

03081

3
29

Universidad Nacional Autónoma de México

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PURIFICACION DE LAS PROTEINAS DE Mycobacterium tuberculosis de 70
50-55, 38, 30-31 Y 16 KILODALTONES. ANALISIS DE SUS PROPIEDADES
ANTIGENICAS A NIVEL CELULAR Y HUMORAL

Tesis que para obtener el grado de
Doctora en Investigación Biomédica Básica

presenta

CLARA INES ESPITIA PINZON

MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I. INTRODUCCION

1. Epidemiología de la tuberculosis.
2. Inmunoprofilaxis: vacunación con Mycobacterium bovis BCG.
3. Inmunodiagnóstico
4. Los efectos del Mycobacterium tuberculosis sobre el sistema inmune.
 - Respuesta inmune celular
 - Respuesta inmune humoral
 - Autoinmunidad
 - Inmunosupresión
5. La estructura molecular del Mycobacterium tuberculosis.

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y METODOS

1. Bacterias y antígenos
2. Caracterización del perfil protéico del M. tuberculosis por electroforésis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
3. Inmunoblot con extractos antigénicos totales para

identificar bandas inmunodominantes.

4. Fraccionamiento de extractos antigénicos totales por el método de Seibert.
5. Búsqueda de glicoproteínas en extractos del M. tuberculosis.
6. Metodologías empleadas para la purificación de los antígenos.
 - A. Elución de las proteínas electrotransferidas con acetonitrilo.
 - B. Electroelución
 - C. Elución de las proteínas de geles de acrilamida con urea 6 M
 - D. Obtención de la proteína de estrés o choque térmico de 65 kDa del Mycobacterium leprae.
7. Producción de anticuerpos en contra de las proteínas del extracto total del filtrado del M. tuberculosis.
8. Estudio de la respuesta de hipersensibilidad retardada a proteínas purificadas en ratones.
9. Estudio de la respuesta inmune humoral a antígenos protéicos individuales por inmunoensayo enzimático (ELISA) en pacientes con tuberculosis pulmonar.

IV. RESULTADOS

1. Perfil protéico del filtrado del medio de cultivo y del sonicado del Mycobacterium tuberculosis.

2. Identificación de antígenos inmunodominantes por inmunoblot e "inmunoplot".
3. Fraccionamiento de extractos antigénicos totales por el método de Seibert.
4. Identificación de antígenos protéicos con residuos de carbohidratos.
5. Purificación de antígenos.
 - A. Purificación de la glicoproteína de 50-55 kDa.
 - B. Purificación de la proteína de 30-31 kDa
 - C. Purificación de la proteína de 70 Da.
 - D. Purificación de la glicoproteína de 38 kDa
 - E. Purificación de la proteína de 16 kDa.
6. Heterogeneidad de la respuesta de hipersensibilidad retardada a los antígenos protéicos individuales en el ratón.
7. La respuesta humoral a los antígenos protéicos individuales en pacientes con tuberculosis pulmonar.

V. DISCUSION

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFIA

VIII. APENDICES

1. High antibody levels to the mycobacterial fibronectin-binding antigen of 30-31-kD in tuberculosis and lepromatous leprosy.
(Manuscrito sometido a publicación)

2. PHOSPHATES STARVATION AUGMENTS THE EXPRESION OF THE 38-kilodalton Mycobacterium tuberculosis PROTEIN. Biochemical and imunoelectronmicroscopic studies.
(Manuscrito en preparación).

ISOLATION OF THE Mycobacterium tuberculosis PROTEINS OF 70, 65, 50-55, 38, 30-31, AND 16 KILODALTONS. ANALYSIS OF THEIR ANTIGENIC PROPERTIES AT THE HUMORAL AND CELLULAR LEVELS.

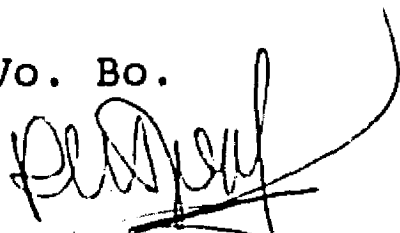
SUMMARY

Despite of the introduction of BCG vaccination and efficient antituberculous chemotherapy in the treatment of tuberculosis, this disease is still an important health problem in many countries¹. The objective of this thesis was to improve our knowledge on the molecular structure of M. tuberculosis with the goal of identifying and isolating antigens involved in humoral and cell mediated immune responses; this with the purpose of developing new and more efficient methods of immunodiagnosis and immunoprophylaxis. Based on their abundance², antigenicity^{3,4}, on the presence of carbohydrate residues⁵ and on their possible biological relevance^{6,7}, the protein of 70, 65, 50-55, 38, 30-31 and 16 kDa were selected for purification and immunologic analysis. From preparative gels of enriched fractions obtained by alcoholic acidic precipitation proteins were purified by elution with urea 6 M. In vivo studies with BALB/c mice revealed that the proteins of 50-55 and 16 kDa were the more efficient to induce delayed type hypersensitivity reactions. By ELISA the best results in the diagnosis of pulmonary tuberculosis were obtained with the 38 and 50-55 kDa glycoproteins. In addition, in this work the fibronectin-binding antigens were characterized and it was demonstrated that the 38 kDa glycoprotein is a molecule involved in phosphate metabolims.

LITERATURE CITED

1. Bloom, B.R. and Kodal, T. 1983. V. Leprosy. Rev. Infect. Dis. 5:765-780.
2. Jackett, P.S., Bothamley, G.H, Batra, H.V., Mistry, A.Young, D.B. and Ivanyi, J.1988. J. Clin. Microbiol. 26: 2313-2318
3. Espitia, C. Cervera, I., Gonzalez, R. and Mancilla R. 1989. Clin. Exp. Immunol. 77:373-377.
4. Espitia, C. Cervera, I and Mancilla, R. 1991. Arch. Invest. Med. (in press).
5. Espitia, C. and Mancilla, R. 1989. Clin. Exp. Immunol. 77:373-377.
6. Abou-Zeid, C., Ratliff, T.L.L., Wiker, H. G., Harboe, M., Bennedsen, J. and Rook, G.A.W. 1988. Infect. Immun. 56: 3046-3051.
7. Young. D., Lathigra, R., Hendrix, R., Sweetser, D., Young,R. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. 85:4267-4270.85.
8. Seibert, F.B. 1949. Am. Rev. Tuberc. 59:86-101

Vo. Bo.



DR. RAUL MANCILLA JIMENEZ

ASESOR

INTRODUCCION

Por sus tasas altas de morbi-mortalidad la tuberculosis continua siendo un problema de salud pública importante especialmente en los países en vías de desarrollo¹. El incremento en la prevalencia de tuberculosis con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), ha resultado en un aumento en el número de casos de la tuberculosis aun en países desarrollados². Los esfuerzos para controlar la tuberculosis han incluido la vacunación con BCG, el diagnóstico bacteriológico y la quimioterapia. Parece ahora claro que estas medidas son insuficientes para erradicar la enfermedad. Los efectos protectores de la vacunación han sido muy variables³, la baciloscopia es insegura, el cultivo requiere de un largo periodo de tiempo⁴ y la quimioterapia se enfrenta al problema del surgimiento de cepas resistentes⁵. Por lo anterior, en el momento actual se hace necesario redoblar esfuerzos en la investigación básica, sobre todo en lo que concierne a la dilucidación de la estructura molecular del bacilo de la tuberculosis. Se cree que de esta manera se podrán identificar antígenos que induzcan inmunidad protectora y que podrían servir de base para el desarrollo de vacunas eficientes. El conocimiento de la estructura molecular permitirá además, identificar antígenos para diseñar métodos de inmunodiagnóstico y moléculas que participen en otras facetas de la interacción huésped-bacteria, como son la infectividad y la virulencia.

1. EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS

Según la Organización mundial de la Salud y la Unión Internacional contra la tuberculosis y enfermedades pulmonares, cada año se presentan en el mundo de 8 a 10 millones de nuevos casos de tuberculosis y ocurren de 2 a 3 millones de muertes anuales por esta enfermedad^{1,6}. Tres cuartas partes de los casos se presentan en los trópicos, siendo Africa el continente más afectado, seguido por Asia y América Latina⁷. Se estima que en algunos países la mitad de la población entre los 20 y 40 años ha sido infectada por el Mycobacterium tuberculosis aun cuando no esté presente la enfermedad⁸.

En México, los datos presentados en el informe epidemiológico anual de 1982 de la SSA⁹ que comprende el periodo 1972-1982, muestran un patrón descendente en los índices de morbilidad y mortalidad de la tuberculosis (Fig. 1). La tasa de morbilidad más alta se registró en 1972 (33.7 por 100,000) y la más baja en 1982 (11.6 por 100,000). A pesar de este descenso, la tuberculosis continuó siendo una de las principales causas de mortalidad por enfermedades transmisibles como se ilustra en la Tabla I, en donde se observa que en 1971 la tuberculosis ocupó el cuarto lugar como causa de muerte, lo que no varió en los años siguientes e inclusive llegó a ocupar el tercer lugar en 1979. San Luis Potosí, Hidalgo, Coahuila, Chiapas y Veracruz fueron los estados de la República Mexicana que ocuparon los primeros lugares de mortalidad por tuberculosis durante el periodo 1978-1982, estos mismos estados además de Nayarit,

MORBILIDAD Y MORTALIDAD POR TUBERCULOSIS PULMONAR
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
1972-1982

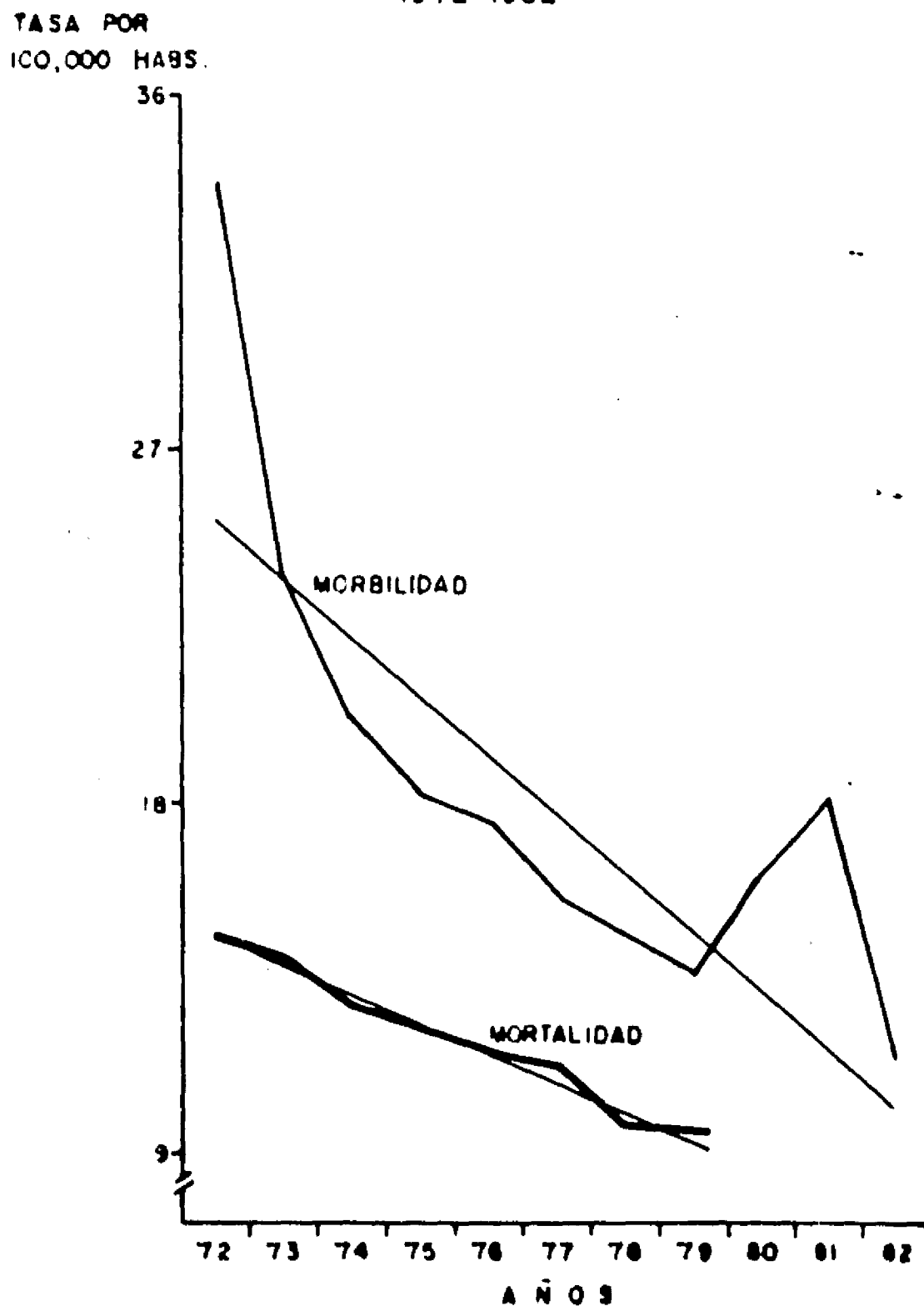


Figura 1. (Tomada de referencia 9)

