



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CAMPUS "IZTACALA"

LOS GLICOLIPIDOS DE *Mycobacterium fortuitum*
COMO ANTIGENOS PARA EL INMUNODIAGNOSTICO
DE LA TUBERCULOSIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

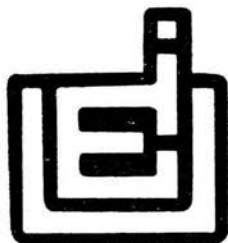
B I O L O G A

P R E S E N T A I

MARIA DE LOURDES ESCAMILLA ZEPEDA

B01206/96

Ej. 1



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor de tesis:

Doctora Luz María López Marín

Sustentante:

María de Lourdes Escamilla Zepeda

DEDICATORIAS

A mis padres María Dominga y Agustín: Porque solo la superación de mis ideales me han permitido comprender cada día más la difícil tarea de ser padres.

Mis conceptos, mis valores morales y mi sacrificio se los debo a ustedes: esto será la mejor de sus herencias, lo reconozco y lo agradeceré eternamente.

A mis hermanos Alejandro, Josefina y Francisco: Por el entusiasmo con el que apoyaron mi esfuerzo para seguir adelante.

A ti Ignacio: Por tu apoyo, cariño y comprensión para llegar a tener una de mis más preciadas metas en la vida.

A mis amigos y compañeros

Con mucho cariño.

Ma de Lourdes Escamilla Z.

AGREDECIMIENTOS

A mi asesora Dra. Luz María López M. por compartir sus conocimientos y experiencias y el gran apoyo que me brindó durante todo el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al H. Jurado por sus ideas para el enriquecimiento de este trabajo.

Al Instituto de investigaciones Biomédicas por la oportunidad que me brindó para la realización del proyecto.

A la ENEP Iztacala

A la UNAM

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
1. ANTECEDENTES.....	7
1.1 Tuberculosis.....	7
1.2 Diagnóstico y su problemática.....	9
1.3 Respuesta Inmune.....	11
1.4 Inmunodiagnóstico.....	14
1.5 Antígenos micobacterianos.....	15
1.6 <i>Mycobacterium fortuitum</i>	17
OBJETIVOS.....	20
ESQUEMA METODOLÓGICO.....	21
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
2.1 Cultivo de cepas.....	22
2.2 Extracción de lípidos.....	22
2.3 Técnicas cromatográficas.....	22
2.4 Técnica serológica.....	23
3. RESULTADOS.....	25
3.1 Purificación de los glicolípidos.....	25
3.2 Antigenicidad del 2,3-di-O-acil-trehalosa de <i>M. fortuitum</i>	27
3.3 Evaluación serológica del DAT.....	29
3.4 Evaluación serológica del TAT.....	31
3.5 Estudio serológico con el DAT y TAT en pacientes tuberculosos tratados con antifímicos.....	33
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	40

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin.
BSA	Albúmina sérica bovina
DAT	di-O-acil-trehalosa
DE	Desviación estándar
DO	Densidad óptica
ELISA	Inmunoensayo enzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)
LAM	Lipoarabinomanana
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPD	Derivado proteico purificado
SIDA	Síndrome de inmuno deficiencia adquirida
TAT	tri-O- acil-trehalosa
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Los glicolípidos pertenecientes a la familia de las trehalosas aciladas fueron aislados de células de *Mycobacterium fortuitum*, micobacteria de crecimiento rápido. En vista de que la estructura de estas moléculas está fuertemente relacionada con uno de los antígenos más específicos de *Mycobacterium tuberculosis*, el 2,3-di-O-acil-trehalosa, se analizó la aplicabilidad de estos compuestos en el diagnóstico serológico de la tuberculosis pulmonar humana por ELISA.

El di- y el tri-O-acil-trehalosa de *Mycobacterium fortuitum* también reaccionaron con anticuerpos de sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar, dando títulos altos comparados con los sueros de donadores sanos. Con una especificidad del 98%, la sensibilidad de la prueba fue arriba del 80% con el di-O-acil-trehalosa (DAT) y de 90% con el tri-O-acil-trehalosa (TAT). Además, los títulos anti-glicolípidos en individuos con tuberculosis tratada declinaron comparándolos con los títulos anteriores al tratamiento.

Estos resultados muestran que *Mycobacterium fortuitum* podría ser usado como fuente auxiliar de antígenos para el serodiagnóstico de la tuberculosis.

INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades infecciosas del hombre, la tuberculosis ha figurado como uno de los padecimientos más devastadores por su elevada mortalidad en todo el mundo.

Se estima que la tercera parte de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, el bacilo causante de la tuberculosis, aunque no todos desarrollen la enfermedad. Cada año se detectan 10 millones de nuevos casos de enfermos y un promedio de 3 millones de muertes. Para el año 2000 se estima una incidencia global de la enfermedad de 10.2 millones de casos por año, con un incremento del 36 % con respecto a los 7.5 millones de casos en 1990 (3, 4).

Entre los factores que contribuyen a la prevalencia de esta enfermedad se encuentran: una vacuna de eficacia cuestionada (la vacuna con el BCG ha dado resultados irregulares y no asegura la protección contra el bacilo de Koch); la asociación de la tuberculosis con SIDA, que ha provocado mayor descontrol tanto en países desarrollados como subdesarrollados; la aparición de nuevas cepas poliquimioresistentes y la falta de un diagnóstico oportuno, que propicia una mayor diseminación de la enfermedad.

En la actualidad los métodos de mayor uso para el diagnóstico de la tuberculosis son la baciloscopia y la radiología. Estos métodos son rápidos, sin

embargo el primero es poco sensible y el segundo es inespecífico. y para confirmar los resultados obtenidos frecuentemente debe realizarse el cultivo del bacilo, el cual es específico pero muy lento (tarda hasta 12 semanas). Otros métodos estudiados en las últimas décadas a fin de proporcionar un diagnóstico rápido son: la detección de ácidos nucleicos de *Mycobacterium tuberculosis* y el inmunodiagnóstico. Este último podría representar un método de diagnóstico rápido, que podría también auxiliar en el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar y tuberculosis infantil, pero la limitación actual que presenta es la falta de disponibilidad de antígenos específicos, debido a la dificultad que implica su obtención.

Uno de los compuestos extraídos a partir del bacilo tuberculoso que ha demostrado mayor especificidad como reactivo de inmunodiagnóstico es el diacil-trehalosa (DAT), glicolípido ausente en muchas otras especies de micobacterias, incluyendo *M. bovis*, *M. bovis* BCG, y algunas especies causantes de pseudotuberculosis. Recientemente se encontró que *Mycobacterium fortuitum* (micobacteria de crecimiento rápido, y que presenta menor patogenia que el bacilo tuberculoso) contiene un glicolípido de gran similitud con el DAT de *M. tuberculosis*. Esta semejanza estructural hace pensar que el DAT de *M. fortuitum* podría sustituir al antígeno de *M. tuberculosis* como reactivo de inmunodiagnóstico, dando lugar a una metodología de obtención simplificada.

ANTECEDENTES

1.1. TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa para el hombre, causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Se le ha considerado como uno de los padecimientos más devastadores por su elevada mortalidad en todo el mundo (4). Actualmente se estima que la tuberculosis tiene una incidencia de 10 millones de nuevos casos anuales, causando 3 millones de muertes por año (3, 4).

En la actualidad, la morbilidad causada por este agente va en aumento debido a la aparición de cepas tuberculosas resistentes a múltiples drogas, es decir insensibles a varios agentes antituberculosos tradicionales. Otros factores que contribuyen al aumento de esta enfermedad son, sin duda, el mal seguimiento de tratamientos antifímicos, así como al alto riesgo de la población infectada con el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) (22). Por todo ello se estima que para el año 2000, la incidencia global de la tuberculosis será un 36% superior a la de 1990 (3).

