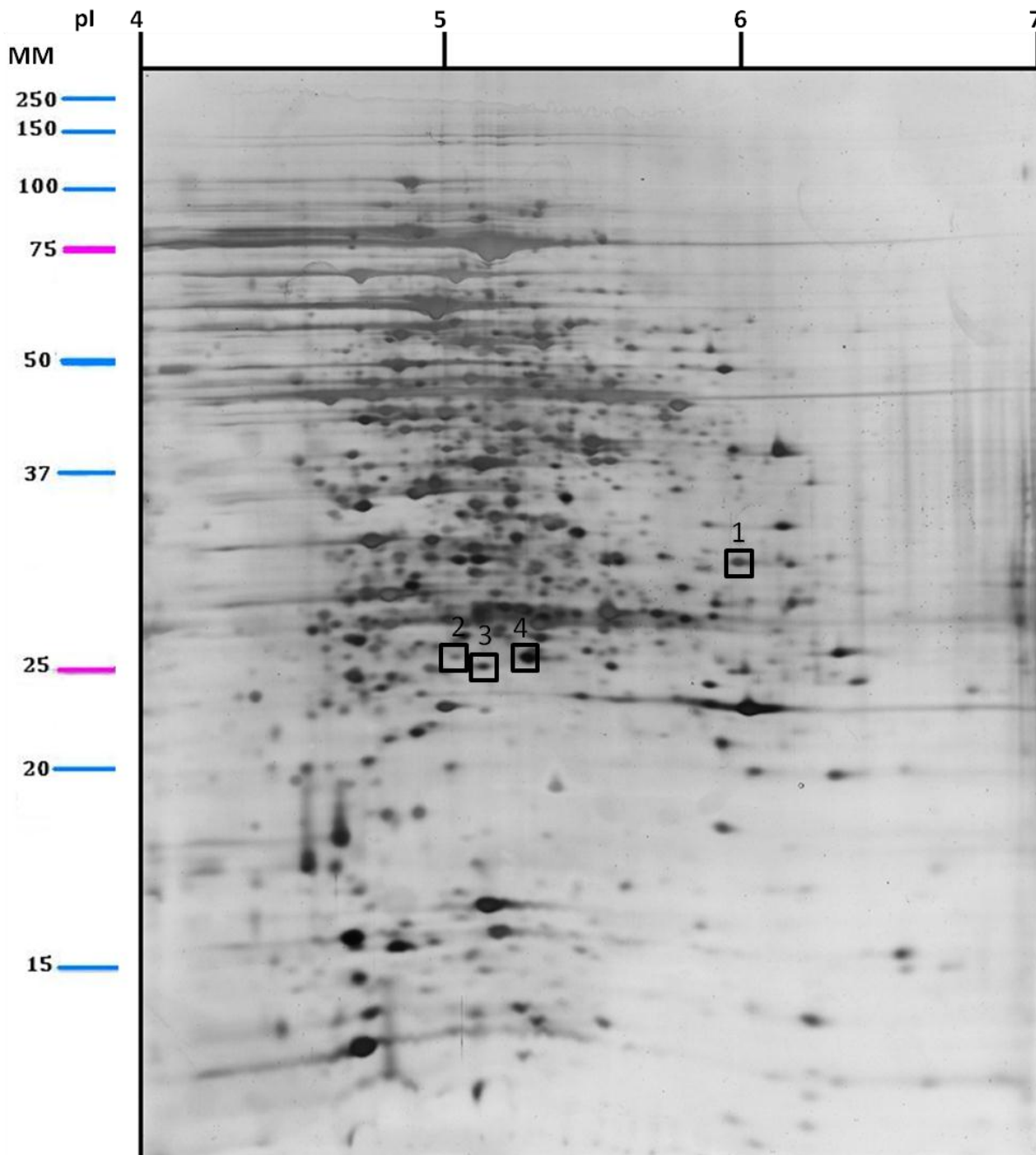


**Figura 6. Ensayo de reacción cruzada del anticuerpo de la clona. AcMa:3H1 con otras micobacterias.** En la figura se muestran los valores de luminiscencia (UR) de cada cepa evaluada en el ensayo de reacción cruzada con el anticuerpo producido por la clona AcMa:3H1. Como control negativo se utilizó el medio de cultivo.

## Inmunoproteoma.

En la Figura 7 se muestra el proteoma del extracto celular de *M. avium* obtenido por 2D-PAGE teñido con nitrato de plata, los puntos señalados en los cuadros con los números del 1-4 corresponden a las cuatro proteínas que reaccionaron con el anticuerpo producido por el hibridoma de la clona AcMa:3H1 en el ensayo de inmunodetección, estas proteínas

están ubicadas en el gel por estimación de la masa molecular y punto isoeléctrico (Quantity one).



**Figura 7 Gel del extracto celular de *M. avium* obtenido por 2D-PAGE teñido con nitrato de plata.**

Las cuatro proteínas reconocidas por el anticuerpo de la clona AcMa: 3H1 en el ensayo de inmunodetección se encuentran ubicadas en el gel de acuerdo a su MM y pI con los números del 1 al 4. Del lado izquierdo se encuentra la escala de masa molecular y en la parte superior el intervalo de pI.

Las proteínas reconocidas por el anticuerpo se secuenciaron por espectrometría de masas y se identificaron con la base de datos Mascot Search Results, los resultados se muestran en la Tabla 10 donde la clave de la proteína corresponde al número de la proteína identificada en la Figura 7.

**Tabla 10 Proteínas de *Mycobacterium avium* identificadas por espectrometría de masas.**

Clave del punto	Proteína		% de secuencia identificada
	Nombre	Función	
1	Proteína hipotética	Desconocida	53
2	Fosfometilpirimidina cinasa	Biosíntesis y metabolismo de Tiamina. Implicada en el metabolismo intermediario y respiración.	76
3	Acil [ACP] desaturasa	Síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos.	50
4	3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa.	Metabolismo de lípidos. Oxidación de ácidos grasos	84

Con la finalidad de conocer si estas proteínas se encuentran en otras especies de micobacterias se realizó un análisis de las secuencias de aminoácidos mediante BLAST utilizando la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología NCBI; los resultados de este análisis se agrupan en la Tabla 11 en la cual se puede ver que el porcentaje de identidad entre las cepas no se relaciona con el resultado de reacción cruzada.