TABLA I

MORTALIDAD* POR ENFERMEDADES TRANSMISIBLES
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
1971 - 1979

ENFERMEDAD	CLAVE O. M. S.	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979
Amibiasis	006	4.4	4.9	4.3	3.6	3.5	3.5	3.2	2.6	2.6
Hemorragia	008	0.01	0.02	0.0	0.0	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
Brucelosis	023	0.11	0.8	0.7	0.04	0.06	0.06	0.05	0.07	0.03
Difteria	012	0.21	0.23	0.19	0.19	0.14	0.07	0.08	0.06	0.08
Disenteria bacilar	004	1.1	1.3	1.1	0.6	0.5	0.5	0.4	0.3	0.3
Enteritis y otras enfermedades diarreicas	008-009	126.5	127.0	107.0	87.4	84.9	82.2	75.8	60.6	55.2
Fiebre paratifoidea	002.1-002.9	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1
Fiebre tifoidea	002.2	4.9	6.5	5.2	3.6	3.2	2.2	2.3	2.0	1.9
Hepatitis infecciosa	070	1.2	1.1	1.0	0.8*	0.8	0.8	0.9	0.8	0.9
Infecciones respiratorias agudas (otras)	160-169	17.6	17.8	10.8	12.3	8.6	9.9	6.2	4.2	4.2
Influenza	487	14.0	11.7	13.1	7.2	7.4	8.9	5.5	4.5	3.5
Lepra	030	0.06	0.09	0.05	0.05	0.07	0.05	0.06	0.07	0.04
Mal del pinto	103	-	0.0	0.0	-	0.0	0.0	-	-	-
Neumonias	480-486	120.3	115.9	107.4	90.1	82.2	89.1	72.6	61.2	53.5
Paludismo	081	0.7	0.08	0.04	0.08	0.11	0.03	0.02	0.0	0.0
Parotiditis	072	0.08	0.10	0.07	0.04	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01
Poliomielitis	045	0.4	0.4	0.3	0.2	0.4	0.2	0.3	0.3	0.3
Rabia**	071	0.14	0.13	0.09	0.14	0.13	0.11	0.11	0.13	0.15
Rubeola	056	0.03	0.09	0.01	0.01	0.0	0.04	0.02	0.02	0.02
Salmonelosis (otras)	003	2.4	3.7	2.5	1.7	1.4	1.5	1.4	1.3	1.2
Sarampión	055	14.0	21.9	4.8	0.8	0.6	9.95	8.2	0.5	2.8
Sífilis todas formas	090-097	8.5	0.9	0.5	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
Sífilis congénita	090	0.24	0.32	0.25	0.22	0.08	0.07	0.06	0.03	0.03
Sífilis adquirida	091-097	0.26	0.55	0.23	0.12	0.12	0.13	0.08	0.08	0.09
Tétanos	037, 771.3	3.5	3.2	3.2	2.9	2.5	2.3	2.3	2.2	1.9
Tifo murino	081.0	-	-	-	-	0.0	-	-	0.02	0.00
Tos ferina	033	11.1	8.0	6.6	5.2	2.2	3.8	4.9	2.0	2.1
Tuberculosis del aparato respiratorio	010-012	15.4	14.8	14.3	12.9	12.4	11.8	11.3	9.9	9.5
Varicela	052	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

* Por 100 000 habitantes.
** Datos depurados por el Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica de las Zoonosis.
- No se registraron defunciones.
FUENTE: Dirección General de Estadística/S.P.P.
*Ibt.

Tabla I. (Tomada de referencia 9)

Quintana Roo y Guerrero ocuparon los primeros lugares de morbilidad durante 1975-1979.

Aunque los datos presentados muestran un descenso global en las tasas de tuberculosis en México, estos no señalan la magnitud real del problema, pues se calcula que un 40% de los casos de tuberculosis no se registran¹⁰.

A nivel mundial existe preocupación por las variaciones epidemiológicas que pudieran darse en la tuberculosis debido a su asociación con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Se ha observado que el M. tuberculosis es uno de los primeros patógenos oportunistas que infectan a los individuos con SIDA^{11,12}. Es de interés, que del 20 al 60% de los pacientes admitidos por tuberculosis son seropositivos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)^{2,12}. Esto indica que el M. tuberculosis infecta a los portadores del VIH en estadios tempranos aun antes de que haya una inmunodeficiencia manifiesta. Lo anterior sugiere que la inmunodeficiencia inducida por el VIH aumentará los portadores del M. tuberculosis lo cual podría resultar en un aumento en las tasas de tuberculosis no solo en los pacientes con SIDA sino también en la población general. En efecto, en los Estados Unidos de América, país en donde se venía observando un continuo descenso en las tasas de tuberculosis desde hace muchos años, ha habido en los últimos años un incremento en el número de casos nuevos en San Francisco y en otras regiones con tasas altas de SIDA. Es notable que en 1987 se registraron 322 casos nuevos de tuberculosis, 5.6% de los cuales estaban asociados a SIDA. Esta

incidencia fué 14% superior a la de 1986. En las diez primeras semanas de 1988 el número de casos aumentó un 42% en relación con el mismo periodo de 1987¹³. En otros países, como Tanzania, Burundi, Uganda y Zaire se han hecho observaciones similares^{14,15}. En México se desconoce la influencia del SIDA en las tasas de tuberculosis.

Todos los observaciones anotadas anteriormente son indicadores de que la tuberculosis continúa siendo un problema importante de salud y por lo tanto es necesario continuar la búsqueda de medidas conducentes a su control y/o erradicación.

2. INMUNOPROFILAXIS: VACUNACION CON EL Mycobacterium bovis BCG

El origen de la vacuna contra la tuberculosis se remonta a principios del presente siglo. Entre 1906 y 1919 los investigadores Calmette y Guerin lograron obtener una cepa atenuada del Mycobacterium bovis mediante numerosos pases in vitro. La nueva cepa se denominó M. bovis BCG en honor a estos investigadores. Esta vacuna se usó por primera vez en Europa en 1921 y desde entonces se ha aplicado prácticamente en todo el mundo. Los resultados de los estudios a largo plazo para evaluar la eficacia de la vacunación con el BCG han sido muy variables. En algunos grupos de población en Norteamérica y en Inglaterra se ha alcanzado hasta un 80% de protección. En otras regiones como el Sur de la India la vacunación no ha tenido ningún impacto sobre la frecuencia de la enfermedad³. Se desconoce el porqué de esta variabilidad; se ha postulado que la heterogeneidad clonal del BCG podría explicar los resultados anteriores. Otras posibles causas se han atribuido a diferencias en el estado de sensibilización previo, en la estructura genética del huésped, en el estado nutricional, en el grado de exposición al bacilo, en los programas de vacunación y en la virulencia e infectividad de las cepas de M. tuberculosis¹⁶. Ninguna de éstas alternativas ha sido comprobada siendo contradictorios los resultados de los diferentes estudios². Por lo anterior hay el consenso de que es necesario desarrollar nuevas vacunas pues la vacunación con el BCG no parece ser la solución para controlar y menos aun para

erradicar a la tuberculosis. El desarrollo de nuevas vacunas requiere necesariamente del conocimiento de la estructura molecular del bacilo de la tuberculosis a fin de identificar los antígenos capaces de inducir inmunidad protectora.

La introducción de la biología molecular al estudio de las micobacterias a permitido profundizar en el conocimiento básico de los genomas micobacterianos. Además, ha hecho posible la clonación y expresión de algunos genes que codifican para proteínas con actividad inmunológica¹⁷. Actualmente la investigación se está orientando hacia la búsqueda de nuevos huéspedes de clonación de genes que incluyen a las micobacterias cultivables y más aun, se ha propuesto el desarrollo de vacunas vivas recombinantes, sugiriéndose la posibilidad de que la micobacteria misma, especialmente el BCG pueda ser un "acarreador vivo" de genes involucrados en la inmunidad protectora¹⁸.

3. INMUNODIAGNOSTICO

La identificación de individuos infectados ha sido uno de los principales problemas que se han afrontado en la tuberculosis. Los métodos clásicos de diagnóstico dependen de la identificación del bacilo en baciloscopías o por cultivo, en las secreciones o tejidos de los individuos enfermos. Este método diagnóstico es ineficiente en casos de tuberculosis circunscrita, en las formas extrapulmonares y en niños quienes son incapaces de expectorar. Por otra parte el diagnóstico de

mayor sensibilidad y seguridad que es la identificación del bacilo por cultivo, toma habitualmente entre 6 y 10 semanas⁴.

La intradermoreacción y las pruebas serológicas usando mezclas complejas de antígenos han estado seriamente limitadas en áreas donde la enfermedad es prevalente o se lleva a cabo la vacunación con el BCG y también en lugares donde la población ha sido sensibilizada por otras micobacterias, ya que la extensa reactividad cruzada de éstas con el bacilo de la tuberculosis pueden dar lugar a gran número de resultados falsos positivos. Lo anterior ha motivado la búsqueda de antígenos individuales especie-específicos, inductores de respuestas de inmunidad humoral vigorosas para ser usados como reactivos de serodiagnóstico. Se han hecho ensayos con antígenos puros obtenidos por diferentes métodos. Hasta ahora los resultados no han sido del todo satisfactorios. En general la especificidad obtenida ha sido alta pero la sensibilidad no ha sido suficiente^{19,20,21,22}. En lo que concierne al valor diagnóstico de las pruebas de intradermoreacción con el PPD los resultados son muy variables. En algunos países donde la tuberculosis es rara la prueba se ha considerado diagnóstica mientras que en países como el nuestro en donde la mayoría de los individuos sanos son PPD positivos, la prueba carece de valor diagnóstico²³.

Recientemente, la utilización de herramientas de biología molecular ha permitido el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, que consisten principalmente en la identificación de secuencias del DNA micobacteriano con sondas específicas de

DNA²⁴. Actualmente existen sondas de DNA comerciales para identificar al M. tuberculosis, estas sondas sin embargo requieren que las micobacterias hayan sido cultivadas previamente. Otro abordaje, ha sido la búsqueda de secuencias específicas en los DNAs de diferentes micobacterias con base en el polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) (Del Inglés, restriction fragment-length polymorphisms), ésto ha permitido la identificación de secuencias repetitivas en los genomas micobacterianos; uno de estos elementos, el IS986 se ha aislado del genoma del M. tuberculosis y ha demostrado ser una sonda altamente específica, de valor diagnóstico y epidemiológico en la tuberculosis^{26,27}. Recientemente se ha utilizado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación e identificación de muchos microorganismos incluyendo a las micobacterias^{28,29}. Usando como "primers" oligonucleótidos derivados de la secuencia de los genes que codifican para los antígenos de 65 y 38 kDa del M. tuberculosis, se ha logrado la identificación y amplificación del DNA de la micobacteria directamente de muestras clínicas, provenientes de enfermos con tuberculosis^{30,31}.