Los síntomas de esta enfermedad son: fatiga, pérdida de peso, sudores nocturnos, tos y expulsión de sangre en el esputo (27). El bacilo puede afectar varios órganos y tejidos por muchas vías; el pulmón es sin duda la sede más frecuente de la infección, la cual suele ser adquirida por inhalación de gotitas

generadas por individuos con enfermedad pulmonar activa que tosen y eliminan microorganismos al ambiente; estos bacilos sobreviven durante semanas en partículas de esputo desecado, lo que constituye una fuente potencial de infección (4, 27).

La enfermedad generalmente se desarrolla en un individuo como consecuencia de uno de tres procesos: progresión de la enfermedad primaria, reinfección exógena (adquiere una nueva infección) o reactivación endógena del bacilo latente (4). La tuberculosis progresiva primaria la desarrollan principalmente los niños ; en el 80% de los casos se manifiesta la enfermedad a los dos años de haber sido infectados. Los niños que desarrollan este tipo de enfermedad son generalmente negativos en la prueba de sensibilidad cutánea (4). En un periodo tardío, en cambio, la inmunidad de personas previamente infectadas puede decaer, con el riesgo de desarrollar una tuberculosis activa como consecuencia de una reinfección exógena o endógena.

Para controlar la tuberculosis se ha incluido la vacunación con el BCG, el diagnóstico bacteriológico y la quimioterapia. Sin embargo, estas medidas parecen insuficientes, lo cual ha llevado a la investigación del bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que provoca la enfermedad; esta micobacteria pertenece al grupo de bacterias gram-positivas. Es un bacilo pleomórfico, delgado, no encapsulado, no esporulado e inmóvil que mide de 0.2 μ m a 0.5 μ m de grosor con una longitud de 1 μ m a 4 μ m. En preparaciones teñidas, estos organismos muestran a menudo un aspecto arrosariado debido a la presencia de cuerpos de volutina y de vacuolas no

teñidas. Estos microorganismos se tiñen con gran dificultad, pero una vez teñidos conservan los colorantes en presencia de ácidos y alcohol, de aquí el término "ácidoalcoholresistente" (27).

El bacilo tuberculoso contiene en su pared celular una alta proporción de lípidos (60% del peso seco de la pared celular), lo cual explica sin duda su alta resistencia a los agentes físicos y químicos, a la destrucción celular por los fagocitos, su carácter hidrófobo, su crecimiento lento, su acidorresistencia y se cree que esos lípidos están involucrados en la virulencia y patogenicidad del bacilo. Además de lípidos, *M. tuberculosis* también contiene otros compuestos, como peptidoglicanos, polisacáridos y proteínas (4, 27)

1.2. DIAGNÓSTICO Y SU PROBLEMÁTICA

Siendo la tuberculosis una enfermedad infecciosa con una problemática mundial importante, su diagnóstico rápido y específico es una de las más urgentes necesidades en el empeño para erradicarla. La reciente ola de tuberculosis en asociación con el SIDA han hecho más aparente la necesidad de crear un método de diagnóstico rápido, simple y económico de esta enfermedad micobacteriana (11). Poco después del descubrimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, efectuado por Roberto Koch en 1884, el método que se usa para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar consiste en identificar al microorganismo infectante en la secreción del tejido de pacientes (13). En algunos lugares, el primer estudio que realizan es el

radiográfico del torax, pero debido a su inespecificidad los resultados deben ser confirmados mediante baciloscopia, que consiste en un análisis microscópico del bacilo, utilizando la tinción de Ziehl-Neelsen o un fluorocromo; este método carece de sensibilidad por lo que el diagnóstico debe reconfirmarse frecuentemente con el cultivo del bacilo, el cual puede tomar hasta 12 semanas (10,32). Además de la lentitud de este método, existe gran dificultad para obtener especímenes a partir de: pacientes con baja extensión de la enfermedad, personas con tuberculosis extrapulmonar y niños (que no producen esputo) (8, 13).

Otros métodos actualmente disponibles o en estudio para el diagnóstico de la tuberculosis son: el cultivo BACTEC, la detección de ácidos nucleicos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (10) y la detección de antígenos por inmunoensayos. Aunque el primero de estos métodos agiliza el tiempo de diagnóstico (en 2 semanas), su alto costo limita su implementación en países del tercer mundo, en donde la tuberculosis tiene mayor incidencia; el segundo detecta porciones específicas del ADN de agentes infecciosos, pero ha resultado poco sensible con muestras biológicas; el tercero, que está basado en la respuesta inmune del individuo hacia las micobacterias, requiere de antígenos específicos de difícil disponibilidad en la actualidad (8).

1.3. RESPUESTA INMUNE

M. tuberculosis es un patógeno intracelular facultativo que se replica en los macrófagos humanos e induce diversos efectos sobre el sistema inmune, lo cual incluye una respuesta celular y otra humoral.

Respuesta celular. En el individuo resistente, los mecanismos defensivos específicos e inespecíficos son efectivos para eliminar al bacilo. Sin embargo, en personas susceptibles, la respuesta a la introducción del bacilo tuberculoso comienza un proceso de captación, procesamiento y presentación de antígenos por parte de los macrófagos (6). Una de las primeras respuestas es la formación de granulomas llamados tubérculos, que contienen a los microorganismos que están proliferando. Durante la formación del tubérculo, leucocitos polimorfo nucleares y linfocitos se agrupan a su alrededor; con el tiempo este granuloma degenera y en la zona central se vuelve necrótica, produciéndose caseificación (12).

El reconocimiento de antígenos lo hacen las células T. A causa de este fenómeno, se inicia una serie de eventos (producción de citocinas, aparición de células T de memoria y células T maduras, etc.) pudiendo desencadenar hasta la destrucción del bacilo por los macrófagos.

La consecuencia de la respuesta de inmunidad celular que se puede observar con más rapidez es el desarrollo de una hipersensibilidad retardada a ciertos

componentes de la célula bacteriana y está relacionada con la protección contra la infección (12).

Respuesta humoral. La respuesta inmune humoral no está relacionada con mecanismos protectores pero puede servir, no obstante, al establecimiento del diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. La demostración en el suero de anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de las micobacterias permite detectar este tipo de respuesta, que ocurre durante la infección; esta detección se realiza actualmente por la técnica de inmunoensayo enzimático o ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) (ver Fig. 1.1) (23).



Etapa de adsorción del antígeno (○)



Etapa de saturación:

Saturación del soporte por un "agente bloqueador" (○)

Enjuages



Etapa del suero:

Fijación de un anticuerpo (Y) específico del antígeno

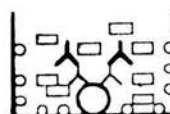
Enjuages



Etapa del conjugado:

Fijación de un conjugado (Y) (anticuerpo acoplado a una enzima)

Enjuages



Etapa del sustrato:

Adición del sustrato de la enzima (□) para obtener un producto colorido (■)



Lectura en espectrofotómetro

Fig. 1.1 Esquema ilustrado del principio de la técnica de ELISA.

1.4. INMUNODIAGNÓSTICO

El diagnóstico inmunológico de la tuberculosis puede hacerse por pruebas de hipersensibilidad retardada o midiendo anticuerpos antimicobacterianos en el suero (9).