Con la finalidad de explicar el por qué el anticuerpo monoclonal reconoce cuatro proteínas se realizó un alineamiento de las cuatro secuencias de aminoácidos mediante el programa ClustalX2, en la Figura 8 se muestra la imagen de éste alineamiento en el cual se observan posibles secuencias conservadas de aminoácidos entre las cuatro proteínas.

**Tabla 11. Porcentaje de identidad de las proteínas reconocidas por el anticuerpo en distintas especies de micobacterias.**

	<i>M. chelonae</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. bovis</i> BCG México	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv
<b>Fosfometilpirimidina cinasa</b>	N/E	37%	35%	37%	37%
<b>Proteína hipotética</b>	N/E	54%	48%	56%	56%
<b>Acil [ACP] desaturasa</b>	N/E	74%	64%	77%	77%
<b>3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa</b>	67%	30%	96%	80%	80%

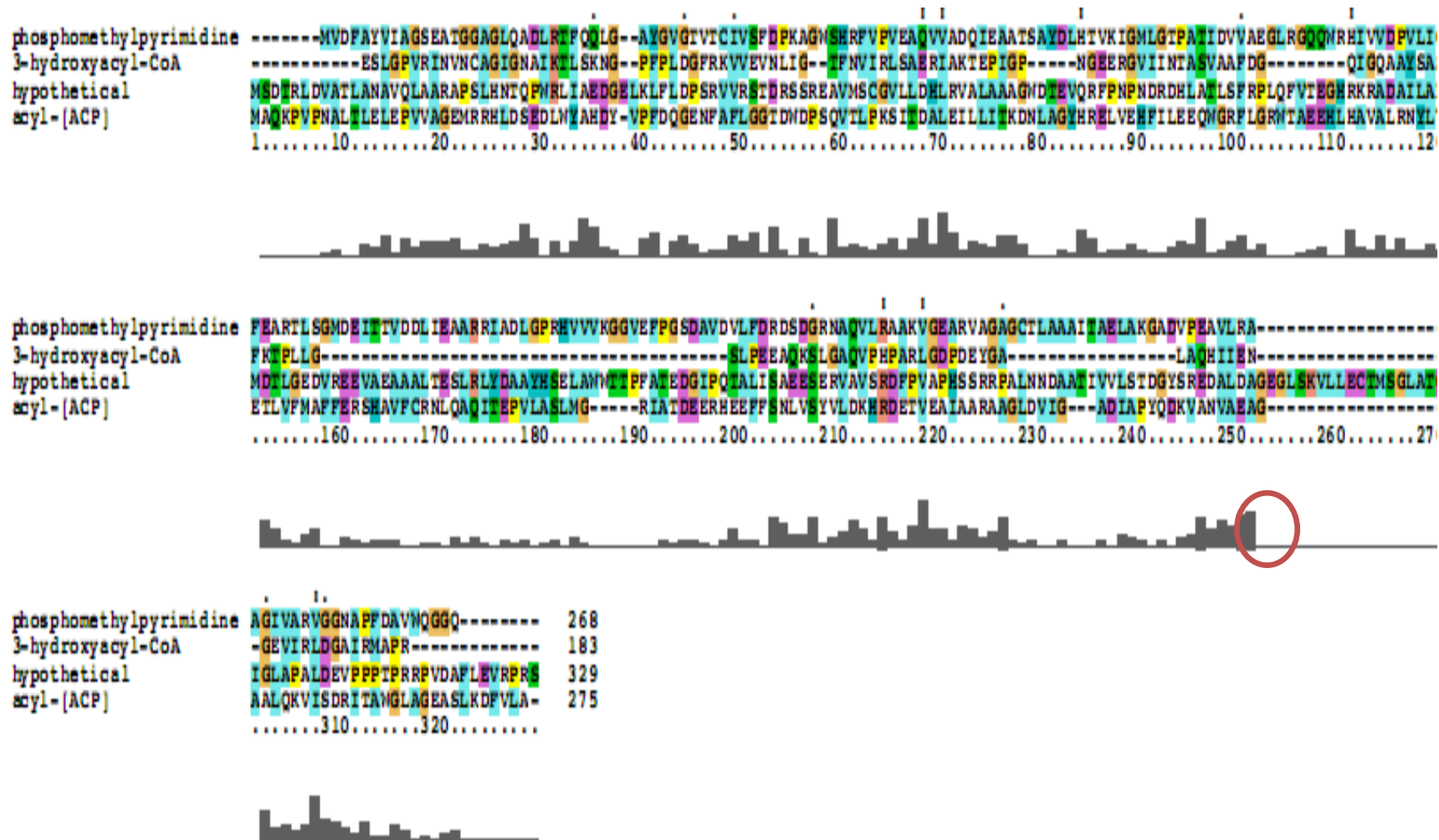


Figura 8 . Alineamiento de secuencias de las proteínas reconocidas por el anticuerpo producido por la clona AcMa:3H1.

Resultado de la alineación de las proteínas reconocidas por el anticuerpo producido por la clona AcMa: 3H1 con el programa Clustal X2. En el cual se señalan secuencias conservadas entre las cuatro proteínas.

---

---

## 7. DISCUSIÓN.

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) son de gran importancia debido a que el número de casos clínicos asociados a éstas ha aumentado [14]. El Programa de Inmunología Molecular Microbiana lleva a cabo trabajos dedicados al aislamiento de especies de MNT de muestras de agua y a través de proteómica realiza la búsqueda de proteínas con potencial para el desarrollo de reactivos para su identificación. La especie *M. avium* fue elegida para la realización de éste trabajo por su importancia clínica para el humano ya que es la principal causa de enfermedad pulmonar por MNT, causa de linfadenitis y enfermedad diseminada esta última principalmente en individuos inmunocomprometidos, enfermedades clínicamente indistinguibles de las ocasionadas por *Mycobacterium tuberculosis*. [6, 11, 14] Actualmente los métodos para la identificación de *M. avium* presentan inconvenientes en la especificidad, tiempo de realización y costo, por lo que la utilización de un anticuerpo monoclonal (AcMo) es una opción para su identificación.[7] El AcMo tiene la característica de ser específico al reaccionar con un solo antígeno, esta característica hace posible su uso como reactivo para detectar un agente patógeno, sin producir reacciones inespecíficas.[27, 30]

La observación de las características macroscópicas y microscópicas de *M. avium* permitió aseverar que se trataba de un cultivo puro al observar un único tipo de colonias y únicamente bacilos de color rosa ácido alcohol resistentes.