4. LOS EFECTOS DEL Mycobacterium tuberculosis SOBRE EL SISTEMA INMUNE

La tuberculosis es una enfermedad cuyo agente etiológico, el Mycobacterium tuberculosis, fué identificado hace más de 100 años por Robert Koch. El M. tuberculosis es un patógeno intracelular facultativo que se replica en los macrófagos humanos, e induce diversos efectos sobre el sistema inmune, entre los que se incluyen: una respuesta celular que conlleva a la activación de linfocitos T y macrófagos, formación de granulomas, producción de anticuerpos y fenómenos de inmunosupresión y de autoinmunidad, además de la bien conocida actividad de adyuvante en la respuesta inmune. La gama de efectos que produce el bacilo sobre el sistema inmune ponen de manifiesto la enorme complejidad de la relación huésped-párasito en esta infección.

RESPUESTA INMUNE CELULAR

Una de las principales características de la respuesta inmune al M. tuberculosis fué descrita por Robert Koch y se conoce como " el fenómeno de Koch". El observó que la respuesta inflamatoria a la inyección intradérmica de bacilos cicatrizaba más rápidamente en cobayos previamente sensibilizados. Posteriormente, se demostró que se podía inducir la misma respuesta inflamatoria en la piel de individuos tuberculosos por la inyección intradérmica de bacilos muertos o por extractos obtenidos a partir del medio de cultivo de las micobacterias

(tuberculina vieja de Koch). Pronto se reconoció el valor diagnóstico de este fenómeno, que está catalogado como una respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) ya que produce un pico de inflamación entre las 24 y 72 horas después del reto. En 1945, Chase demostró que éste tipo de inflamación estaba mediado por células, al transferir la hipersensibilidad a la tuberculina a animales no sensibilizados con células obtenidas de animales sensibilizados³². Los trabajos pioneros de Lurie y Mackannes, condujeron a establecer que la inmunidad antimicobacteriana protectora depende de la activación de macrófagos la cual es mediada por células T^{33,34}. El papel central que juegan los linfocitos T en la expresión de la inmunidad antituberculosa se ha documentado ampliamente en modelos animales experimentales. Se ha demostrado que los ratones timectomizados son incapaces de desarrollar una respuesta en contra del microorganismo y que la transferencia de células provenientes de animales inmunizados con la bacteria protege a los animales no sensibilizados^{35,36}. En humanos, la observación más clara de la participación de los linfocitos T en la respuesta inmune es el desarrollo de hipersensibilidad celular en la mayoría de los individuos que entran en contacto con el bacilo; ésto se ha demostrado por intradermoreacciones con el PPD y por estudios in vitro de linfocitos sensibilizados^{37,38}. Que la respuesta se asocia con protección lo sugiere el hecho de que individuos con respuesta de hipersensibilidad retardada disminuida o ausente presentan enfermedad progresiva, mientras que en los enfermos que presentan una respuesta enérgica, la

enfermedad tiende a la resolución³⁹. Además se ha observado, que los niños con inmunodeficiencias celulares, vacunados con el BCG desarrollan micobacteriosis sistémica⁴⁰. Actualmente la importancia de la respuesta T en la tuberculosis ha sido confirmada por el hecho de que la micobacteria es uno de los principales oportunistas en los individuos infectados por el VIH, en los cuales los linfocitos T cooperadores están seriamente afectados.

Las células T que participan en la inmunidad en contra de la micobacteria, se han identificado principalmente dentro de la población de linfocitos T pertenecientes al fenotipo CD4⁺/cooperador. Estas células reconocen a los antígenos presentados por macrófagos junto con moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (CPH)^{41,42,43}. Sin embargo, no parecen ser éstos los únicos tipos celulares involucrados en la respuesta; se ha observado que las células T con fenotipo CD8⁺/citólíticas restringidas por las moléculas del CPH clase I son también activadas en las infecciones micobacterianas y participan en la protección⁴⁴. Las células CD8⁺ de ratones sensibilizados con el M. tuberculosis, M. leprae y M. bovis BCG lisan a los macrófagos de médula ósea de animales sensibilizados con el antígeno autólogo⁴⁵. Además, se ha observado que algunas células T CD4⁺ restringidas por las moléculas clase II del CPH, poseen capacidad citolítica ya que son capaces de lisan a los macrófagos que portan antígenos micobacterianos⁴⁶. Estos resultados demuestran la enorme complejidad de la respuesta celular a la micobacteria en donde

la participación de diferentes poblaciones celulares antígeno-específicas parecen estar jugando un papel importante en la respuesta inmune a la infección. Cómo contribuye y en qué grado participa cada población celular en la inmunidad protectora y la relación de ésta con la hipersensibilidad retardada son temas aun no esclarecidos.

Un último aspecto concerniente a la respuesta celular al M. tuberculosis es el reciente hallazgo de que los antígenos micobacterianos son capaces de inducir la proliferación celular de los linfocitos T que portan el receptor $\gamma\delta$ ⁴⁷. Una diferencia importante entre las células T con receptor $\alpha\beta$ y las que tienen el receptor $\gamma\delta$ es que éstas últimas no expresan las moléculas de superficie CD4 y CD8 y su activación no está restringida por el CPH; esto indica que los linfocitos T $\gamma\delta$ reconocen los antígenos de una manera diferente y por lo tanto es posible que el papel que juegan en la respuesta inmune sea diferente⁴⁸. Entre los componentes micobacterianos capaces de inducir estas poblaciones celulares esta la proteína de choque térmico de 65 kDa (PCT 65); se ha encontrado que un alto porcentaje de los linfocitos estimulados por el PPD estan dirigidos contra este antígeno⁴⁹. El significado biológico de estos hallazgos es actualmente motivo de gran interés.

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

El significado de la respuesta inmune humoral en contra del bacilo de la tuberculosis no es claro. Hay observaciones

que indican que no participa en la inmunidad protectora pues se ha visto que la transferencia de suero no protege contra la infección experimental con el M. tuberculosis⁵⁰. Aun más, algunas observaciones sugieren que los anticuerpos pudieran tener un efecto negativo, ya que se ha observado que pacientes con enfermedad grave presentan títulos muy altos de anticuerpos y respuesta celular disminuida y por el contrario los individuos con enfermedad leve presentan títulos de anticuerpos bajos y respuesta celular elevada³⁹. Los mecanismos por los cuales los anticuerpos pudieran tener este efecto adverso no se conocen. En un estudio efectuado recientemente se ha propuesto que la capacidad protectora de los anticuerpos posiblemente se lleve a cabo durante las etapas tempranas de de la infección⁵¹.

AUTOINMUNIDAD

La presencia de autoinmunidad originada por infecciones micobacterianas se puede explicar principalmente por la similitud antigénica o "mimetismo molecular" entre los antígenos micobacterianos y los tejidos del huésped. De esta forma, es posible que la respuesta a un antígeno bacteriano pueda originar una respuesta a los componentes propios por reactividad cruzada⁵². Esta respuesta puede ser mediada tanto por anticuerpos como por células. Una de las observaciones que apoyan la participación de la respuesta humoral en la autoinmunidad es la diversidad de autoanticuerpos que se han detectado en el suero de los animales y humanos infectados con

micobacterias. Se han observado anticuerpos anti-nucleares, anti-eritrocitos, anti-espermatozoides, anti-tiroglobulina y factor reumatoide en el suero de los enfermos con tuberculosis pulmonar⁵³. Otra observación importante es que los anticuerpos monoclonales originados en contra del M. bovis reconocen autoantígenos como tiroglobulina, miosina, actina y colágena⁵⁴. Así mismo los anticuerpos monoclonales anti-DNA procedentes de animales y humanos con lupus eritematoso reaccionan con los glicolípidos de la pared celular que son comunes a todas las micobacterias. Por otra parte los anticuerpos monoclonales anti-micobacteria raccionan con DNA y se comportan como anticuerpos antinucleares⁵⁵. A nivel celular, la inducción de autoinmunidad por la similitud antigénica entre los componentes micobacterianos y los antígenos de los tejidos está apoyada por la asociación del M. tuberculosis con la artritis. Experimentalmente se puede inducir una enfermedad conocida como artritis por adyuvante por la inoculación a ratas Lewis del M. tuberculosis emulsificado en adyuvante completo de Freund⁵⁶. La enfermedad puede ser transferida a ratas normales por la inoculación de células linfoides provenientes de los animales enfermos⁵⁷. Estudios recientes han demostrado que la PCT 65 del M. tuberculosis juega un papel importante en la enfermedad. Esto se basa en la observación de que las clonas de células T provenientes de ratas que han desarrollado la artritis por adyuvante al igual que los linfocitos T de los enfermos con artritis reumatoide proliferan a una secuencia de nueve aminoácidos localizada en los residuos 180-188 de la PCT 65,

cuatro aminoácidos de esta secuencia se encuentran en la proteína que une los azúcares del cartílago humano^{58,59}. Las clonas de células T obtenidas de las ratas enfermas que proliferan al epítope de la PCT 65 son de dos tipos; la clona A2b que induce la artritis y la A2c que confiere resistencia a la enfermedad experimental. Es de notar que cuando se admistra la PCT 65 recombinante a los animales, no se produce artritis, induciéndose por el contrario resistencia a ella^{60,61}, aún no existe una explicación clara a estas observaciones. Otra observación que apoya la participación de las células T en autoinmunidad es que los hibridomas de células T provenientes de la fusión de células de nódulos linfáticos de ratones infectados con M. bovis BCG, con células linfoides tumorales, además de reaccionar con componentes micobacterianos muestran reactividad hacia componentes propios⁶².

IMNUNOSUPRESION

La inmunosupresión es uno de los fenómenos más complejos de la infección tuberculosa. Si bien la respuesta celular es la responsable de la eliminación del bacilo, su persistencia podría explicarse por fenómenos inmunosupresores. Se ha observado que en la tuberculosis humana no tratada, la hipersensibilidad a tuberculina puede perderse a medida que la infección progresa al grado de que el individuo llega a hacerse completamente anérgico⁶³. En la infección experimental, las células de bazo de animales anérgicos, no responden a

fitohemaglutinina. Esta inmunosupresión termina cuando se eliminan las células linfocíticas Lyt 2⁺, lo cual sugiere que son las responsables de la supresión⁶⁴. También se ha observado que los pacientes con tuberculosis meningea son incapaces de producir una linfocina después de ser activados con fitohemaglutinina; este efecto se anula eliminando la población de linfocitos gamma radiosensibles⁶⁵.

Otras células involucradas en los fenómenos de inmunosupresión son las células adherentes mononucleares; se ha observado que esta población celular suprime la respuesta de los linfocitos T inducida por el PPD⁶⁶. Algunos trabajos sugieren que los monocitos inhiben indirectamente la blastogénesis de los linfocitos a través de la producción de un factor supresor^{67,68}.

Para profundizar en el conocimiento de los fenómenos anteriores es necesario la identificación de los componentes bacterianos que pudieran estar involucrados. Algunos estudios demuestran que la lipoarabinomanana del M. leprae y del M. tuberculosis inhibe la respuesta de linfocitos humanos de sangre periférica a antígenos micobacterianos⁶⁹. Recientemente se encontró que estas mismas moléculas inhiben la activación de macrófagos mediada por interferon gamma⁷⁰.

4. LA ESTRUCTURA MOLECULAR DEL Mycobacterium tuberculosis

En la última década ha habido grandes avances en el conocimiento de la estructura antigénica del agente de la tu-

berculosis. Se han purificado en su forma nativa con anticuerpos monoclonales y por métodos físicoquímicos, antígenos protéicos de 70, 65, 38, 35 y 32 kDa^{71,72,73,74,75,76}. Algunos de estos antígenos se han obtenido como proteínas recombinantes^{77,78,79,80,81,82,83,84}. Comparando la secuencia de aminoácidos de las proteínas recombinantes y las almacenadas en bancos de datos se ha logrado la identificación de proteínas biológicamente relevantes. Es así como se han podido definir a las proteínas de 70 y 65 kilodaltones como pertenecientes a la familia de proteínas altamente conservadas denominadas de estrés o de choque térmico^{85,86}. La PCT 70 del M. tuberculosis tiene más de 50% de homología con la proteína dnaK de la E. coli y la PCT 70 humana⁷⁷. La PCT 65 pertenece a una familia de proteínas de estrés representadas por el producto del gen GroEL de la E. coli⁸⁵. Estas moléculas participan en el doblaje y translocación de otras proteínas⁸⁷. Así mismo se ha clonado el gen aroA del M. tuberculosis por complementación de una mutante aroA de la E. coli; este gen codifica para la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa que participa en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos⁷⁹. La proteína de 38 kDa, (Gp 38) tiene 30% de homología con la proteína Pho S de la E. coli que une fosfatos⁸⁰. Una proteína de 28 kDa del M. leprae presenta homología con la enzima superóxido dismutasa de la E. coli y de la mitocondria humana, en el M. tuberculosis se ha identificado una proteína equivalente con los anticuerpos monoclonales originados en contra de la proteína del M. Leprae⁸². Estos hallazgos son

importantes porque además de su contribución a la caracterización funcional de las proteínas, permiten establecer relaciones entre las diferentes micobacterias y de éstas con otras bacterias.