Existe una prueba que ha sido utilizado desde los tiempos de Koch; la reacción cutánea o intradermoreacción. El valor diagnóstico de esta prueba es limitado, ya que resulta positivo en personas que han sido infectadas por otra especie micobacteriana, dándose una reactividad cruzada de *M. tuberculosis* con otras micobacterias (27); sucede lo mismo con muchas personas que han sido vacunadas contra la enfermedad, o que han tenido tuberculosis anteriormente. Además, no todas las personas con una infección activa reaccionan ante esta prueba, que se recomienda solo en poblaciones con baja incidencia de la enfermedad (8, 19).

Lo anterior ha motivado a la búsqueda de antígenos específicos de especie e inductores de respuestas de inmunidad humoral, con el fin de desarrollar pruebas serológicas de alta especificidad (8,9,15,21,28).

En muchas pruebas, incluyendo el ELISA, los resultados toman un rango de valor, pudiendo colocarse entre los resultados positivos (con enfermedad) o negativos (sin enfermedad). Para ello, debe especificarse un valor de corte el cual delimita ambos resultados. Una práctica común es considerar positivos todos los

resultados mayores a un valor de corte de 2 desviaciones estándar superior a la media de los valores control (valor de corte = $x + 2 DS$). Considerar un valor de 2.5 o 3 desviaciones estándar superior al promedio de los controles puede ser más apropiado, ya que se obtienen especificidades y sensibilidades más reales. La sensibilidad es la fracción de sujetos con la enfermedad que obtuvieron resultados positivos en la prueba y la especificidad es la fracción de sujetos sin la enfermedad de quienes se obtuvieron resultados negativos (8).

1.5. ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS

En los últimos años ha crecido el interés en conocer mejor la estructura molecular del bacilo de la tuberculosis. Ahora con mejores métodos, se han purificado y evaluado varios antígenos micobacterianos para el inmunodiagnóstico (entre ellos: proteínas, polipéptidos, polisacáridos, fosfolípidos y componentes de la pared celular). Los métodos utilizados para purificarlos incluyen la cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales, métodos fisicoquímicos sofisticados y biología molecular (15,20,31). El valor de estos antígenos en el diagnóstico serológico de la tuberculosis ha sido analizado generalmente por ELISA, debido a la alta sensibilidad que presenta este método.

En la tabla 1.1 se muestran los resultados obtenidos con algunos de estos antígenos.

Tabla. 1.1 Resultados por ELISA para el diagnóstico de tuberculosis, usando antígenos purificados y semipurificados.

Antígeno	Numero de individuos		Sensibilidad	Especificidad	Ref.
	tuberculosos	no TB			
antígeno 5 *	N.I	N.I	68%	91%	8
antígeno 6 *	36	21	93.8%	100%	8
Proteína 38-kD	49	48	68%	96%	14
Proteína 30-kD	77	92	61%	95%	15
SAGA ₁ +	N.I	N.I	91.3%	98.9%	8
SAG B ₁ +	N.I	N.I	73.9%	100%	8
SAG C +	N.I	N.I	56.5%	97.8%	8
LAM +	66	202	72%	91%	30
6,6'-dimicolato de trehalosa +	99	100	83.8%	100%	18
SL-IV (DAT) +	99	288	51.6%	100%	7
SL-IV (DAT) +	59 con SIDA	289	72.8%	99.3%	5

N.I: no se indica en los reportes publicados

* antígenos proteicos semipurificados

+ glicolípidos

Entre los ensayos serológicos realizados con diferentes proteínas, la que ha originado resultados más promisorios es la proteína de 38 kD (con una especificidad alta, pero con sensibilidad insuficiente) (14, 21).

Aunque algunos antígenos (protéicos o glicolípidicos) han proporcionado un diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad para un número de individuos restringido, éste no se ha podido confirmar con muestras más numerosas, a excepción de algunas moléculas de origen lipídico: la lipoarabinomanana (LAM) (30), el dimicolato de trehalosa (18) y el 2,3-diacil-trehalosa (7,28). La lipoarabinomanana y el dimicolato de trehalosa son moléculas compartidas por

todas las micobacterias por lo que un diagnóstico con estos compuestos no sería específico de infecciones debidas a *M. tuberculosis* sino a cualquier especie micobacteriana. En contraste, el 2,3-diacil-trehalosa (DAT) es un glicolípido que sólo ha sido encontrado en *M. tuberculosis*, *M.leprae* y *M. fortuitum*. Este glicolípido, anteriormente denominado SL-IV (5,7,24), proporciona además muy alta especificidad para la detección de la enfermedad, ya que la reactividad ante la prueba intradérmica de tuberculina y la vacunación contra la tuberculosis no interfieren con el diagnóstico (7).

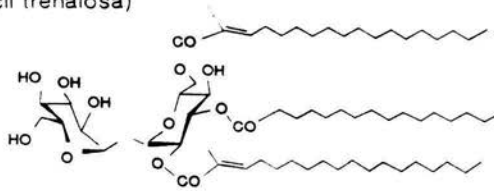
1.6. *Mycobacterium fortuitum*

Las micobacterias atípicas constituyen un grupo diverso y heterogéneo de bacilos acidoalcoholresistentes y de amplia distribución en el medio ambiente (12,16,23,25). La mayoría de estas micobacterias no son consideradas como patógenas para un adulto con un sistema inmunitario normal, por lo que anteriormente se les prestaba poca atención. Sin embargo, nuestra forma de vida actual ha sustentado un incremento en la incidencia de micobacterias atípicas: mientras algunas especies provocan infecciones postoperatorias difíciles de tratar terapéuticamente (23), otras de ellas infectan con facilidad a individuos inmunocomprometidos (por SIDA o por tratamientos quimioterapéuticos diversos) (25).

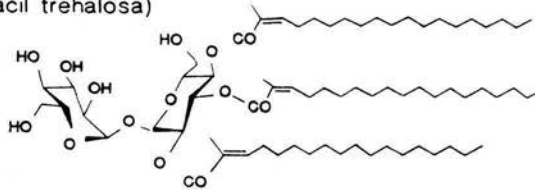
Mycobacterium fortuitum se halla como saprófito en el suelo y polvo. Es una micobacteria de crecimiento rápido, que puede causar micobacteriosis cutáneas o infectar órganos expuestos (durante operaciones clínicas) (16, 25).

En una investigación reciente sobre la estructura del micósido F, una familia de glicolípidos en *M. fortuitum*, se encontraron tres estructuras: 2,3-diacil, 2,3,4- y 2,3,6-triacil trehalosas (Fig.1.2); el tercero de estos compuestos tiene similitud con la estructura del glicolípido diacil-trehalosa detectado en extractos de *M. tuberculosis* (Fig.1.3) y previamente estudiado como antígeno para diagnosticar la tuberculosis (17): ambos compuestos contienen el mismo fragmento sacarídico (α,α' -trehalosa) con grupos acilo ligados en posición 2- y 3- de un mismo residuo de glucosa. La caracterización química detallada de éstas moléculas solo ha puesto en evidencia algunas diferencias contenidas en los grupos acilo entre el DAT de *M. tuberculosis* y el DAT de *M. fortuitum* (1), mientras que las moléculas TAT de *M. fortuitum* también poseen un motivo sacarídico común pero contienen tres residuos de ácido graso (Fig. 1.2).