La producción de un anticuerpo monoclonal comienza con la inmunización de un modelo animal con el antígeno contra el cual se desea obtener el anticuerpo, por lo que el primer paso fue una preparación adecuada del antígeno para la inmunización.[30, 33]



El antígeno se obtuvo con un cultivo puro de *M. avium* cosechado en fase de crecimiento media logarítmica, ya que en estudios realizados se ha encontrado que en esta fase el número de proteínas expresadas es mayor que en las otras, lo que asegura una respuesta inmune a un mayor número de antígenos de la micobacteria. [30, 34] Adicionalmente, las micobacterias fueron irradiadas con rayos gamma con la finalidad de tener a la bacteria muerta y mantener íntegra la estructura bacteriana y permitir al sistema inmunológico reconocer a la bacteria para ser fagocitada por macrófagos. La fagocitosis genera diversos antígenos peptídicos bacterianos, que al reconocer estos antígenos los linfocitos B son activados lo que estimula su proliferación y diferenciación a células plasmáticas que secretan anticuerpo y a linfocitos B de memoria. Paralelamente los linfocitos T CD4<sup>+</sup> diferenciados en linfocitos T<sub>H</sub>1 responden a los antígenos peptídicos bacterianos presentados por células presentadoras de antígenos (CPA) de clase II, estos linfocitos sintetizan IFN- $\gamma$  que activa macrófagos y provoca en los linfocitos B efectores (células plasmáticas) el cambio de isotipo en el anticuerpo producido a IgG2a.[27] El inóculo se ajustó a un volumen de 0.2 mL con SSI por lo que el grupo control se inmunizó con esta solución para saber si causa por sí misma un incremento en la respuesta inmune.

Como modelo animal se utilizó ratones hembras de la cepa BALB/c ya que es un animal fácil de manejar, económico y que líneas celulares de mieloma para la producción de AcMo proceden de estos ratones lo que hace que sean compatibles entre sí.[30, 35]

El esquema de inmunización consistió en inyectar a los ratones vía intraperitoneal el inóculo cuatro veces a intervalos de quince días, con el propósito de generar una respuesta inmune secundaria mantenida contra la micobacteria.[27]



La titulación de anticuerpo IgG2a en el suero de las muestras de sangre obtenidas previas a cada inmunización se realizó para monitorear el aumento en la respuesta inmune humoral contra la micobacteria. Para el análisis de los sueros de los ratones inmunizados se realizó un ensayo de ELISA, se utilizó IgG2a Anti-ratón para detectar si hay anticuerpo IgG2a ya que esta subclase representa una respuesta de tipo  $T_H1$ , misma que es la responsable de protección contra este grupo. [36] El análisis muestra que con cada inmunización la cantidad de anticuerpo producido aumenta, lo cual se esperaba debido a que una respuesta inmune secundaria tiene como característica la producción de anticuerpo con capacidad de responder con mayor intensidad y especificidad a la exposición repetida de la micobacteria.[27]

El ratón número 3 fue sacrificado para la extracción del bazo porque fue el que generó la cantidad más alta de anticuerpo contra *M. avium*, este órgano linfoide se eligió por contener un alto número de células plasmáticas productoras de anticuerpo. Como agente fusógeno se utilizó el polietilenglicol (PEG), el cual es un agente químico fusógeno que actúa inhibiendo las fuerzas de tensión superficial entre las células permitiendo la fusión de membranas, experimentalmente este proceso ha dado numerosos frutos de usos diagnóstico, caracterización y de forma muy reciente terapéutico para las enfermedades autoinmunes y cáncer que han mostrado gran éxito.[27-32]

De la fusión celular se obtuvo una mezcla de células híbridas y células tanto de mieloma como esplenocitos que no se fusionaron. Los esplenocitos no fusionados mueren en pocos días, las células de mieloma tienen una capacidad de replicación infinita y en poco tiempo sobrepasan a las células híbridas por lo tanto es necesario seleccionar solo a éstas. La selección se llevó a cabo mediante un medio de cultivo selectivo el cual contiene





---

---

Hipoxantina, Aminopterina y Timidina (HAT); las células de mieloma SP2/0-Ag14 tienen una mutación que hace que carezcan de la enzima Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) necesaria para la síntesis de ADN por la vía metabólica de recuperación o salvamento, la aminopterina contenida en el medio selectivo inactiva la otra vía metabólica de síntesis de ADN (vía de novo) lo que lleva a la eliminación de las células de mieloma. El re-arreglo cromosómico que se llevó a cabo en el proceso de fusión entre esplenocitos y células de mieloma proporcionó las enzimas necesarias para la síntesis de ADN permitiendo que únicamente las células fusionadas entre esplenocito y célula de mieloma sobrevivan en este medio de cultivo.[27-30, 32, 33]

En este caso los procesos de clonación y selección se llevaron a cabo simultáneamente al individualizar una célula por pozo y por lo tanto la producción de una sola clase de moléculas de inmunoglobulina en medio selectivo HAT. Del proceso de clonación se obtuvo un total de 1415 clonas, de las cuales sólo 98 (6.9%) fueron seleccionadas como positivas.

El costo del mantenimiento celular es elevado por lo que fue necesario realizar un segundo análisis de las clonas, se seleccionó a aquellas clonas con el hibridoma que produjera el anticuerpo con la mayor reactividad a *M. avium* y con una confluencia mayor al 75% por campo, lo que aseguró la producción de anticuerpos para los ensayos de caracterización de los mismos.

Para los ensayos de caracterización se utilizó la clona AcMa:3H1 ya que de acuerdo a los resultados tiene la reactividad más alta a *M. avium* y una confluencia mayor al 75%.