Con base a sus propiedades bioquímicas se han caracterizado las proteínas de 58-60 y 30-31 kDa como antígenos con afinidad por fibrionectina (Fn 58-60, Fn 30-31)⁸⁸. La capacidad de unir fibronectina puede ser biológicamente relevante. En nuestro laboratorio hemos identificado por primera vez proteínas de M. tuberculosis con residuos de carbohidratos. Por su capacidad de unirse a Concanavalina A se han definido a las proteínas de 50-55 y 38 kDa como glicoproteínas (Gp 50-55, Gp 38)⁷⁴. Estos hallazgos son relevantes pues estas moléculas son muy antigénicas y podrían además, como lo hacen otras glicoproteínas, participar en otras facetas de la infección.

La disponibilidad de proteínas puras obtenidas por métodos de purificación físico-químicos y sobre todo por la utilización de anticuerpos monoclonales y de técnicas de biología molecular han permitido el estudio de algunas proteínas desde el punto de vista de su antigenicidad. La respuesta celular a los antígenos individuales se ha estudiado midiendo la capacidad de éstos de estimular la proliferación celular. Esto se ha hecho in vitro, midiendo la proliferación de linfocitos T de sangre periférica de enfermos con tuberculosis y animales sensibilizados al M. tuberculosis e in vivo midiendo la respuesta de hipersensibilidad retardada a los diferentes antígenos. Se ha obtenido una respuesta celular proliferativa a antígenos de 70, 65, 38, 35,

32, y 14 kDa^{71,72,73,84,89,90}. Los estudios in vivo han sido realizados principalmente en animales de laboratorio, únicamente los antígenos de 70 y 35 kDa se han utilizado para medir hipersensibilidad retardada en seres humanos^{71,91}. Aunque los resultados de estos estudios demuestran la capacidad de los diferentes antígenos de inducir proliferación celular no es posible con base en estos resultados establecer comparaciones entre los antígenos en cuanto a la potencia relativa de cada uno de ellos como inductor de respuesta celular; ésto se debe principalmente al hecho de que cada proteína se ha estudiado individualmente bajo condiciones experimentales diferentes.

Otra metodología empleada más recientemente para estudiar la respuesta celular ha sido la utilización de líneas celulares y clonas de linfocitos T antígeno específicas, ésto ha permitido caracterizar a las células involucradas en la respuesta a cada antígeno y definir con la ayuda de péptidos sintéticos (que portan secuencias de las proteínas estudiadas) epítopes T específicos. Actualmente se han obtenido clonas de células T humanas y de ratón a los antígenos de 65, 19 y 14 kDa^{92,93,94}. Mediante la utilización de péptidos sintéticos se ha identificado un epítope especie-específico en la PCT 65 de M. tuberculosis, las clonas de células T humanas reactivas a este epítope fueron identificadas como pertenecientes al fenotipo cooperador/inductor⁹⁴. Igualmente se encontró que las clonas de células T murinas dirigidas en contra los antígenos de 19 y 65 kDa portaban el fenotipo cooperador⁹³. En este contexto uno de

los antígenos más estudiados ha sido la PCT 65, se ha centrado el interés en este antígeno por su aparente inmunodominancia, se encontró que el 20% de la respuesta celular T al M. tuberculosis en ratones estaba dirigida contra esta proteína⁹⁵. El significado funcional de este hallazgo aún no se conoce.

Los antígenos puros también se han utilizado para estudiar la respuesta de anticuerpos inducida por ellos durante la infección tuberculosa, los estudios se han centrado principalmente en la cuantificación de los títulos de anticuerpos con fines inmunodiagnósticos. Se ha evaluado la respuesta de anticuerpos a los antígenos de 65, 38, 35, 32, 19 y 14^{19,20,21,22}, en el suero de enfermos con tuberculosis e individuos sanos. La metodología más comúnmente empleada ha sido el inmuno ensayo enzimático (ELISA) debido a su alta sensibilidad y rapidez. Los mejores resultados se han obtenido con la proteína de 38 kDa con la cual se han desarrollado ensayos de muy alta especificidad pero no de suficiente sensibilidad^{20,21}. Al igual que con la respuesta celular el desarrollo de las nuevas tecnologías ha permitido identificar con anticuerpos monoclonales epítopes B-específicos en los antígenos de 65, 38 y 19 kDa^{80,83,96}.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente tesis fué el de ampliar y ahondar nuestro conocimiento sobre la composición molecular del bacilo de la tuberculosis con énfasis especial en las moléculas que actúan como antígenos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar antígenos del Mycobacterium tuberculosis potencialmente relevantes para ser estudiados.
- Purificar y caracterizar los antígenos seleccionados.
- Desarrollar metodología apropiada para la purificación de los antígenos seleccionados.
- Analizar comparativamente la respuesta de hipersensibilidad retardada a los antígenos individuales en ratones singénicos a fin de identificar antígenos con potencial para inducir inmunidad protectora.
- Analizar comparativamente la respuesta inmune humoral a los antígenos purificados en enfermos con tuberculosis pulmonar a fin de identificar reactivos útiles para el serodiagnóstico.

III. MATERIALES Y METODOS

1. BACTERIAS Y ANTIGENOS

La cepa H37/Rv de M. tuberculosis se obtuvo de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. El bacilo se cultivó en el medio sintético de Proskauer y Beck modificado por Youmans⁹⁷. Después de 6 semanas de cultivo los antígenos se obtuvieron por filtración del medio, primero a través de un filtro Whatman N° 3 y después a través de filtros de 1.2, 0.45 y 0.22 μ (Millipore Corp., Bedford, Mass) consecutivamente. Otra fuente de antígenos se obtuvo por sonicación de la masa bacteriana obtenida del procedimiento anterior. Las bacterias se lavaron con PBS que contenía fenilmetil-sulfonil fluoruro al 0.006%, P-hidróxido mercurio benzoato al 0.04% y EDTA 2.5 mM como inhibidores enzimáticos. La masa bacteriana se sonicó a 60 ciclos por segundo por seis periodos de 5 min en hielo. Este material se centrifugó a 20,000 rpm y el sobrenadante se pasó a través de un filtro de 0.22 μ . Las proteínas del filtrado y del sonicado se precipitaron con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 g/ml) a 4° C y se centrifugaron a 10,000 rpm por 30 min para obtener el extracto total del filtrado (ETF) y el extracto total del sonicado (ETS).

2. CARACTERIZACION DEL PERFIL PROTEICO DEL M. tuberculosis POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL

SULFATO DE SODIO.

Los antígenos obtenidos tanto del filtrado como del sonificado fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (EGPA-DSS), bajo condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol siguiendo el método descrito por Laemmli⁹⁸. La separación electroforética se llevó a cabo en geles de acrilamida al 10%, 375 mM de Tris-HCl pH 8.8 y DSS 0.1% para el gel separador y 3% de acrilamida, 125 mM de Tris-HCl pH 6.8 y 0.1% de DSS para el gel concentrador con 0.05% (V/V) de TEMED y 0.05% (W/V) de persulfato de amonio como polimerizadores. A las muestras se les adicionó coctel de electroforesis (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, DSS 0.1% y glicerol 0.1%) y se hirvieron durante 5 min en baño maría. El amortiguador de corrida contenía glicina 50 mM pH 8.3 y 0.1% de DSS. La electroforesis se corrió a 20-40 mA durante 3-4 h. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Algunos de ellos fueron sujetos a análisis densitométrico.

3. FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS ANTIGENICOS TOTALES POR EL METODO DE SEIBERT.

Florence Seibert introdujo en 1946 el fraccionamiento ácido alcohólico en la purificación de las proteínas de filtrado del medio de cultivo del M. tuberculosis. Ella obtuvo 5 fracciones, tres de las cuales se denominaron proteínas A, B y C y las dos

restantes polisacáridos I y II⁹⁹. La metodología empleada consiste en una precipitación inicial del ETF ajustando el pH a 4. El precipitado obtenido lo denominamos Fracción I. Al sobrenadante de esta precipitación se le ajustó el pH a 7 y se le agregó etanol hasta obtener una concentración al 30%. Al precipitado obtenido se le denominó Fracción II. Al sobrenadante de esta precipitación se le ajustó el pH a 4, obteniéndose un precipitado al que denominamos Fracción III. Al sobrenadante de ésta precipitación se le añadió etanol hasta alcanzar una concentración del 70%. (Fracción IV). El sobrenadante resultante de esta última precipitación lo denominamos Fracción V. Las muestras obtenidas se dializaron contra PBS, se concentraron en Amicon y se les determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry¹⁰⁰ y el de carbohidratos por el método de Doubois¹⁰¹.

4. INMUNOBLOT CON EXTRACTOS ANTIGENICOS TOTALES PARA IDENTIFICAR BANDAS INMUNODOMINANTES.

Para los estudios de inmunoblot los geles fueron montados en una cámara de electrotransferencia (Idea Scientific, Corvallis, PA, USA) y transferidos a nitrocelulosa (Bio-Rad, Laboratories Richmond, CA) siguiendo el método descrito por Towbin y col¹⁰². La eficiencia de la transferencia de las bandas de proteínas fué comprobada por tinción de una tira con amido negro. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron durante toda la noche a

4° C con albumina sérica bovina (ASB) al 3% en PBS-Tween 20 al 0.3 %. Después de varios lavados con PBS-Tween 20 las tiras se incubaron con sueros humanos de enfermos con tuberculosis pulmonar y controles sanos diluidos 1/10. La incubación fué llevada a cabo a temperatura ambiente por 3 h y después de 5 lavados con PBS-Tween los anticuerpos adsorbidos se revelaron por incubación con proteína A marcada con peroxidasa diluida 1/1000 por 90 min (Sigma Chemical Co., St Louis Mo). Después de lavar, la peroxidasa se reveló con H₂O₂ y 4-cloro 1 naftol por 5 min. Finalmente las tiras fueron lavadas con agua de la llave, secadas y fotografiadas. Los inmunoblots fueron analizados por un procedimiento gráfico que simplifica la identificación de bandas reactivas¹⁰³. Para ésto se construyó un patrón que incluía todas las bandas reconocidas por lo menos una vez por todos los sueros, ordenadas por peso molecular. Con este patrón de bandas reconocidas por la población total de sueros en estudio, se revisó cada tira (cada una de ellas representa un suero) y se registraron las bandas reconocidas. Enseguida se hizo una gráfica anotándose la frecuencia con la cual una banda determinada era reconocida por la población total de sueros tuberculosos y de sueros testigos.

5. BUSQUEDA DE GLICOPROTEINAS EN LOS EXTRACTOS DEL M. tuberculosis

La presencia de glicoproteínas en el ETF y las fracciones de

Seibert se determinó por incubación de las muestras electrotransferidas con Concanavalina A-peroxidasa (Sigma) y tinción de Schiff¹⁰⁴. Las muestras se sometieron a EGPA-DSS y se electrotransferieron a papel de nitrocelulosa. El marcaje con Con A-peroxidasa de las proteínas electrotransferidas fué realizado como se describió anteriormente¹⁰⁵. En resumen, las membranas de nitrocelulosa con las muestras transferidas se incubaron en una solución de ASB al 3% tratada con metaperiodato de sodio 10 mM para reducir la contaminación por posibles residuos de carbohidratos durante 1 h a 40⁰ C. Después de varios lavados con PBS Tween-20 al 0.3%, la membrana de nitrocelulosa se incubó con Con A marcada con peroxidasa que contenía 5 mg/ml de Con A, 1 mM de CaCl₂, y 1mM de MgCl₂. La peroxidasa se reveló con 4-cloro 1 naftol y H₂O₂. Las tiras control fueron incubadas con la misma solución en presencia de 0.2 M de α-metil-D manósido.