(2,3,6-tri-O-acil trehalosa)



(2,3,4-tri-O-acil trehalosa)



(2,3-di-O-acil trehalosa)

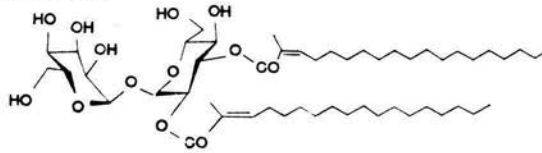


Fig. 1.2 Estructuras del micósido F de *Mycobacterium fortuitum*

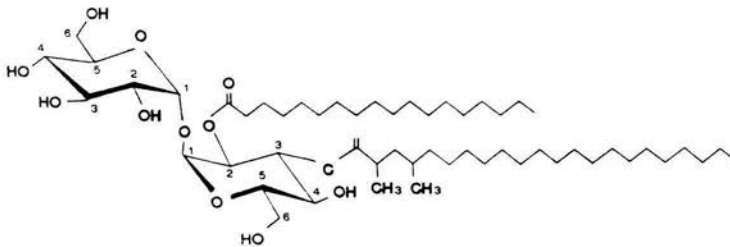


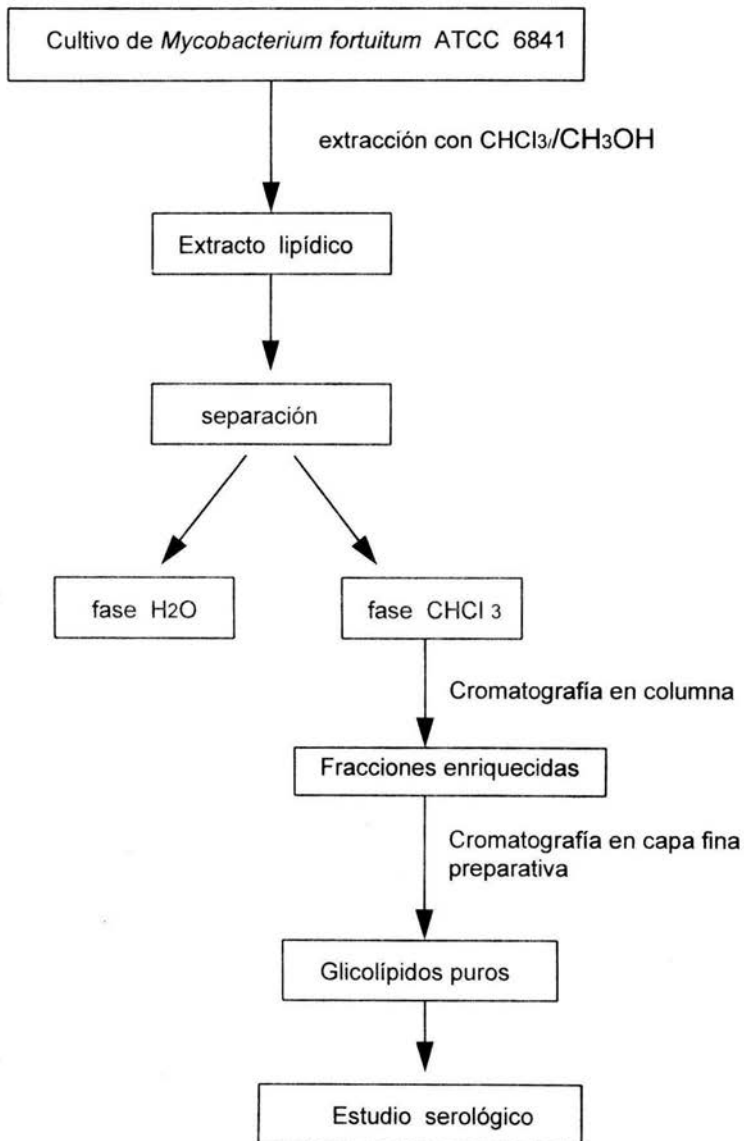
Fig. 1.3 Estructura del 2,3-di-O-acil - trehalosa (DAT) de *Mycobacterium tuberculosis*.

OBJETIVOS

Desarrollar una metodología reproducible para la obtención y la purificación de los glicolípidos antigenicos de *Mycobacterium fortuitum*.

Evaluar los glicolípidos (acil-trehalosas) de una micobacteria de crecimiento rápido, *Mycobacterium fortuitum*, como antígenos para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis.

ESQUEMA METODOLÓGICO



MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. CULTIVO DE LAS CEPAS

Las cepas de *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv fueron incubadas en medio líquido de Sauton a 37°C, la primera durante 2 semanas y la segunda durante 8 semanas.

2.2. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

Una vez pasado el tiempo de incubación, se separaron las micobacterias del medio de cultivo por decantación, se colocaron por cuatro días a temperatura ambiente en una mezcla de $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH}$ (1:2, v/v,) después se transfirieron a otra mezcla de $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH}$ (2:1, v/v). Posteriormente se concentraron los lípidos extraídos con los solventes y se lavaron con agua dos veces, sirviéndose de un embudo de separación.

2.3. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Cromatografía en columna. El extracto lipídico disuelto en un volumen mínimo de cloroformo se fraccionó en una columna de florisil (60-100 mesh, Biotecna Corp. Florida) eluyendo con un gradiente de concentraciones crecientes de metanol en cloroformo (0,2,5...50%, v/v) y finalizando con mezclas de cloroformo, metanol y agua (60:25:4 y 60:35:8, v/v). Se obtuvieron fracciones enriquecidas con triacil-trehalosas (eluyendo con 10% de metanol en cloroformo) y con diacil-trehalosa (eluyendo con 15% de metanol en cloroformo).

Cromatografía en capa fina. Los extractos lipídicos y las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna se analizaron por cromatografía sobre sílica gel (G 60, espesor de 0.25mm, Merck) utilizando como eluyentes CHCl_3 / CH_3OH (90:10, v/v) y CHCl_3 / CH_3OH / H_2O (60:21:1 y 60:25:4, v/v). Los lípidos se revelaron a 110°C después de una aspersión con una solución de antrona al 0.2% en H_2SO_4 concentrado. Los lípidos que contienen azúcares aparecen de color azuláceo.

Cromatografía en capa fina preparativa. La purificación final de tri-O-acil-trehalosa se realizó por cromatografía en capa fina preparativa (G60, espesor 0.5mm, Merck), utilizando como eluyentes CHCl_3 / CH_3OH / H_2O (60:16:2, v/v). Por aspersión con una solución de Rodamina-B y con ayuda de luz U.V, se detectaron las fracciones lipídicas puras, que fueron separadas de la sílica gel y de la rodamina-B eluyéndolas a través de pequeñas columnas de florisil con cloroformo.

2.4. TÉCNICA SEROLÓGICA

Se utilizó la técnica del inmunoensayo enzimático ó ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay). Los compuestos lipídicos se disolvieron en una mezcla de hexano y etanol (1:1 v/v), a diferentes concentraciones (2.00, 1.00, 0.50, 0.25 y $0.12\mu\text{g}/100\mu\text{L}$) para la búsqueda de condiciones y se depositaron en los pozos de placas para ELISA (Nunc-Immuno Plate, PolySorpTM) en donde se dejaron a 37°C , hasta evaporación del solvente (12 horas). Después de haber bloqueado con $200\mu\text{L}$ de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 3% durante 1 hora a 37°C , se

realizaron 5 lavados con solución amortiguadora de fosfatos. Enseguida se adicionaron 100 μ L de diferentes diluciones (para la búsqueda de condiciones) de sueros de pacientes tuberculosos y de personas sanas (1:100, 1:200, 1:300, 1:500, 1:1000 y 1:5000) en solución amortiguadora de fosfatos al 0.3% de BSA. Se incubaron a 37⁰C durante 1 hora y se realizaron 5 lavados con 200 μ L de solución amortiguadora de fosfatos por pozo.