En el ensayo de reacción cruzada se evaluó la especificidad del anticuerpo producido a *M. avium* al medir la reactividad a otras micobacterias. En este ensayo se utilizó cepas de



---

---

micobacterias no tuberculosas y cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Las cepas de micobacterias no tuberculosas incluidas en el ensayo ocasionan las mismas patologías que *M. avium* y en la práctica común se confunden como agentes causantes de la enfermedad. Además, *M. tuberculosis* H37Rv fue utilizada debido a que, es la causa más común de tuberculosis en el humano por lo que, en la mayoría de los casos se descarta el que *M. avium* sea el agente causal de la enfermedad pulmonar. Las cepas de *M. bovis* BCG fueron elegidas ya que también pertenecen al complejo *M. tuberculosis*.

Los resultados mostraron que el anticuerpo contenido en la clona AcMa:3H1 reconoce principalmente a las cepas de *M. avium* provenientes de un aislamiento ambiental y de un aislamiento clínico, evidenciando que las cepas ambientales y clínicas tienen una gran homología entre sí lo que permite que el reconocimiento sea muy similar. Frente a las demás cepas del grupo de MNT el anticuerpo no presenta reactividad cruzada para *M. kansasii*, segundo agente causante de enfermedad pulmonar por MNT, y *M. nonchromogenicum*, causante de enfermedad cutánea en el humano. Sin embargo, el anticuerpo probado tiene una reactividad cruzada del 42% con *M. abscessus* que es la principal especie de crecimiento rápido causante de enfermedad pulmonar y del 25% con *M. chelonae* que también llega a causar esta enfermedad, las cepas del CMT presentaron una reactividad cruzada menor al 10%. [3, 9, 12]

El proteoma obtenido del extracto celular de *M. avium* se muestra en la Figura 7, en ésta imagen se muestra la ubicación de las cuatro proteínas reconocidas por el anticuerpo de la clona AcMa:3H1, estas proteínas fueron secuenciadas por espectrometría de masas y algunas de sus características se mencionan a continuación:



La proteína hipotética tiene función desconocida aunque se infiere de acuerdo a los dominios conservados en su secuencia de aminoácidos que pertenece a la superfamilia nitro reductasa, las proteínas de esta familia catalizan la reducción de flavina o nitrocomponentes con NADPH como donador de electrones.[37, 38]

La proteína Fosfometilpirimidina cinasa corresponde a una fosfotransferasa. Ésta proteína es esencial en vías metabólicas universales para distintos microorganismos, en micobacterias participa en reacciones de salvamento en la biosíntesis y metabolismo de tiamina, está involucrada en los procesos del metabolismo intermediario y respiración formando parte de los requerimientos metabólicos y biosintéticos esenciales para su crecimiento celular.[39, 40]

La proteína Acil [proteína acarreadora de acil] desaturasa pertenece a la superfamilia de similares a ferritina. En micobacterias forma parte de los requerimientos metabólicos y biosintéticos esenciales para su crecimiento celular involucrada en la biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos. En estudios realizados para la búsqueda de antígenos de *M. tuberculosis* inmunodominantes se ha reportado que, es una proteína inmunogénica al ser altamente reconocida por sueros de pacientes enfermos de tuberculosis lo que es de importancia en el desarrollo de pruebas de serodiagnóstico.[39, 41]

La proteína 3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa está implicada generalmente en vías metabólicas como glucólisis y oxidación de ácidos grasos. Se ha visto que, en las micobacterias está involucrada en el metabolismo de lípidos donde participa como catalizadora de reacciones de oxidación.[37, 38, 40]

Con la finalidad de buscar si las proteínas reconocidas se encuentran presentes en micobacterias utilizadas en el ensayo de reacción cruzada y relacionar el resultado obtenido



para este ensayo se realizó un análisis mediante BLAST. El porcentaje de identidad encontrado entre estas micobacterias no se relaciona con el resultado obtenido en la reacción cruzada por lo que se infiere que hay diferencias en la expresión de estas proteínas.[38]

El reconocimiento de cuatro proteínas por el anticuerpo monoclonal se explica al encontrar secuencias de aminoácidos conservadas en el alineamiento de las secuencias de éstas proteínas ya que, para la realización del inmunoproteoma se utilizó un lisado celular de *M. avium* tratado con distintos agentes químicos para la desnaturalización de las proteínas, esta desnaturalización dió lugar a que epítopes no disponibles para el anticuerpo en su forma nativa, se expusieran y fuesen disponibles en la forma desnaturalizada, por lo que es posible que un anticuerpo monoclonal reconozca cuatro proteínas.[27, 42, 43]



## 8. CONCLUSIONES

- Los anticuerpos monoclonales isotipo IgG2a obtenidos son capaces de reconocer a *M. avium* subsp. *hominissuis*.
- La capacidad de reconocimiento con el anticuerpo monoclonal AcMa:3H1 fue muy similar para ambos aislamientos de *M. avium* subsp. *hominissuis* ambiental y clínica.
- La reactividad cruzada del AcMa:3H1 sólo se presentó para *M. abscessus* siendo menor al compararse con *M. avium* subsp. *hominissuis*.
- El AcMa:3H1 reconoció a cuatro proteínas, tres son proteínas de metabolismo y una es conservada de función desconocida.



## Anexo 1

**Obtención de extracto celular de micobacterias por sonicación.**

Las bacterias de *M. avium* en fase media ó las bacterias de las cuales se requiera el extracto celular; fueron recolectadas mediante centrifugación (4° C, 5000 RCF, 10 min); el paquete celular se resuspendió en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril y la suspensión de bacterias se lavó 2 veces por centrifugación bajo las mismas condiciones. El sobrenadante se decantó y se determinó el peso húmedo del paquete bacteriano el cual se ajustó a una concentración de 100 mg de bacterias/<sub>mL</sub> con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril. La lisis de bacterias se llevó a cabo por ultrasonido aplicando un total de 15 pulsos de 60s con sonicador (*Ultrasonic Processor, Cole Parmer Corporation. Vernon Hills, Illionis, USA*). Se adicionó inhibidor de proteasas (PMSF) a una concentración final de 20 mM. La suspensión resultante fue centrifugada a 14000 rpm, 20 min a 4° C recuperando el sobrenadante el cual fue almacenado a -70° C hasta su uso.



**Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.**

Se realiza una curva estándar con Albúmina Sérica Bovina (BSA) y reactivo de Bradford.

La curva se prepara de acuerdo a la siguiente tabla:

<b>µL de BSA a 1mg/mL</b>	0	1	2	3	4	5	6	8	10
<b>H<sub>2</sub>O µL</b>	50	49	48	47	46	45	44	42	40
Agregar 200 µL de reactivo de Bradford, incubar 5 min en la oscuridad y leer $A_{\lambda 595}$ y $A_{\lambda 450}$ .									