6. METODOLOGIAS EMPLEADAS PARA LA PURIFICACION DE LOS ANTIGENOS

Un primer paso para la purificación de los antígenos fué la utilización del método de fraccionamiento ácido-alcohólico del ETF descrito anteriormente. Esto permitió obtener fracciones enriquecidas en los diferentes antígenos. Otro método de fraccionamiento inicial del filtrado del medio de cultivo, fué mediante la adición de (NH₄)₂SO₄ al 45%, las proteínas

precipitadas se obtuvieron por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 min a 4° C y al sobrenadante de esta precipitación se le adicionó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta obtener 90% de concentración. Cada una de éstas fracciones fué entonces sometida al fraccionamiento ácido-alcohólico.

A. ELUCION DE PROTEINAS ELECTROTRANSFERIDAS CON ACETONITRILLO

La técnica utilizada fué la descrita por Parekh y col.¹⁰⁶. Una vez que las proteínas se electrotransfirieron las bandas se identificaron tiñiendo las tiras de los extremos y centro de la hoja nitrocelulosa con amido negro, la banda de interés se cortó y la proteína se eluyó de la nitrocelulosa incubándola a 37° C durante 3 h en un amortiguador de acetato de amonio 0.1 M pH 8.9 y acetonitrilo al 40%. Terminada la incubación, la nitrocelulosa se eliminó por filtración en filtro Whatman N° 3. El filtrado se dializó contra agua destilada, se concentró en Amicon y se determinó el contenido de proteína por el método de Lowry¹⁰⁰.

B. ELECTROELUCION

La técnica de electroelución empleada en este trabajo fué la descrita por Mendel-Hartvig¹⁰⁷. Las proteínas se sometieron a EGP-DSS en geles preparativos al 10%. Para localizar las bandas, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (1% en agua)

durante 10-30 min a temperatura ambiente y se destiñeron con varios cambios de agua destilada, la banda de interés se cortó y se incubó durante unos minutos con azul de bromofenol al 0.5%. La tira de acrilamida se montó en la cámara de electroforésis sobre un gel soporte, se fijó con agarosa y se cubrió con un gel concentrador al 3% la corriente se invirtió y la proteína corrió a través del gel concentrador hasta alcanzar la superficie donde se recolectó en glicerol al 30%, Tris-HCl 125 mM, pH 6.8 y 0.1% de SDS. La proteína se dializó contra agua destilada y se concentró en Amicon.

C. ELUCION DE LAS PROTEINAS DE GELES DE ACRILAMIDA CON UREA 6M

Una de las dificultades para la obtención de antígenos puros de las micobacterias es el hecho de que son muy difíciles de mantener en solución, excepto en DSS o urea. Después de eluirlos con urea, es posible mantenerlos solubles en solución salina o en agua. En este trabajo y como un paso final de purificación para todas las proteínas se utilizó con algunas modificaciones la técnica descrita para la obtención de la proteína recombinante de 65 kDa de M. leprae¹⁰⁸. Cada una de las fracciones enriquecidas en el antígeno seleccionado se corrió en geles preparativos de acrilamida (3% gel concentrador y 10% gel separador) durante 4 h a 40 mA siguiendo el método de Laemmli⁹⁸. Una vez concluida la electroforésis y con el fin de identificar las bandas, los geles se tiñeron con

acetato de sodio 4 M a temperatura ambiente durante 20 min¹⁰⁹. Los criterios de identificación fueron el peso molecular y la intensidad de la banda. Después de cortar la banda seleccionada se homogenizó la acrilamida pasandola a través de una jeringa. Las bandas se incubaron durante toda la noche a 37° C en una solución de urea 6 M, EDTA 20 mM, y K₂HPO₄ 50 mM a pH 7. Posteriormente se filtró a través de un filtro Whatman N° 4 bajo presión negativa, se dializó contra agua desionizada y se concentró por ultrafiltración. La concentración de proteínas se determinó por el método de lowry¹⁰⁰. La pureza de los antígenos fue comprobada en geles de acrilamida y su reactividad inmunológica se verificó incubando los antígenos inmunoelctrotransferidos con un suero hiperinmune de conejo anti-H37/Rv.

D. OBTENCION DE LA PROTEINA DE ESTRES O CHOQUE TERMICO DE 65
KILODALTONES DEL Mycobacterium leprae

Esta proteína fué donada a nuestro laboratorio por el Dr Alberto Palacios Boix del Instituto Nacional de Enfermedades de la Nutrición. Fué obtenida por Lamb y col. mediante subclonación del fago λ gt11, que contenía la totalidad del gene que codifica para la proteína en el plásmido pUC8. Las cepas de E. coli recombinantes producen grandes cantidades de antígeno, el cual fué purificado a partir de geles de acrilamida con urea¹⁰⁸.

7. PRODUCCION DE ANTICUERPOS EN CONTRA DE LAS PROTEINAS DEL
EXTRACTO TOTAL DEL FILTRADO DEL Mycobacterium tuberculosis

Se inyectaron tres conejos blancos de Nueva Zelanda de dos meses de edad con 6.5 mg de bacilos H37/Rv (peso húmedo) muertos por calor y 3 mg de proteínas del filtrado del medio de cultivo resuspendidas en 1 ml de $Al(OH)_3$. Se aplicaron dos inyecciones subcutaneas en varios sitios de la nuca y de la espalda con intervalo de una semana. Posteriormente, los animales recibieron una inyección intramuscular cada quince días por tres veces de bacilos y proteínas en PBS. Cuando se observó un máximo de reactividad de los sueros con las proteínas del ETF transferidas a papel de nitrocelulosa, los conejos se sangraron y el suero se almacenó a $-70^{\circ}C$ hasta su uso.

8. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A
PROTEINAS PURIFICADAS EN RATONES

Se sensibilizaron 7 grupos de 10 ratones BALB/c machos de 6 semanas de edad con 50 μg de ETF emulsificado en 50 μl de adyuvante completo de Freund por via subcutánea en la región inguinal. Diez días después, se aplicó a cada grupo de ratones una inyección intradérmica en el cojinete plantar derecho con 5 μg de cada uno de los antígenos. En el cojinete izquierdo se inoculó PBS intradermicamente como control. El incremento en el tamaño del cojinete se midió con un micrómetro 24, 48 y 72

horas después del reto.

9. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL A ANTIGENOS PROTEICOS PUROS POR INMUNOENSAYO ENZIMATICO (ELISA) EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR

Se analizaron 77 sueros de enfermos con tuberculosis pulmonar, 27 se obtuvieron del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, D.F. y 50 del Hospital Carrasco de Rosario, Argentina. Cuarenta y dos pacientes habían recibido tratamiento antituberculoso durante por lo menos 6 meses. El diagnóstico de tuberculosis pulmonar se hizo por baciloscopia y se confirmó por cultivo. Como testigos se utilizaron 92 sueros de individuos sanos, 30 provenientes de trabajadores del Instituto Mexicano del Seguro Social, 45 del personal de trabajadores y estudiantes del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y 17 fueron obtenidos de un banco de sangre. Los sueros se procesaron en una sola sesión por duplicado. Se utilizaron placas de 96 pozos Immulon II, (Dynatech Industries, Inc., Mclean, VA). Los pozos se sensibilizaron con 0.5 µg de cada antígeno disuelto en 100 µl de amortiguador de carbonatos pH 9.6 a 37° C por 3 h. Posteriormente, las placas se bloquearon con ASB al 1% en PBS durante 1 h a 37° C; previo lavado con PBS Tween-ASB, se aplicaron los sueros diluidos 1/500 en PBS-Tween ABS por 1 h a 37° C. Después de lavarlas, las placas se incubaron con una dilución 1/1000 de

Proteína A marcada con peroxidasa durante 1 h a 37° C. La peroxidasa se reveló con 1 mg/ml de ortofenilendiamina en amortiguador de citratos pH 5 la DO_{490} se leyó en un lector de ELISA.

Análisis estadístico: La línea de corte para establecer la positividad o negatividad de un suero se estableció tomando el promedio de DO del grupo testigo más dos desviaciones estandar. La distribución de los títulos de anticuerpos entre dos grupos se comparó con la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon y la correlación entre la respuesta a cada par de antígenos fué analizada con el coeficiente de correlación de Spearman mediante la utilización del programa estadístico Statgraph (Statgraphics V 1.1, Statistical Graphics Co).

IV. RESULTADOS

1. PERFIL PROTEICO DE LOS FILTRADOS DEL MEDIO DE CULTIVO Y DE LOS SONICADOS DEL Mycobacterium tuberculosis

Los filtrados del medio de cultivo y los sonicados se analizaron comparativamente por EGPA-DDS al 10%. En los geles teñidos con azul de Coomassie (Fig. 1) se observó que ambas preparaciones compartían la mayoría de las bandas de proteína; sin embargo, en los filtrados había algunas bandas que eran más abundantes que en los sonicados y viceversa. El análisis densitométrico de los geles ayudó a establecer mejor estas diferencias cuantitativas. El Fn 30-31 fué más abundante en los filtrados (13.7%) (Fig. 1B, asteriscos) que en los sonicados (4.15%), la proteína de 26 kDa fué más abundante en los sonicados (5.32%) (Fig. 1A, doble flecha), que en filtrados (0.5), pero la diferencia más sobresaliente se observó en una banda de 16 kDa la cual representó el 20% del área del densitograma del sonicado (Fig. 1A, flecha) y únicamente el 1% de los filtrados.

En vista de la similitud antigénica entre las dos preparaciones y sobre todo por la dificultad que ofrecía sonicar las bacterias vivas decidimos trabajar exclusivamente con las proteínas de los filtrados del medio de cultivo. Sin embargo, es importante tener en mente las diferencias señaladas cuando se considere la purificación de un antígeno determinado.

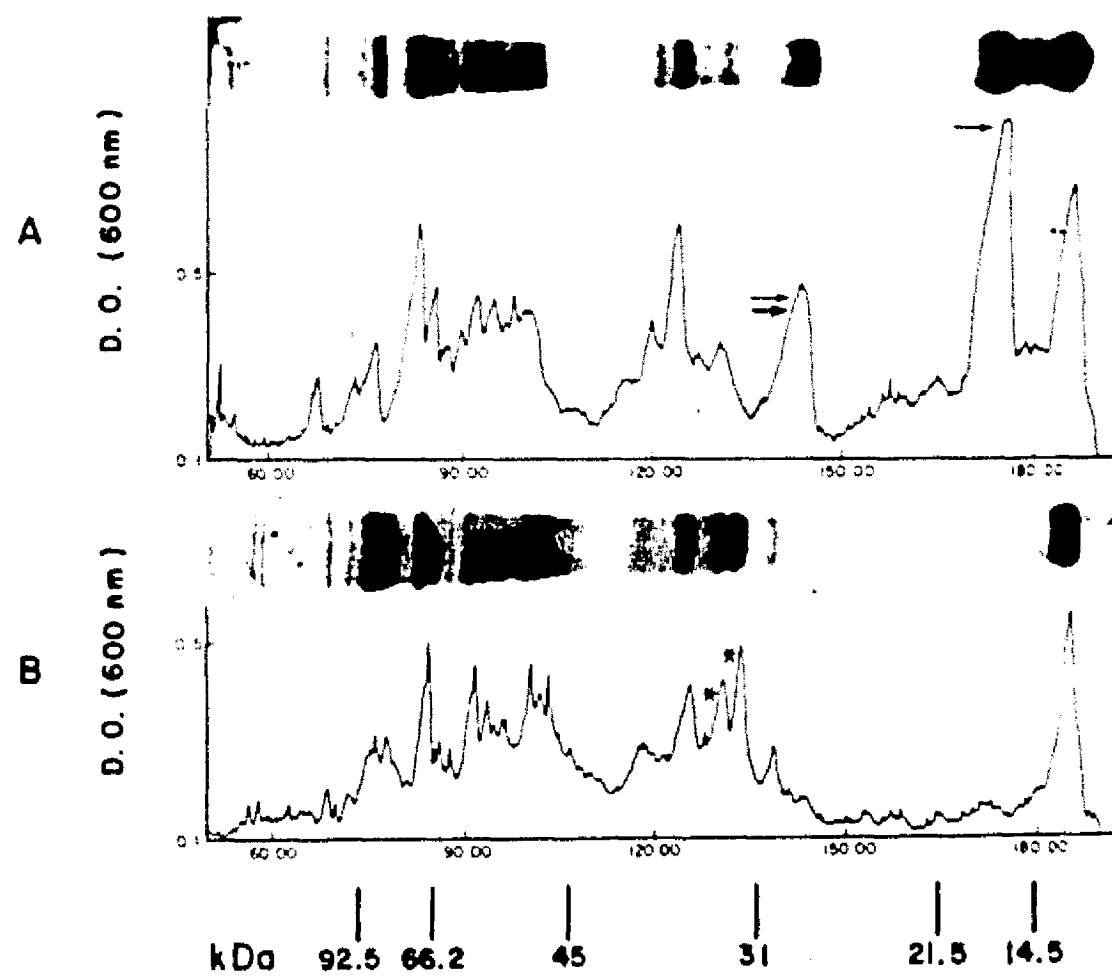


Figura 1.