Posteriormente se adicionaron 100 μ L de anti-anticuerpo (anti-Ig G) conjugado a la fosfatasa alcalina diluida en solución amortiguadora de fosfatos al 0.3% de BSA y se incubaron 1 hora a 37⁰C. Se hicieron 5 lavados con 200 μ L de solución amortiguadora de fosfatos al 0.3% de BSA. Finalmente se colocaron en cada pozo 100 μ L de una solución de *paranitrofenilfosfato* (1mg/mL) en una solución amortiguadora de dietanolamina. Se incubaron 15 minutos a 37⁰C y se leyó la densidad óptica (DO) a 405 nm en un espectrofotómetro para ELISA (Behring ELISA-Procesor M). Para los otros experimentos, este mismo procedimiento se realizó con una sola dilución de los sueros de pacientes tuberculosos y personas sanas (1:200) y una sola concentración de los glicolípidos (1 μ g/pozo).

RESULTADOS

3.1. Purificación de los glicolípidos

Los glicolípidos di-O-acil-trehalosa (DAT) y tri-O-acil-trehalosa (TAT) fueron purificados a partir de un extracto liposoluble de células de *Mycobacterium fortuitum* mediante técnicas cromatográficas de adsorción. Inicialmente se realizó una cromatografía en columna sobre florisil eluyendo con un gradiente de metanol en cloroformo. Los glicolípidos preponderantes eluidos a concentraciones de 10% y de 15% de metanol en cloroformo fueron identificados como TAT y DAT, respectivamente, con base en la comparación de sus Rf con estándares previamente caracterizados (17).

Las fracciones enriquecidas con TAT y DAT fueron sometidas a una segunda cromatografía en columna, empleando un gradiente más lento de metanol en cloroformo: 9 y 10 % para las fracciones enriquecidas con TAT y 11, 12, 13 y 14 % para aquellos con DAT. El TAT fue además purificado por cromatografía en capa fina preparativa. Con estos fraccionamientos se obtuvieron eluatos con TAT o DAT libres de otros contaminantes, como se observa en la figura 3.1.



Fig. 3.1 Análisis cromatográfico sobre sílica gel (solvente: CHCl_3 / CH_3OH / H_2O 60:16:2, v/v) de los extractos lipídicos de *M. tuberculosis* (M.tb), *M. fortuitum* (M.f) y de los glicolípidos triacil-trehalosa (TAT) y diacil-trehalosa (DAT) de *M. fortuitum*.

3.2.. Antigenicidad del 2,3-di-O-acil-trehalosa (DAT), de *M. fortuitum*.

Con el objetivo de investigar si el DAT de *Mycobacterium fortuitum* reacciona con sueros de pacientes tuberculosos y, en caso afirmativo, determinar las condiciones apropiadas para realizar evaluaciones serológicas, se hizo un estudio serológico por ELISA con 10 sueros, 5 de ellos provenientes de pacientes tuberculosos y los otros 5 de personas sanas. El antígeno fue depositado en cantidades de 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 μg por pozo y cada suero fue diluido en PBS en proporciones de 1:100, 1:200, 1:300, 1:500, 1:1000 y 1:5000.

Los resultados de este estudio demostraron que el DAT de *M. fortuitum* reaccionan con anticuerpos presentes en pacientes tuberculosos, proporcionando lecturas de densidad óptica significativamente superiores a las obtenidas con sueros de personas sanas. En la figura 3.2 se muestran los resultados obtenidos con una de las diluciones de sueros utilizadas.

Para todas las diluciones fue con 1 μg de antígeno en donde se alcanzaron lecturas máximas para los sueros de pacientes tuberculosos, sin obtener lecturas altas con sueros de personas sanas.

Por otra parte se observó que la diferencia entre las densidades ópticas obtenidas con sueros tuberculosos y las obtenidas con los sueros control fue superior al utilizar la dilución de 1:200.

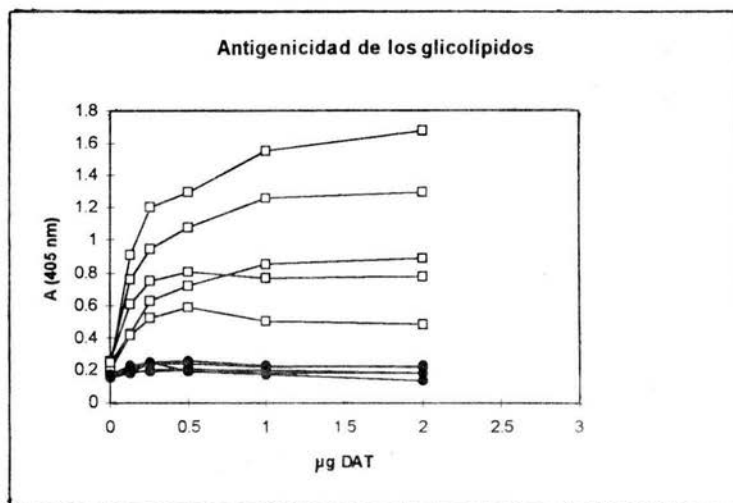


Fig. 3.2. Densidades ópticas obtenidas por ELISA, utilizando diferentes concentraciones de DAT y diluciones 1:200 de cada suero.

- sueros de personas sanas
- sueros de personas tuberculosas

3.3 Evaluación serológica del DAT

Utilizando 1 μ g de antígeno por pozo y diluciones 1:200, se realizó un estudio serológico con 160 sueros (60 sueros de individuos tuberculosos y 100 de personas sanas). De los resultados obtenidos por ELISA, se calcularon las especificidades y sensibilidades, usando tres valores de corte diferentes (2.0, 2.5 y 3.0 veces el valor de la desviación estándar arriba del promedio de lecturas con los individuos sanos) (Tabla 3.1). En la figura 3.3 se aprecian las lecturas obtenidas, mostrando uno de los valores de corte. Como puede observarse, los títulos de anticuerpos anti-DAT son significativamente mayores en individuos con tuberculosis pulmonar activa que en personas sanas.

TABLA 3.1. Especificidades y sensibilidades obtenidas por ELISA para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar con 100 sueros de personas sanas y 60 sueros de pacientes tuberculosos, usando el antígeno DAT de *M. fortuitum*.

VALOR DE CORTE	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
X + 2 DE = 0.129	88.3 %	96 %
X + 2.5 DE = 0.148	86.7%	98 %
X + 3 DE = 0.167	81.7 %	98 %