**Tabla 12 Preparación de la curva estándar  
para el método de Bradford.**

La muestra a cuantificar se prepara de acuerdo a la siguiente tabla:

<b>µL de extracto celular de la bacteria</b>	1
<b>H<sub>2</sub>O µL</b>	49
Agregar 200 µL de reactivo de Bradford, incubar 5 min en la oscuridad y leer $A_{\lambda 595}$ y $A_{\lambda 450}$ .	

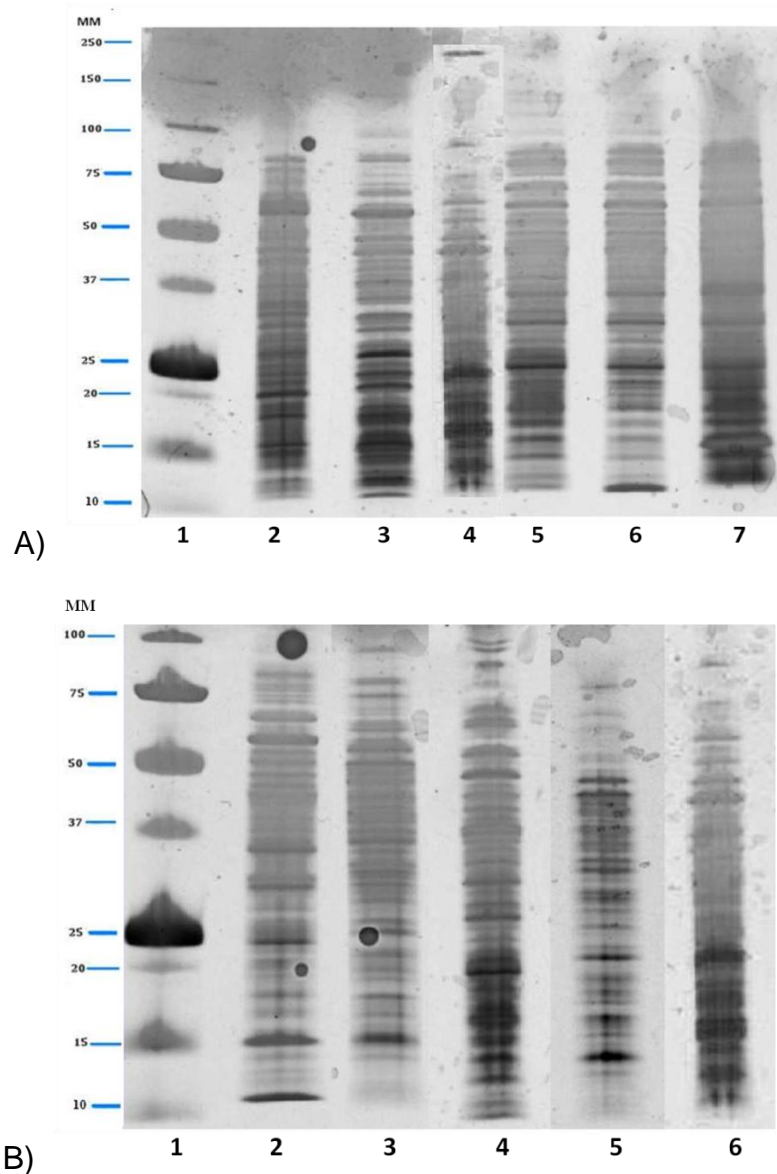
**Tabla 13 Preparación de la muestra a cuantificar por el método de Bradford.**

El resultado de la muestra se obtiene por interpolación en la curva estándar.



## Anexo 2

Para la verificación de la calidad e integridad de las proteínas de extracto celular de micobacterias utilizadas en los ensayos de ELISA se realizó geles de 12-25% de poliacrilamida en equipo Phast-System.



**Figura 9.** Gel de 12-25% de poliacrilamida en equipo Phast-System, en cada carril se cargó  $1\mu g$  de proteína, el número de carril (1-6) y (1-7) corresponde a las cepa de micobacteria de acuerdo a la tabla 14.



**Tabla 14. Se muestra la cepa de micobacteria a la que corresponde el número de carril en el gel A y B.**

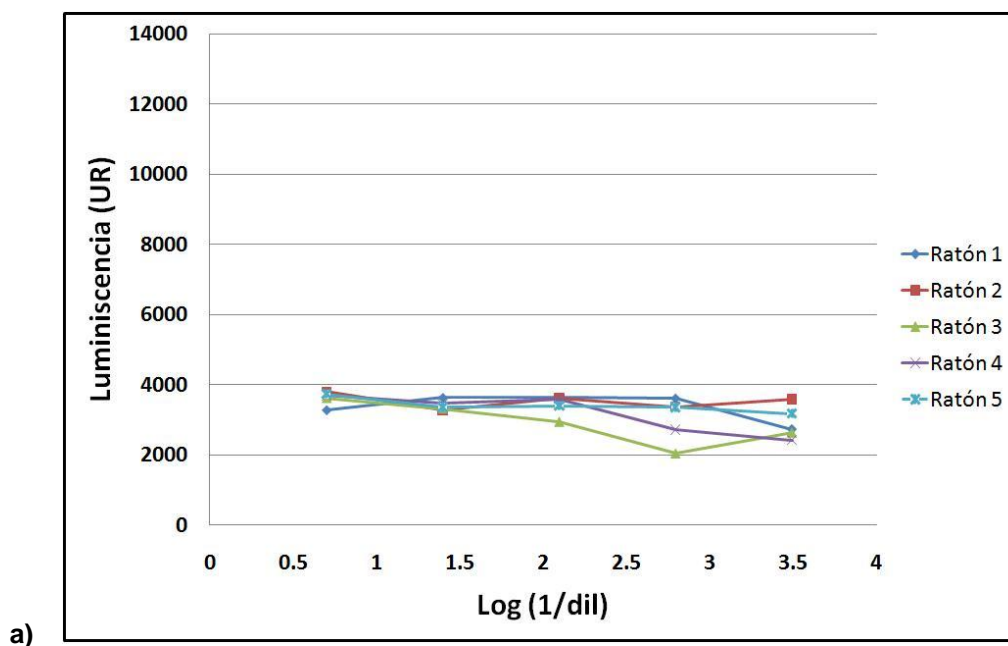
Gel A		Gel B	
Número de Carril	Cepa	Número de Carril	Cepa
1	Marcador de masa molecular	1	Marcador de masa molecular
2	<i>M. nonchromogenicum</i>	2	<i>M. bovis</i> BCG México
3	<i>M kansasii</i>	3	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (Aa.)
4	<i>M. abscessus</i>	4	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (Ac.)
5	<i>M. bovis</i> BCG Japon	5	<i>M.microti</i>
6	<i>M. bovis</i> BCG Phipps	6	<i>M. chelonae</i>
7	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		