EGPA-DDS y densitogramas correspondientes para comparar los perfiles de proteínas del extracto total del sonicado (A) y del extracto total del filtrado (B). Las flechas y asteriscos indican las principales diferencias entre cada preparación.

2. IDENTIFICACION DE ANTIGENOS INMUNODOMINANTES POR INMUNOBLOT E INMUNOLOT

Se examinó la respuesta de anticuerpos a los antígenos micobacterianos del ETF con 62 sueros de enfermos con tuberculosis pulmonar y con 48 sueros de individuos sanos (Fig. 2). Solamente 4 de los 62 sueros de enfermos dieron resultados totalmente negativos; los restantes 58 sueros reaccionaron con un total de 23 bandas. Se detectaron reacciones positivas en 21 de los 48 sueros testigos examinados, los cuales reaccionaron con un total de 12 bandas; estas reacciones fueron de mucho menor intensidad que las observadas con los sueros tuberculosos. El uso de un procedimiento gráfico para analizar los inmunoblots desarrollado por Larralde y col.¹⁰³, denominado "inmunoplot" permitió asignar un significado a las bandas reactivas de acuerdo a su posición en la gráfica (Fig. 3). Cuatro bandas se localizaron más o menos equidistantes a los dos ejes representando antígenos que reaccionan similarmente con los sueros testigos y los sueros de los enfermos. De estos, se encontró que un doblete de 30-31 kDa reaccionaba con el 74% de los sueros de tuberculosos y con 47.8% de los sueros normales. Otro antígeno con reactividad similar fue una proteína de 58-60 kDa la cual fue reconocida por 37.5% de los sueros de los tuberculosos y por 51.4% de los sueros normales. En estudios realizados simultáneamente se demostró que los dobletes de 30-31 y 58-60 kDa tienen afinidad por

fibronectina. Las bandas que reaccionaron preferencialmente con los sueros de los enfermos se localizaron cerca al eje de los sueros tuberculosos muchas de estas fueron bandas de baja frecuencia; sin embargo, se observaron dos bandas de alta frecuencia con pesos de 29 y 38 kDa. La banda de 38 kDa reaccionó con 53% de los sueros y con ninguno de los sueros control, siendo la única banda con este comportamiento. En estudios simultáneos se encontró que esta banda corresponde a una de las glicoproteínas identificadas por marcaje con Concanavalina A (Fig. 4, carril F).

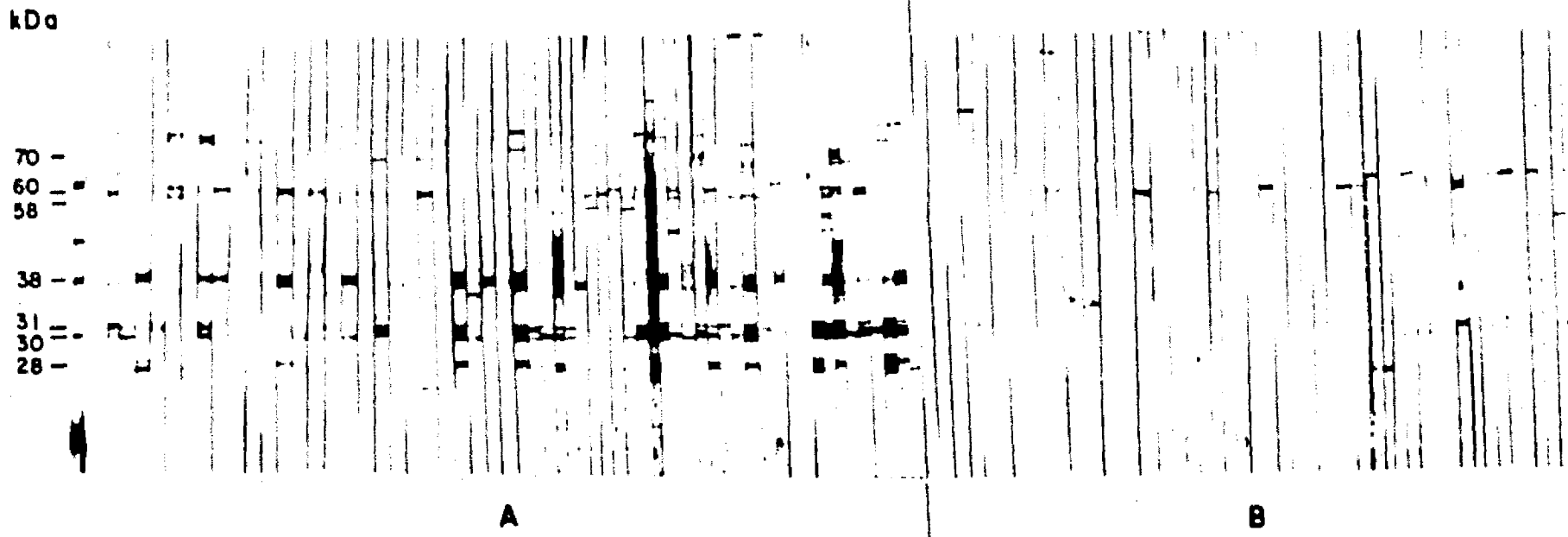


Figura 2.

Análisis por inmunoblot de la respuesta de anticuerpos a antígenos micobacterianos del ETF con 62 sueros de enfermos con tuberculosis pulmonar (A) y 48 sueros de controles sanos (B) diluidos 1/10. A la izquierda se indican los pesos moleculares de las bandas más frecuentemente reconocidas (kDa).

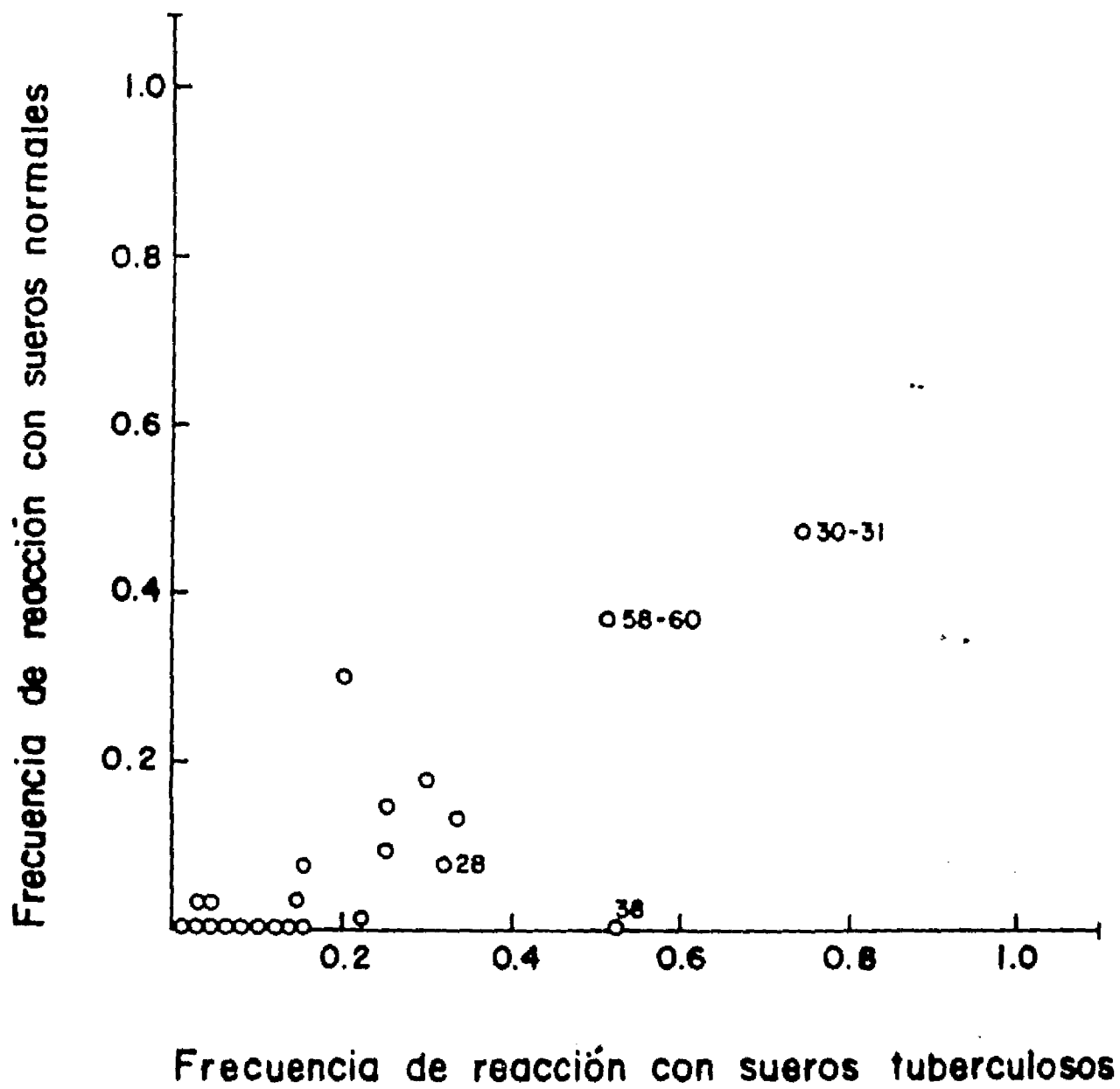


Figura 3.

Análisis gráfico del inmunoblot mostrado en la figura 2. La frecuencia de reacción de los sueros de los enfermos con tuberculosis con un antígeno dado fué graficado contra la frecuencia de los sueros testigo. Se indican en kDa los pesos moleculares de los antígenos más frecuentemente reconocidos.

3. FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS ANTIGENICOS TOTALES POR EL METODO DE SEIBERT

En el trabajo original de Seibert⁹⁹, el tratamiento con ácido y alcohol del filtrado del medio de cultivo del M. tuberculosis produjo 5 fracciones que en aquella época se consideraron moléculas bien definidas. En la presente tesis hemos obtenido datos que indican que dichas fracciones son mezclas complejas de proteínas y polisacáridos. En la Figura 4, (Carril A) se muestra el perfil electroforético del ETF en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie. A partir de este extracto se inició el fraccionamiento de Seibert. En él se observaron cerca de 45 bandas con pesos moleculares entre 110 a 14 kDa. En el Carril B, se muestra el precipitado del ETF a pH 4; en esta Fracción se observaron en su gran mayoría, bandas presentes en el ETF, sin embargo, algunas proteínas se hicieron menos evidentes, como las bandas de 30-31 kDa. En la Fracción II obtenida por precipitación a pH 7 y a una concentración de alcohol al 30% (Carril C) el número de bandas disminuyó notablemente, observándose unas pocas bandas con pesos moleculares de 70, 28, 20 y 15 kDa. La Fracción III obtenida por precipitación a pH 4 y alcohol al 30% (Carril D), estaba notablemente enriquecida en una proteína de 70 kDa, acompañada de otras bandas menores. En la Fracción IV (Carril E), que se obtuvo por precipitación a pH 4 y una concentración de alcohol al 70% se observaron bandas de 50-55,

30-31 y 28 kDa. En la Fracción V (Carril F), que es el sobrenadante de la precipitación anterior se encontró una proteína de 38 kDa muy abundantemente representada y acompañada de algunas bandas muy débiles de menor peso molecular.