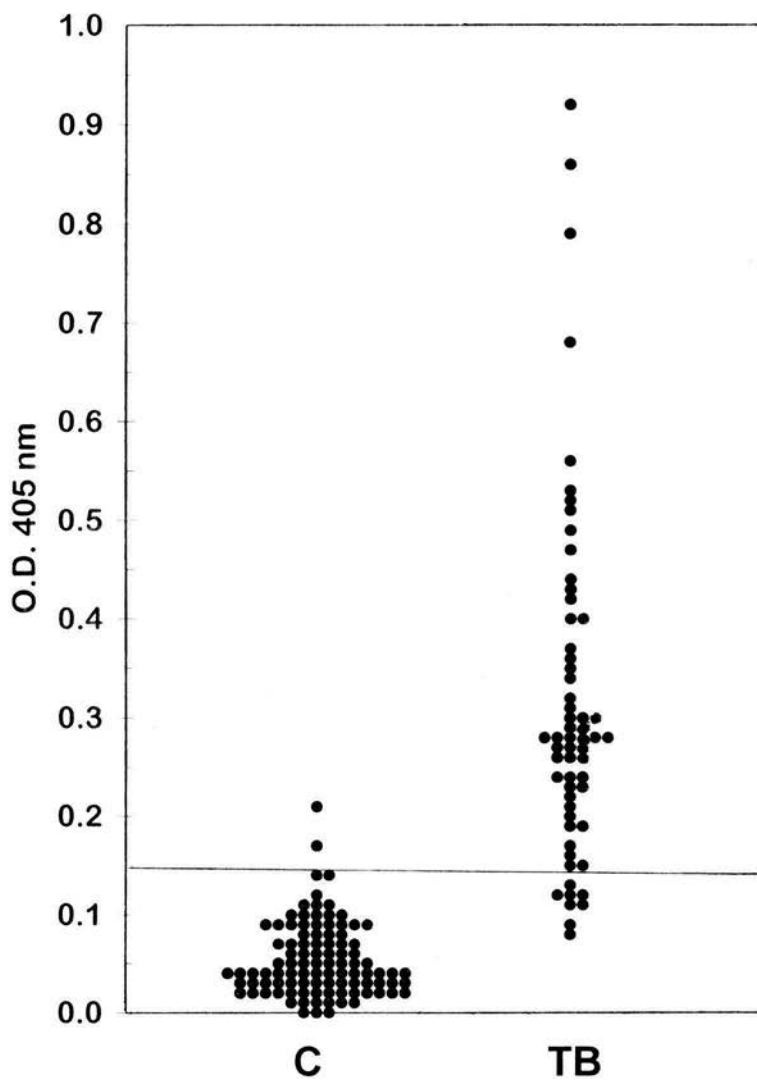


Fig. 3.3. Títulos de anticuerpos contra el antígeno DAT de *M. fortuitum* por ELISA en individuos sanos (C) y en enfermos con tuberculosis pulmonar (TB). El valor de corte se estableció en 0.148. Cada punto representa un individuo.

3.4 Evaluación serológica del tri-acil-trehalosa (TAT).

Ya que los resultados obtenidos con el antígeno DAT mostraron alta especificidad, se decidió hacer una evaluación del glicolípido TAT de *M. fortuitum*, que pertenece a la misma familia de compuestos. Sus especificidades y sensibilidades se calcularon usando tres valores de corte diferentes (tabla 3.2). En la figura 3.4 se muestran las lecturas obtenidas, empleando un valor de corte de 0.138.

Estos resultados demostraron que el glicolípido TAT reacciona también de manera específica contra sueros de individuos tuberculosos con respecto a individuos sanos. Además, la sensibilidad encontrada al usar este antígeno fue superior que al utilizar DAT.

TABLA 3.2 Especificidades y sensibilidades obtenidas por la técnica de ELISA para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar con 100 sueros control y 60 sueros de pacientes tuberculosos, usando el antígeno purificado TAT de *M. fortuitum*.

VALOR DE CORTE	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
$X + 2 \text{ DE} = 0.122$	91.6 %	96 %
$X + 2.5 \text{ DE} = 0.138$	91.6 %	97 %
$X + 3 \text{ DE} = 0.153$	90 %	98 %

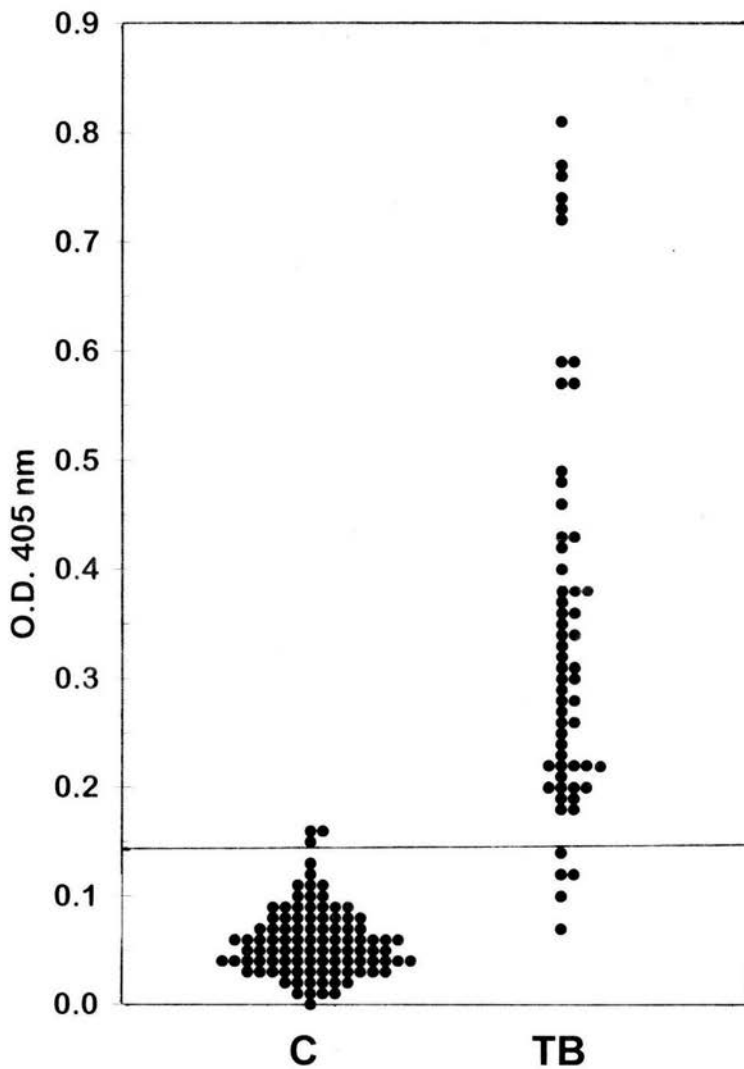


Fig.3.4. Títulos de anticuerpos contra el antígeno TAT de *M. fortuitum* por ELISA en pacientes con tuberculosis pulmonar (TB) y personas sanas (C).El valor de corte se estableció en 0.138. Cada punto representa un individuo.

3.5 Estudio serológico con el DAT y el TAT en pacientes tuberculosos tratados con antifímicos.

Se evaluó la reactividad de 27 sueros de pacientes tuberculosos, de los cuales se obtuvieron muestras antes del inicio del tratamiento antituberculoso y 18 meses después, usando DAT o TAT. Este estudio tiene como objetivo investigar la capacidad del ELISA utilizando los antígenos DAT o TAT para monitorear la recuperación de pacientes con tuberculosis. Los títulos obtenidos por ELISA en ambos grupos antes y después del tratamiento se muestran en la tabla 3.3. La figura 3.5 y 3.6 son gráficas con estos mismos resultados en donde se indica la relación de reactividades iniciales y posteriores al tratamiento para cada paciente. Se observó que los títulos de anticuerpos anti-DAT de *M. fortuitum* han sufrido un decremento en la mayor parte de individuos tratados con antituberculosos, lo que también sucedió con el antígeno TAT de *M. fortuitum*.

Tabla 3.3. Títulos obtenidos por la técnica de ELISA con 27 sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar, antes y después de 18 meses de haber iniciado un tratamiento antifímico.