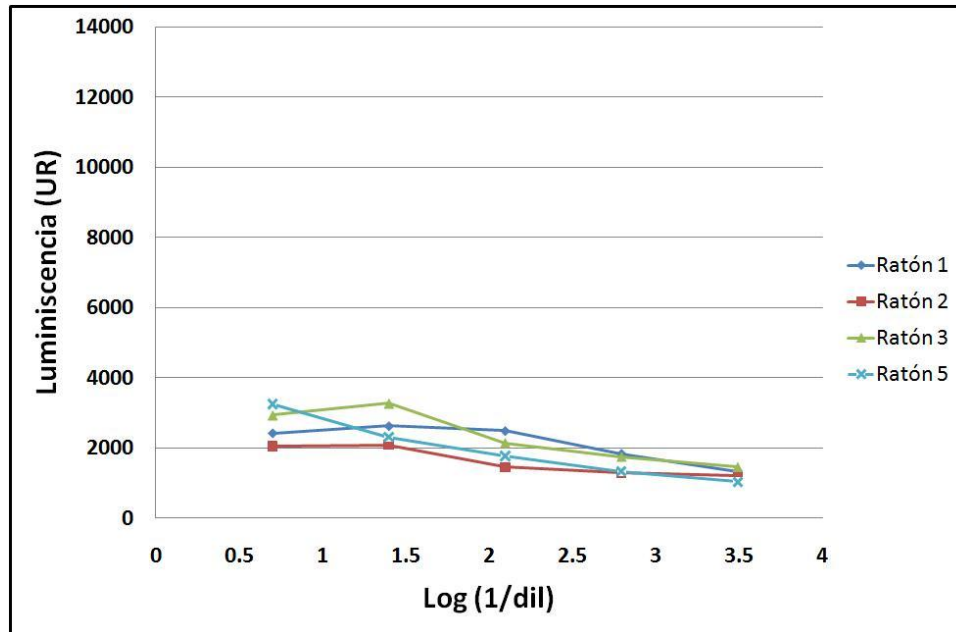


## Anexo 3

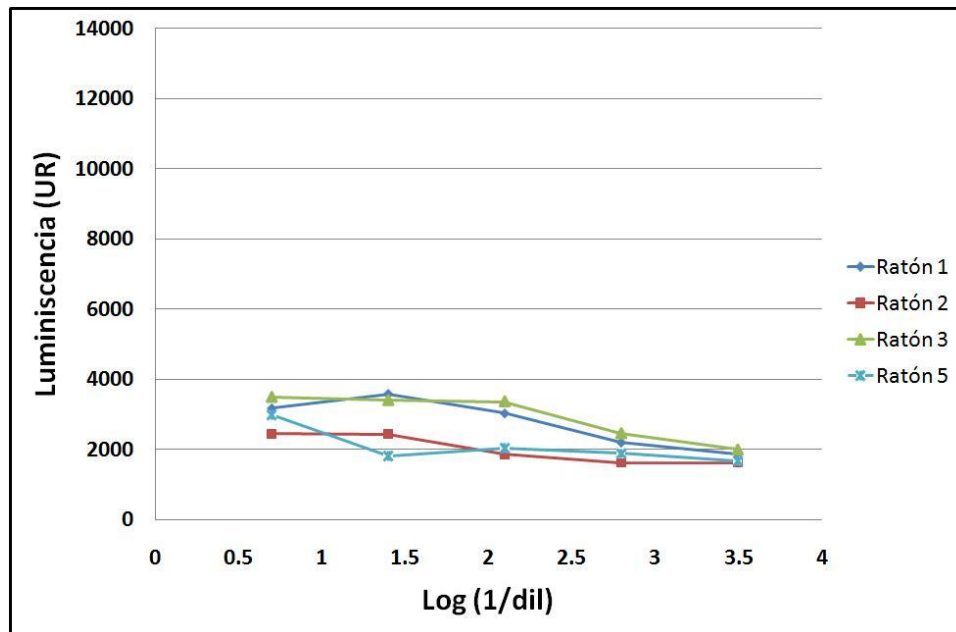
**Titulación de anticuerpo IgG2a de los ratones inmunizados con SSI como grupo control.**

Los Gráfico 1-5 muestran los valores de luminiscencia (UR) correspondientes a la titulación sérica de los ratones inmunizados con *M. avium* donde el control negativo se muestra como un promedio de los ratones inmunizados con SSI; en la Figura 10 se muestran los gráficos de la titulación sérica para cada tiempo de cada ratón inmunizado con SSI como grupo control.