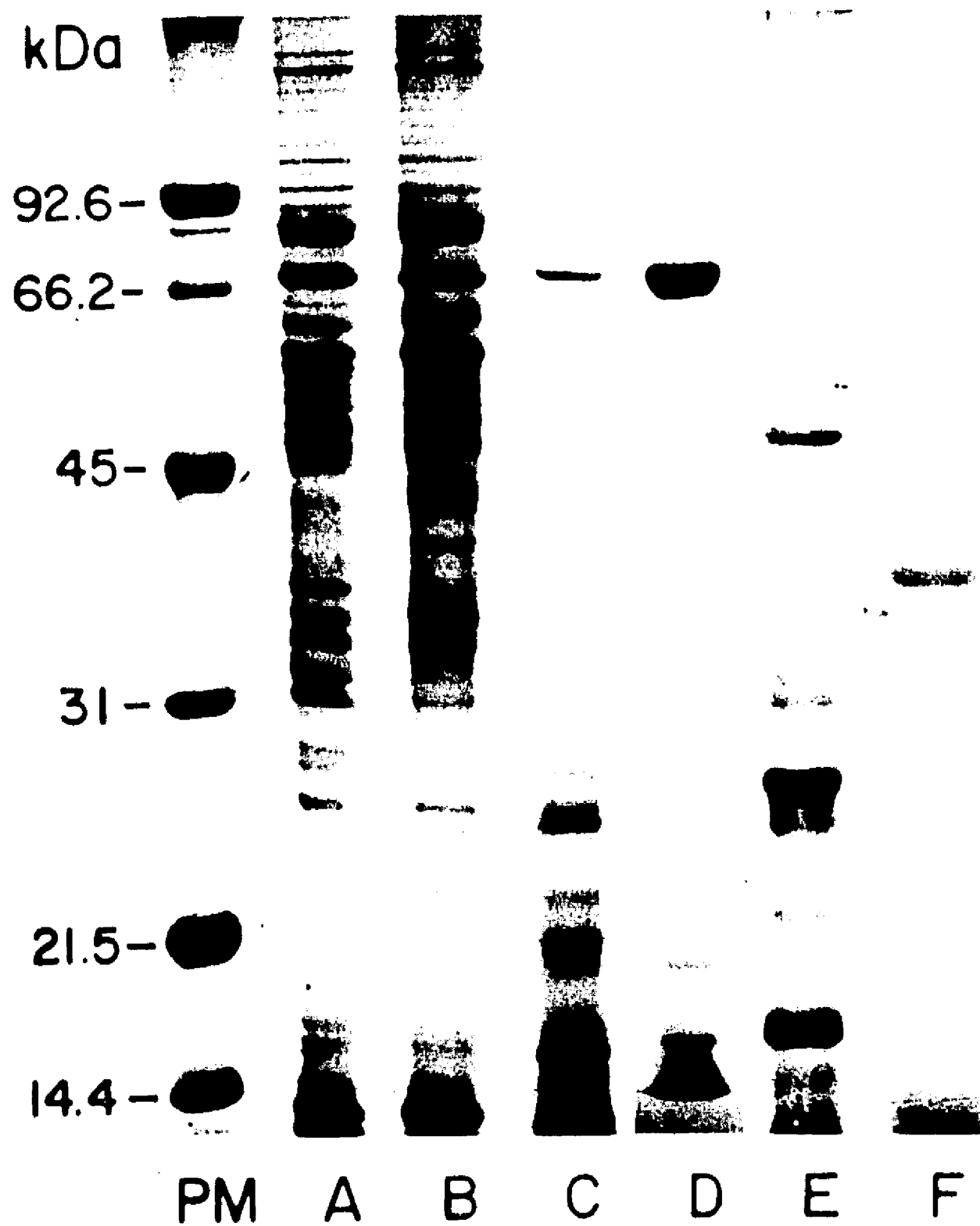


Figura 4

Análisis del fraccionamiento ácido alcohólico del ETF en geles de acrilamida en DSS al 10%, teñidos con azul de Coomassie. Carril A, ETF. Carril B, precipitado a pH 4. Carril C, precipitado a pH 7 y 30% de alcohol. Carril D, precipitado a pH 4 y 30% de alcohol. Carril E, precipitado a pH 4 y 70% de alcohol. Carril F, sobrenadante de la precipitación anterior.

4. IDENTIFICACION DE ANTIGENOS PROTEICOS CON RESIDUOS DE CARBOHIDRATOS

Para este fin se utilizó la concanavalina A la cual reconoce residuos de manosa y de glucosa¹¹⁰. Con este propósito se incubaron el ETF y las fracciones obtenidas con el método de Seibert con Concanavalina A marcada con peroxidasa después de ser transferidas a nitrocelulosa. Se observó que todas las fracciones poseen en mayor o menor grado carbohidratos detectables con ésta lectina (Fig. 5). La reactividad se concentró en una zona amplia entre 60 y 40 kDa. Esta zona difusa desaparece en las Fracciones IV y V (Carriles E y F), en las cuales la reactividad se limitó a 2 bandas de peso molecular de 50 y 55 kDa (Carril E) y a una banda de 38 kDa (Carril F). La tinción de Schiff del ETF y de las Fracciones IV y V verificaron esta observación. Nuevamente en el ETF se reveló una zona difusa entre 40 y 60 kDa (Carril, G) y en las Fracciones IV y V la reactividad se circunscribió a bandas de 50-55 y 38 kDa (Carril H e I). Las reactividades descritas se inhibieron añadiendo α -metil D-manósido a la solución de incubación; lo cual indica que la reactividad con Con A depende de la presencia de residuos de manosa. En estudios paralelos se demostró que las bandas de 50-55 y de 38 kDa reactivas con Con A eran bandas de proteína ya que se teñían con azul de Coomassie en geles realizados en forma paralela y eran eliminadas por incubación con proteasas.

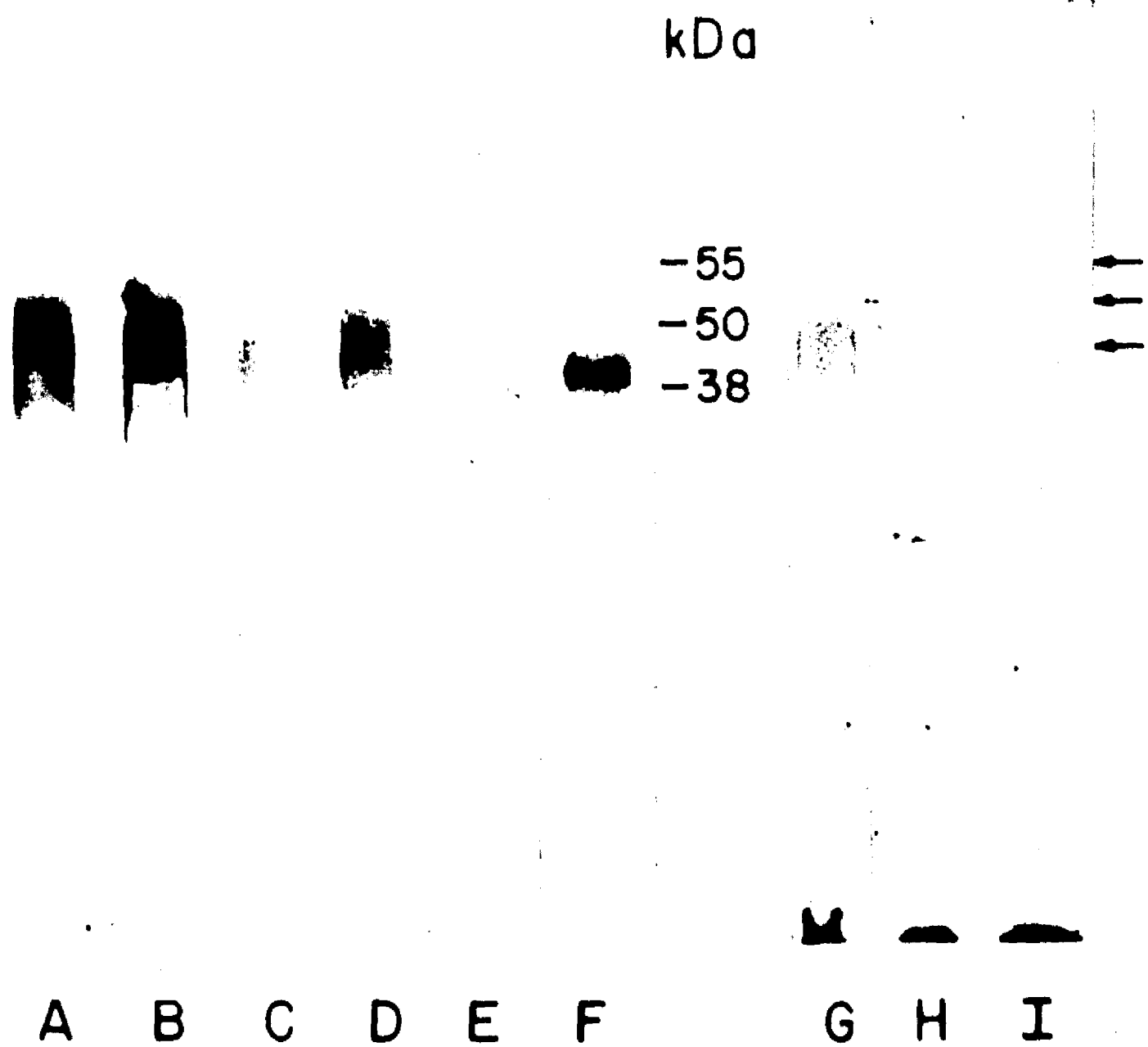


Figura 5.

Identificación en inmunoblot de las glicoproteínas del ETF y de las fracciones de Seibert. Carriles A-F (marcaje con Con A-peroxidasa), Carriles G-I (Tinción de Schiff) Carriles A-F corresponden a las fracciones descritas en la Fig. 5. Carril G, ETF. Carril H, Fracción IV, precipitado a pH 4 y 70% de alcohol. Carril F, Fracción V, sobrenadante de la precipitación anterior.

5. PURIFICACION DE ANTIGENOS

A. PURIFICACION DE LA GLICOPROTEINA DE 50-55 KILODALTONES

En la purificación de esta proteína se siguió la siguiente estrategia. Primero se precipitó el filtrado del medio de cultivo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45%. El perfil electroforético de este precipitado se muestra en la Fig. 6, Carril A, en la cual se observan cerca de 18 bandas de pesos moleculares entre 100 y 20 kDa. La incubación con Con A-peroxidasa de esta fracción transferida a papel de nitrocelulosa demostró la presencia de la proteína de 50-55 kDa (Carril B). Este material se precipitó bajando el pH a 5 con una solución de acetatos. En el sobrenadante obtenido se observó la presencia aumentada de Gp 50-55 (Carril C). Esta fracción enriquecida se aplicó a una columna de Con A-Sefarosa 4B¹¹¹ (Pharmacia, Upsala Sweden). (Fig. 7), en el material eluido con α -metil D-manósido se observó por EGPA-DSS la banda de 50-55 kDa con algunos contaminantes menores (Fig. 6, Carril D), por lo que se decidió hacer un paso de purificación adicional, con esta fracción se hicieron geles preparativos de los cuales se eluyó con urea 6 M la banda de 55-50 kDa (Carril E, Fig. 6). La homogeneidad de la proteína purificada se confirmó por inmunoblot utilizando suero hiperinmune de conejo en contra de M. tuberculosis (Carril F, Fig 6). Después de la elución con urea 6 M se

mantuvo la afinidad de esta proteína por la Con A demostrado esto por inmunoblot.



Figura 6.