No. de suero	Antígeno DAT		Antígeno TAT	
	Pretratamiento	Postratamiento	Pretratamiento	Postratamiento
1	.327	.363	.460	.467
2	.267	.237	.428	.170
3	.194	.182	.245	.112
8	.116	.252	.210	.324
9	.079	.078	.286	.205
10	.578	.128	.768	.175
11	.597	.249	.695	.285
12	.253	.174	.412	.242
13	.238	.049	.380	.144
17	.421	.055	.518	.130
18	.442	.271	.772	.628
19	.319	.152	.413	.321
20	.136	.086	.210	.107
21	.109	.026	.266	.171
22	.153	.094	.280	.163
26	.281	.147	.324	.178
27	.367	.133	.784	.376
30	.185	.003	.366	.077
35	.092	.109	.311	.242
37	.180	.102	.262	.129
38	.147	.063	.225	.190
41	.172	.045	.265	.175
42	.105	.077	.244	.171
48	.653	.412	.930	.575
49	.119	.058	.160	.062
52	.258	.195	.305	.216
53	.343	.226	.502	.341

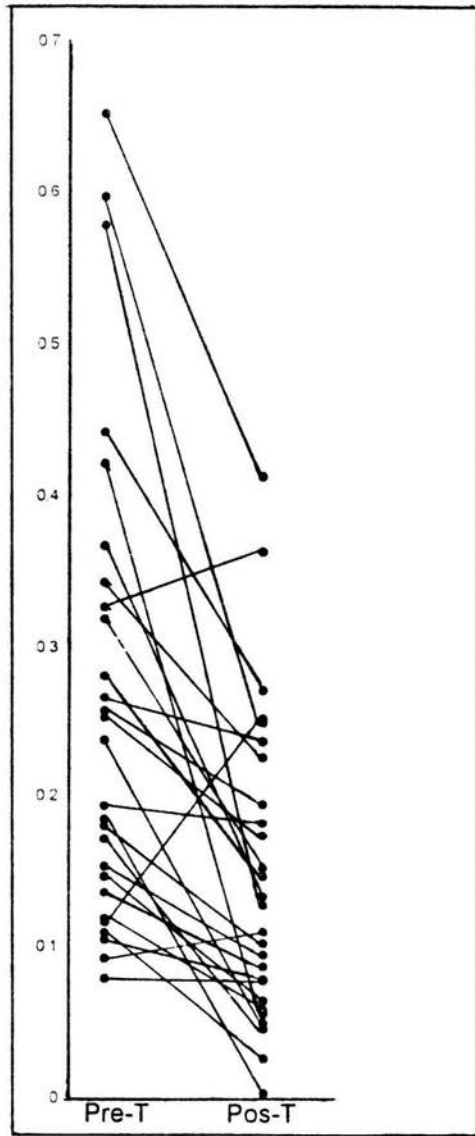


Fig.3.5 Títulos de anticuerpos contra el antígeno DAT, antes (Pre-T) y 18 meses después (Pos-T) de un tratamiento antituberculoso.

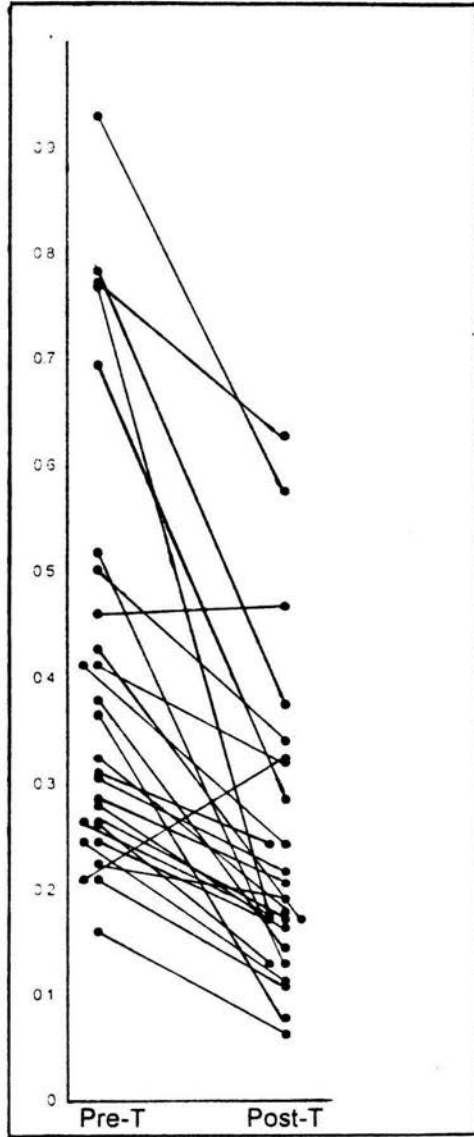


Fig.3.6 Títulos de anticuerpos contra el antígeno TAT antes (Pre-T) y 18 meses después (Pos-T) de un tratamiento antituberculoso.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En las micobacterias se han evaluado por lo menos 20 antígenos distintos para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis; algunos de éstos son específicos de especie, otros son comunes a diversas micobacterias (8,10,11,28). La obtención de resultados en un estudio serológico de la tuberculosis puede estar sujeto a reacciones cruzadas en personas que han sido sensibilizadas con la vacuna BCG o que han sido infectadas por alguna otra micobacteria (14,28).

El glicolípido DAT, obtenido a partir de células de *M. tuberculosis*, ha demostrado ser uno de los antígenos más prometedores para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis; este antígeno es específico ya que no reacciona con individuos que han sido vacunados con BCG, que han sido infectados con otras especies micobacterianas (7) o que reaccionan ante la prueba de intradermo reacción con PPD. Sin embargo, la extracción y purificación del glicolípido diacil-trehalosa (DAT) a partir del bacilo de Koch es difícil debido a la complejidad estructural de esta especie, a su crecimiento lento y a su patogenicidad (4). Por tal motivo se decidió trabajar con la especie *Mycobacterium fortuitum*, de la que se sabe, por un estudio de la estructura de su pared celular, que tiene un glicolípido muy similar al DAT detectado en *M. tuberculosis*, el 2,3-diacil-trehalosa (17).

El estudio demostró que el antígeno purificado DAT de *M. fortuitum* reacciona con los anticuerpos de sueros de personas tuberculosas en México, con

especificidades mayores al 96% y sensibilidades de 81 a 88%. El antígeno diacil-trehalosa de *Mycobacterium tuberculosis* puede, por consiguiente ser sustituido por el de *Mycobacterium fortuitum* para ser utilizado en el inmunodiagnóstico de la tuberculosis. Ya que *M. fortuitum* es una especie de crecimiento rápido, de menor patogenia y de menor complejidad estructural que *M. tuberculosis*, la obtención de este antígeno se simplifica de manera considerable.

Ya que el uso del DAT de *Mycobacterium fortuitum* como reactivo de diagnóstico para la tuberculosis pulmonar proporciona una prueba de alta especificidad y sensibilidad, el estudio de esta molécula para el diagnóstico de otros tipos de tuberculosis podría ser emprendido.

Considerando la dificultad que para obtener muestras biológicas presentan estos otros tipos de tuberculosis, como son la tuberculosis extrapulmonar y la infantil, el apoyo que este método de inmunodiagnóstico brindaría para su control sería extremadamente valioso.

Como el TAT de *M. fortuitum* pertenece a la familia de las trehalosas (17) y tiene una estructura similar al DAT, también se realizó una evaluación serológica con este glicolípido. Utilizando el TAT como antígeno, la especificidad fue arriba del 96% y la sensibilidad superior al 90%, lo que representó una prueba de diagnóstico aún más sensible que al utilizar DAT como antígeno, mostrando especificidades similares. El hecho de haber encontrado una reactividad importante con esta molécula, la tri-O-acil-trehalosa, no solo fue sorprendente sino que deja al descubierto dos hipótesis: la posibilidad de una reacción cruzada de esta molécula

con el DAT de *M. tuberculosis* (lo cual tendría implicaciones en una eventual síntesis de antígenos para el diagnóstico) o bien, la posible existencia de este antígeno triacilado en el bacilo tuberculoso. De cualquier manera, la reactividad del TAT con anticuerpos de personas tuberculosas incrementa aún más el interés de *Mycobacterium fortuitum* como fuente de antígenos antituberculosos prestados.