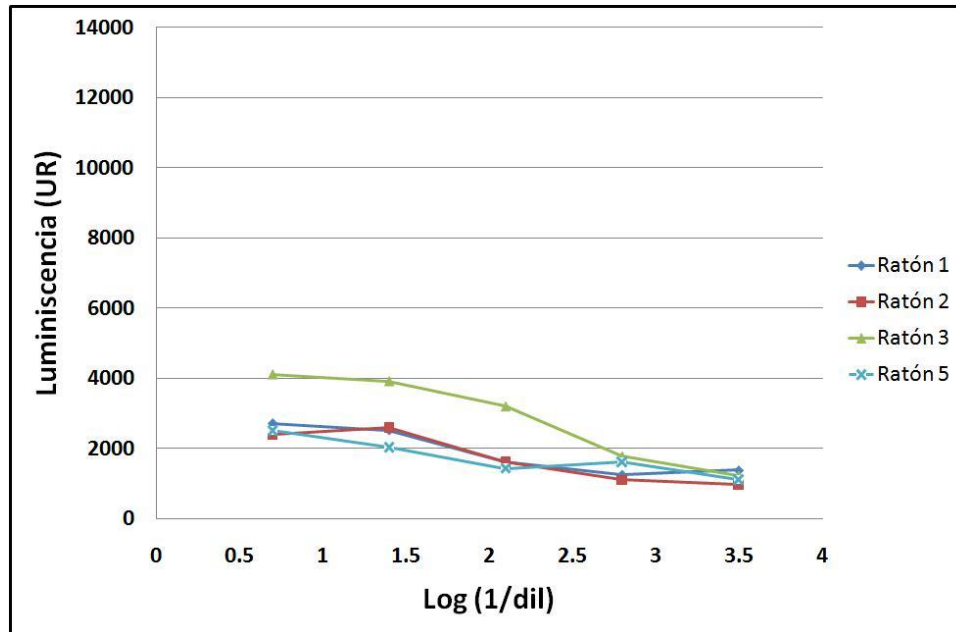


b)

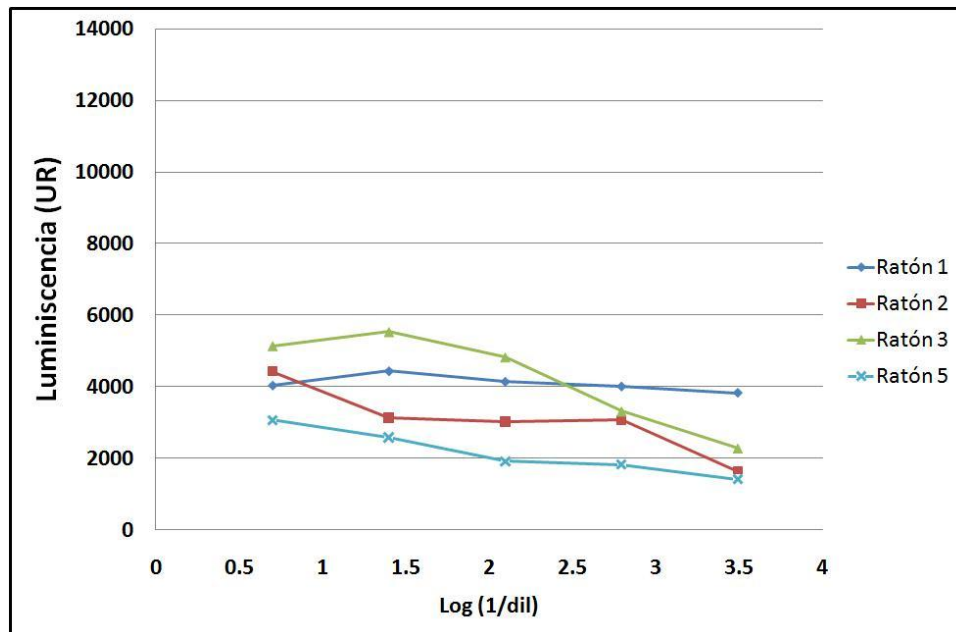


c)





d)



e)

**Figura 10 Titulación de anticuerpo IgG2a de los ratones inmunizados con SSI como grupo control.**

Los gráficos a, b, c, d y e corresponden a los valores de luminiscencia (UR) obtenidos de la titulación de anticuerpo IgG2a a los tiempos 0, 1, 2, 3 y 4 del esquema de inmunización para cada ratón inmunizado con SSI utilizados como grupo control.



## Anexo 4

### Preparación de reactivos.

- **Fucsina**

Fucsina básica	0.3 g
Alcohol etílico 95%	10 mL
Fenol (cristales derretidos)	5 g
Agua destilada	90 mL

- **Alcohol ácido**

Alcohol etílico	97 mL
Ácido clorhídrico concentrado	3 mL

- **Azul de metileno**

Azul de metileno	0.3 g
Agua destilada	100 mL

- **Reactivo de Bradford (50 mL)**

CBB G-250	50 mg
Alcohol etílico absoluto	25 mL
Ácido fosfórico	50 ml
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> cbp	500 mL

Almacenar a 4°C y cubrir de la luz.

- **Solución amortiguadora de carbonatos**

Carbonato de sodio	0.159 g
Bicarbonato de sodio	0.293 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> cbp	100 mL
Ajustar el pH a 9.6	

- **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)**



NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhidro	0.23 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	1.15 g
NaCl	9.00 g
H <sub>2</sub> O	cbp 1L
Ajustar el pH a 7.2-7.4	

- **Solución amortiguadora de fosfatos Tween 0.05% (PBS-T).**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhidro	0.23 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	1.15 g
NaCl	9.00 g
H <sub>2</sub> O	cbp 1L
Ajustar el pH a 7.2-7.4	
Tween 20	500µL

- **Poliacrilamida 12%**

Mezcla de Acrilamida/Bisacrilamida 30%	10 mL
Tris 1.5M pH 8.8	6.3 mL
SDS 10%	0.25 mL
APS 10%	0.25 mL
TEMED	0.01 mL
H <sub>2</sub> O	8.3 mL

- **Acrilamida/bis-acrilamida 30%**

Acrilamida (para electroforesis)	29.1 g
Bis- acrilamida	0.9 g
H <sub>2</sub> O cbp	100 mL

Desgasificar 30 minutos al vacío y filtrar con papel Whatman #1. Conservar a 4°C y cubrir de la luz.

- **Tris 1.5 M pH 8.8**

Tris base (para electroforesis)	25 g
H <sub>2</sub> O cbp	150 mL

Ajustar a pH 8.8 y filtrar con papel Whatman #1. Conservar a 4°C y cubrir de la luz

**Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10%**



SDS	10g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> Cbp	100mL

Filtrar con Whatman #1 y conservar a temperatura ambiente.

- **Solución amortiguadora de Tris (TBS)**

Tris base	12.1 g
Cloruro de sodio	40.0g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	cbp 5 L

Ajustar pH a 7.6 y almacenar a 4° C.

- **Solución amortiguadora de Tris Tween 0.1% (TBS-T)**

Tris base	12.1 g
Cloruro de sodio	40.0g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	cbp 5 L

Ajustar pH a 7.6 y almacenar a 4° C.