Por otro lado, al monitorear los títulos de anticuerpos contra DAT y contra TAT en pacientes después de 18 meses de haber iniciado un tratamiento contra la tuberculosis, se observó un decremento claro de los títulos de anticuerpos anti-DAT. Esta disminución en la reactividad anti-glicolípidos en individuos tratados parece indicar que estos antígenos detectan infección activa y no una tuberculosis sanada, lo cual sería una característica importante en estudios epidemiológicos. Sin embargo para confirmar estos resultados se requiere de un estudio con un número mayor de pacientes.

Finalmente, cabe mencionar que el método de purificación desarrollado permitirá, por otro lado, la fácil disponibilidad de estos antígenos para su estudio a nivel inmunológico celular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ariza, M., Luengo, F. and Valero, G. P. (1994) **A family of diacyltrehaloses isolated from *Mycobacterium fortuitum***. Microbiology 140,1989-1994.
2. Bariuta, T., Rigouts, L., Barrette, M., Collart, J., De Bruyn, J., Kadende, P., Kamarifu, G., Douglas, J. and Portaels, F. (1993) **Rapid, early and specific diagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases in Burundi**. Ann. Soc. Belg. Med. 73:1, 41-51.
3. Bell, J. M. (editor) (1995) **Environmental Engineering news**. School of Civil Engineering, Purdue University, Vol LII, Núm. 5 and 6.
4. Bloom, B. (1994) **Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control**. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Casabona, M., González, F., Papa, F., Rosselló, J., Vidal, R., Grau, C. and Ruiz, C. (1992) **Time course of Anti-SLIV Immunoglobulin G antibodies in patients with Tuberculosis and Tuberculosis- associated AIDS**. J. Clin. Microbiol. 30:5, 1089-1093.
6. Collins, M. F. (1993) **Tuberculosis: the return of and old enemy**. Crit. Rev. Microbiology 19:1, 1-13.
7. Cruaud, P., Yamashita, J., Casabona, N., Papa, F. and David, H. (1990) **Evaluation of a novel 2,3-diacyl-trehalose-2-sulphate (SLIV) antigen for case finding and diagnosis of leprosy and tuberculosis**. Res. Microbiol. 141, 679-694.

8. Daniel, T. and Debane, S. (1987) **The serodiagnosis of Tuberculosis and other Mycobacterial diseases by Enzyme-linked Immunosorbent assay.** Am. Rev. Respir. Dis. 135, 1137-1151.
9. Daniel, T. (1988) **Antibody and antigen detection for the immunodiagnosis of Tuberculosis: Why not? What more is needed? Where do we stand today?** J. Infect. Dis. 158:4, 678-680.
10. Daniel, T. (1989) **Rapid diagnosis of tuberculosis: laboratory techniques applicable in developing countries.** Rev. Infect. Dis. 11:2, 471-478.
11. Daniel, T. (1990) **The rapid diagnosis of tuberculosis: A selective review.** J. Lab. Clin. Med. 116:, 277-282.
12. Davis, B., Dulbeco, R., Eisen, H., Ginsberg, H., Wood, W. and Mc Carty, M. (1988) **Tratado de Microbiología (Inmunología y Biología Molecular)** Salvat, 2^a ed., 867-891.
13. De Arcila, C., De Martínez, C., Pérez, L. and García, L. (1995) **Antibody response to *Mycobacterium tuberculosis* antigen in children with Pulmonary Tuberculosis and in BCG vaccinated non tuberculosis pediatric patient.** Rev. Lat. Amer. Microbiol. 37:161-169.
14. Espitia, C., Cervera, Y., González, R. and Mancilla, R. (1989) **A 38kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation.** Clin. Exp. Immunol. 77, 373-377.

15. Espitia Pinzón, C. (1991) **Purificación de las proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* de 70, 50-55, 38, 30-31 y 16 kilodaltones. Análisis de sus propiedades antigénicas a nivel celular y humoral.** Tesis Doctoral del Colegio de Ciencias y Humanidades, Unidad Académica de los ciclos Profesional y de Posgrado, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM; México.
16. Freeman, B. (1983) **Tratado de Microbiología de Burrows.** Interamericana, México, 691-714.
17. Gautier, N., López, M., Lanéelle, M. and Daffé, M. (1992) **Structure of mycoside F, a family of trehalose containing glycolipids of *Mycobacterium fortuitum*.** FEMS Microbiol. Letters. 98:81-88.
18. He, H., Oka, S., Han, Y., Kusunose, M. and Yano, T. (1991) **Rapid serodiagnosis of human mycobacteriosis by ELISA using cord factor (trehalose-6,6'-dymicolate) purified from *Mycobacterium tuberculosis* as antigen.** FEMS Microbiol. Immunol. 76:201-204.
19. Huebner, R. e., Schen, M.F. and Bass, J. B. (1993) **The tuberculin skin test.** Clin. Infect.Dis.17:1968-1975.
20. Iyotsna, P. and Talib, V. (1993) **Laboratory Diagnosis of Tuberculosis: use of ELISE and PCR.** Indian Pat. Microbiol. 36:4, 512-518.

21. Jaccett, P Bothamley, G., Batra, H., Mistry, A., Young, D. and Ivanyi, J., (1988) **Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary Tuberculosis.** J.Clin. Microbiol. 26:11, 2313-2318.
22. Jacobs, R (1994) **Multiple-drug-resistant Tuberculosis.** Clin. Infect. Dis. 19:1-10.
23. Lagrange, H. (1991) **Les mycobactéries opportunistes, réactions de l' hôte.** Méd. Mal. Infect. 21: 35-45.
24. Lemassu, A., Lanéle, M.and Daffé, M. (1991) **Revised structure of a trehalose containing immunoreactive glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis*.** FEMS Microbiol. Letters.78:171-176.
25. López Marín, L. (1993) **Glycolipides de mycobactéries phatogènes opportunistes. Structures, activités et intérêt taxonomique.** Tesis Doctoral de L'Université Paul Sabatier de Toulouse (Sciences), Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Fondamentales, CNRS, Francia.
26. Minnikin, D., Ridell, M., Wallerström, G., Besra, G., Parlett, J., Bolton, R. and Magnusson, M. (1989) **Comparative studies of antigenic Glycolipids of *Mycobacteria* related to the leprosy bacillus.** Acta leprologica 1: 51-54.
27. Myrvick, Q., Pearsoll, N. and Weiser, R. (1977) **Bacteriología y Micología Médicas.** Interamericana, México 331-361.

28. Papa, F., Cruaud, P. and David, H. (1989) **Antigenicity and Specificity of Selected glycolipid fractions from *Mycobacterium tuberculosis***. Res. Microbiol. 140:569-578.
29. Ridell, M., Wallerström, G., Minnikin, D., Bolton, R. and Magnusson, M. (1992) **A comparative serological study of antigenic glycolipids from *Mycobacterium tuberculosis***. Tubercle 73:101-105.
30. Sada, E., Brennan, P., Herrera, T. and Torres, M. (1990) **Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis**. J. Clin. Microbiol. 28:12, 2587-2590.
31. Schluger, N. and Rom, W. (1994) **Current approaches to the diagnosis of active Pulmonary Tuberculosis**. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 149:264-267.
32. Wolinsky, E. (1994) **Conventional diagnostic methods for Tuberculosis**. Clin. Infect. Dis. 19:396-401.
33. Woods, G. (1995) **Tuberculosis role of the clinical laboratory in providing rapid diagnosis and assessment of disease activity**. Am. J. Clin. Pathol. 679-680.