Tween 20	1mL
----------	-----



**BIBLIOGRAFÍA.**

1. Fernández de Vega, A., F., Esteban, M, J., González, M, J., Palácios, G, J., *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005.
2. Porteous, N.B., S.W. Redding, and J.H. Jorgensen, *Isolation of non-tuberculosis mycobacteria in treated dental unit waterlines*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004. **98**(1): p. 40-4.
3. Katoch, V.M., *Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM)*. Indian J Med Res, 2004. **120**(4): p. 290-304.
4. Euzéby, J.P., *List of Procariotic Names with Standing in Nomenclature*. 2010, <http://www.bacterio.cict.fr/>.
5. Gail L. Woods and John A. Washington, I., *Mycobacteria Other than Mycobacterium tuberculosis: Review of Microbiologic and Clinical Aspects*. Chicago journals 1987. **9**(2): p. 275-294.
6. Garza, V., R, Monroy Z, F., *Micobacterias no tuberculosas: actual importancia clínica y factores de virulencia*. Facultad de Química, UNAM.
7. Inderlied, C.B., C.A. Kemper, and L.E. Bermudez, *The Mycobacterium avium complex*. Clin Microbiol Rev, 1993. **6**(3): p. 266-310.
8. Koh, W.J., O.J. Kwon, and K.S. Lee, *Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent patients*. Korean J Radiol, 2002. **3**(3): p. 145-57.
9. Covert, T.C., et al., *Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(6): p. 2492-6.
10. Falkinham, J.O., 3rd, *Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(2): p. 177-215.
11. Falkinham, J.O., *The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease*. Can J Infect Dis, 2003. **14**(5): p. 281-6.
12. Field, S.K. and R.L. Cowie, *Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria*. Chest, 2006. **129**(6): p. 1653-72.
13. Dailloux M. , L.C., Weberm. and Hartemann PH. , *Water and nontuberculous Mycobacteria* Elsevier science, 1999. **Vol. 33**: p. 2219-2228,.
14. *Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. This official statement of the American Thoracic Society was approved by the Board of Directors, March 1997. Medical Section of the American Lung Association*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 2): p. S1-25.
15. Henry, M.T., et al., *Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response*. Eur Respir J, 2004. **23**(5): p. 741-6.
16. Primm, T.P., C.A. Lucero, and J.O. Falkinham, 3rd, *Health impacts of environmental mycobacteria*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(1): p. 98-106.
17. Vaerewijck, M.J., et al., *Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(5): p. 911-34.





18. Rosa Maria Carvalho Ferreira, M.H.F.S., *Non-tuberculous Mycobacteria I: One Year Clinical Isolates Identification in Tertiary Hospital Aids Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil, in Pre Highly Active Antiretroviral Therapy Era*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2002. **9**: p. 725-729.
19. Turenne, C.Y., R. Wallace, Jr., and M.A. Behr, *Mycobacterium avium in the postgenomic era*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(2): p. 205-29.
20. Tsang, A.Y., et al., *Clinical and epidemiological importance of typing of Mycobacterium avium complex isolates*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(2): p. 479-84.
21. Yoder, S., et al., *PCR comparison of Mycobacterium avium isolates obtained from patients and foods*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(6): p. 2650-3.
22. Pedley S. , B.J., Rees G., Dufour A., Cotruvo J.A., *Pathogenic mycobacteria in water : a guide to public health consequences, monitoring and management*. 2004, UK: World Health Organization.
23. Mijs, W., et al., *Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation Mycobacterium avium subsp. avium for bird-type isolates and 'M. avium subsp. hominissuis' for the human/porcine type of M. avium*. Int J Syst Evol Microbiol, 2002. **52**(Pt 5): p. 1505-18.
24. Maesaki, S., et al., *A clinical comparison between Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare infections*. Chest, 1993. **104**(5): p. 1408-11.
25. Falkinham, J.O., 3rd, *Mycobacterial aerosols and respiratory disease*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(7): p. 763-7.
26. Horsburgh, R.C., *Epidemiology of Mycobacterium avium Complex Disease*. Am J Med., 1997. **102**: p. 11-15.
27. Abbas, A.K., and A. L. Lichtman., *Inmunología celular y molecular*. 5th ed, ed. ELSEVIER. Vol. 1. 2004, Madrid.
28. Harvey Lodish, S.L.Z., Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell, *Manipulating Cells and Viruses in Culture*, in *Molecular Cell Biology*. 2004: New York.
29. Nelson, P.N., et al., *Monoclonal antibodies*. Mol Pathol, 2000. **53**(3): p. 111-7.
30. Antibodies, C.o.M.o.P.M., *Monoclonal Antibody Production*. 1999: NATIONAL ACADEMY PRESS.
31. Morales, J.C., *Técnicas de Diagnóstico en Virología*
32. Sikora, K., *Anticuerpos Monoclonales* Reverté, Editor. 1986.
33. Manual, *ClonaCell HY Information*. StemCell Technologies Inc, 2003. **1**.
34. Young, S.L., et al., *Environmental strains of Mycobacterium avium interfere with immune responses associated with Mycobacterium bovis BCG vaccination*. Infect Immun, 2007. **75**(6): p. 2833-40.
35. Castro, P.Á., A.P. , *Adjuvant treatment increases the resistance to Mycobacterium avium infection of Mycobacteria-susceptible BALB/c mice*. Clin Exp Immunol, 1993. **92**: p. 466-472.
36. Maiolini, E., et al., *Chemiluminescent ELISA for the BTEX determination in water and soil*. Anal Sci. **26**(7): p. 773-7.
37. Mascot Search Results <http://www.matrixscience.com>. 2010.
38. *National Center for Biotechnology Information NCBI*, in *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*.



39. Sassetti, C.M., D.H. Boyd, and E.J. Rubin, *Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis*. Mol Microbiol, 2003. **48**(1): p. 77-84.
40. EBI, *Enzyme Structures Database* <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>
41. Jackson, M., et al., *Mycobacterium tuberculosis Des protein: an immunodominant target for the humoral response of tuberculous patients*. Infect Immun, 1997. **65**(7): p. 2883-9.
42. Stenstedt, T.B.a.T., *2-D Electrophoresis Principles and Methods*. Amersham Biosciences, 1998.
43. Link, A.J., *2-D Proteome Analysis Protocols*. Methods in Molecular Biology Vol. 112. 1999, Washington, Seattle: Humana Press.