Purificación del antígeno de 50-55 kDa. Carril A, tinción de Coomassie del precipitado de las proteínas del filtrado del medio de cultivo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45%. Carril B, inmunoblot del sobrenadante de precipitar a pH 5 la fracción anterior, revelado con Con A-peroxidasa. Carril C, tinción de Coomassie de la fracción anterior. Carril D, tinción de Coomassie de la fracción eluida con α -metil D-manosido de la

columna de Con A-Sefarosa. Carril E, tinción de Coomassie de la proteína purificada por elución con urea 6 M. Carril F, inmunoblot del antígeno puro electrotransferido a papel de nitrocelulosa y revelado con un suero hiperinmune anti-H37/Rv.

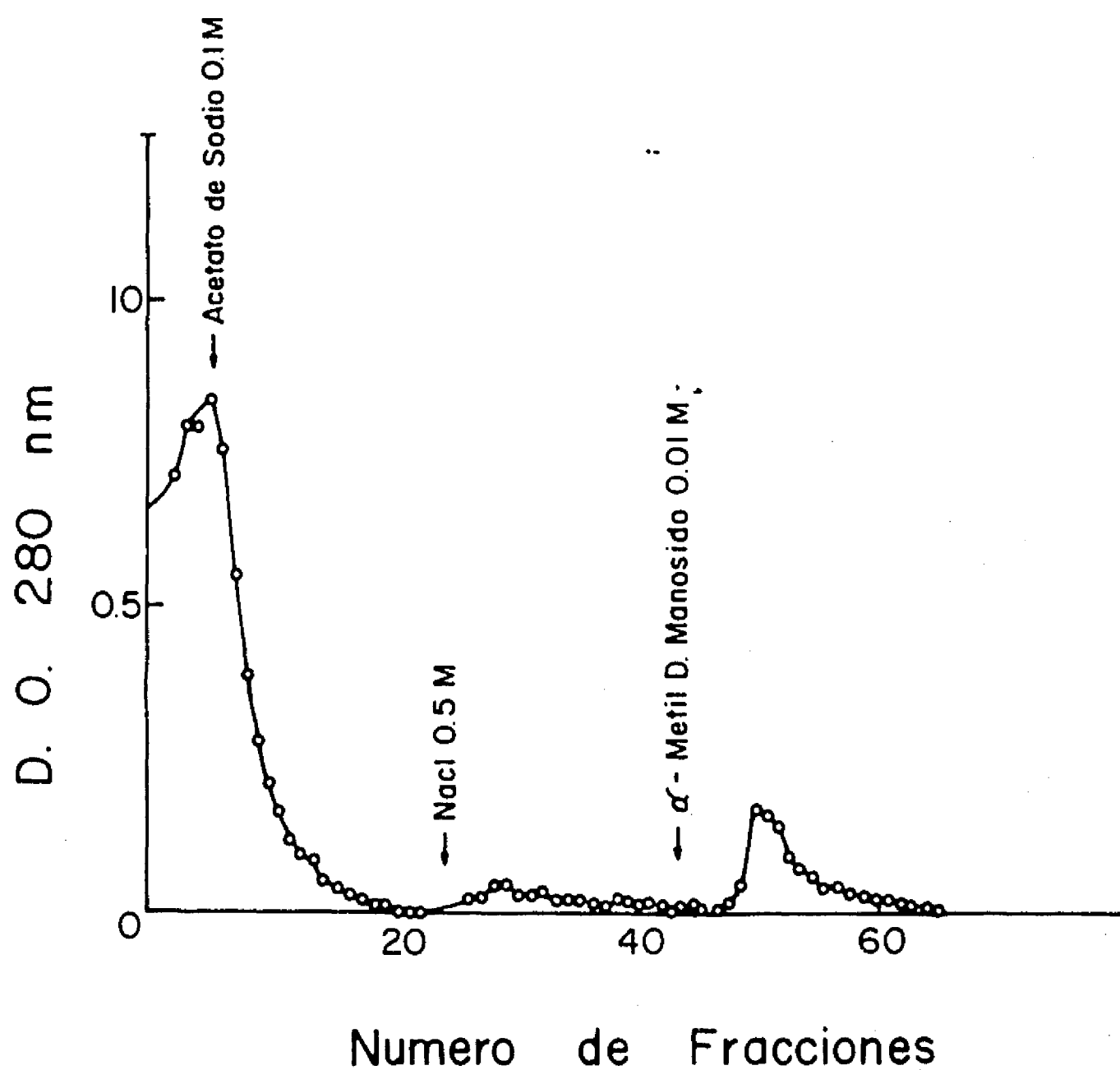


Figura 7.

Cromatografía de afinidad con Con A de las proteínas precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45%. El material unido específicamente (segundo pico), fué eluido con α -metil D-manósido. El material unido (primer pico) fué lavado con amortiguador de buffer de acetatos.

B. PURIFICACION DE LA PROTEINA DE 30-31 KILODALTONES

El filtrado del medio de cultivo precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90%. El precipitado se resuspendió y se le ajustó el pH a 5. El sobrenadante obtenido se pasó por una columna de Con A-Sefarosa 4B siguiendo el método descrito anteriormente. El material no pegado a la columna estaba enriquecido en el doblete de 30-31 kDa el cual fué eluido de geles preparativos con urea 6 M. En la Figura 4 del apéndice I (High antibody levels to the mycobacterial fibronectin-binding antigen of 30-31 kD in tuberculosis and lepromatous leprosy) se ilustran los pasos seguidos y los resultados obtenidos con este procedimiento de purificación que fué exitoso ya que se obtuvo un producto homogéneo con capacidad para reaccionar con la fibronectina. Los intentos para purificar el Fn 30-31 de la fracción enriquecida utilizando otras metodologías como la cromatografía con DEAE celulosa, la elución de membranas de nitrocelulosa con acetonitrilo y la electroelución fueron infructuosos.

C. PURIFICACION DE LA PROTEINA DE 70 KILODALTONES

Como se señaló antes, se observó que la fracción III obtenida mediante el fraccionamiento ácido-alcohólico del ETF estaba enriquecida en una banda de proteína de 70 kDa; ésta fué la fuente de antígeno para la purificación de dicha proteína. Los

intentos para purificarla mediante elución con acetonitrilo y electroelución fueron infructuosos. En vista de lo anterior la proteína se eluyó de los geles de acrilamida con urea 6 M. En la Fig. 8, Carril A se observa el ETF fuente inicial de la cual se obtuvo la Fracción. Carril B, fracción enriquecida en el antígeno de 70 kDa. En el Carril C, se muestra la proteína purificada por elución con urea 6 M y en el Carril D, la reactividad de la misma con un suero hiperinmune anti-H37/Rv que muestra la homogeneidad del producto obtenido.

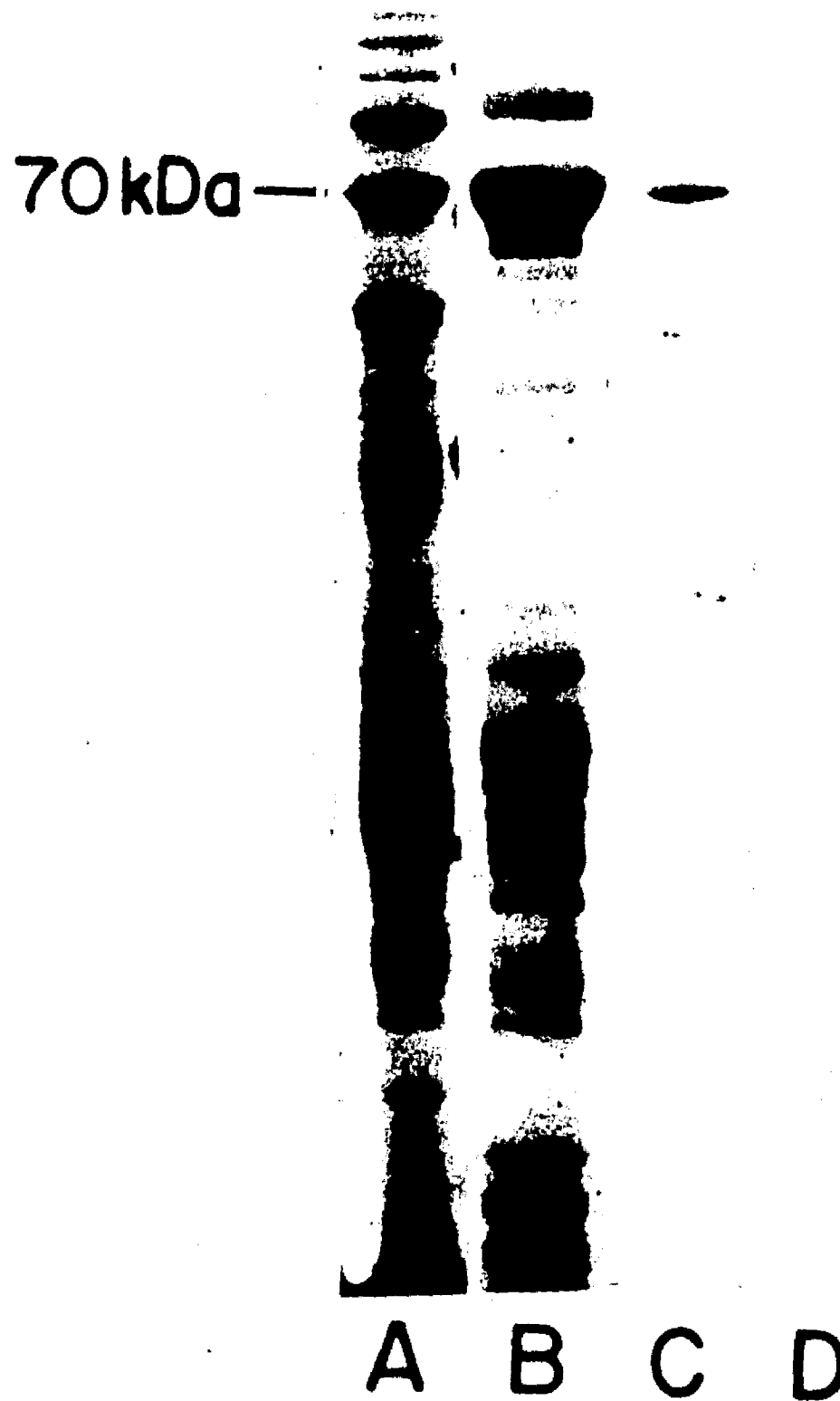


Figura 8.

Purificación del antígeno de 70 kDa. Carril A, ETF. Carril B, Fracción III enriquecida en el antígeno de 70 kDa. Carril C, tinción de Coomassie de la proteína purificada por elución con urea 6 M. Carril D, inmunoblot del antígeno puro electrotransferido a papel de nitrocelulosa y revelado con un suero hiperinmune anti-H37/Rv.

D. PURIFICACION DE LA PROTEINA DE 38 KILODALTONES

La estrategia seguida para la purificación de este antígeno se basó en la observación de que esta proteína era muy resistente a la precipitación a pHs ácidos. En vista de esto se decidió usar el método de Seibert¹⁰⁰ con el propósito de obtener fracciones enriquecidas en la proteína de 38 kDa. En general el material inicial fué el sobrenadante obtenido al precipitar el filtrado del medio de cultivo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45%. (Fig. 9, Carril A). Este material se fraccionó siguiendo el procedimiento de Seibert. La proteína de 38 kDa se encuentra abundantemente representada en la Fracción V (Carril B) que es el sobrenadante resultante de la precipitación a pH 4 y con una concentración de alcohol del 70%. La presencia de contaminantes menores nos llevó a utilizar un paso adicional de purificación mediante la elución de la proteína de geles de acrialmida con urea 6 M. En el Carril C, se observa la proteína purificada en un gel teñido con azul de Coomassie y en el Carril E, se muestra la reactividad de la proteína con un suero hiperinmune anti-H37/Rv. Es notable la pureza de la proteína obtenida. Esta proteína retuvo su reactividad con Con A-peroxidasa después del procedimiento de purificación. Se intentó también la purificación de Gp 38 por cromatografía de afinidad con Con A la cual resultó infructuosa.

38kDa-

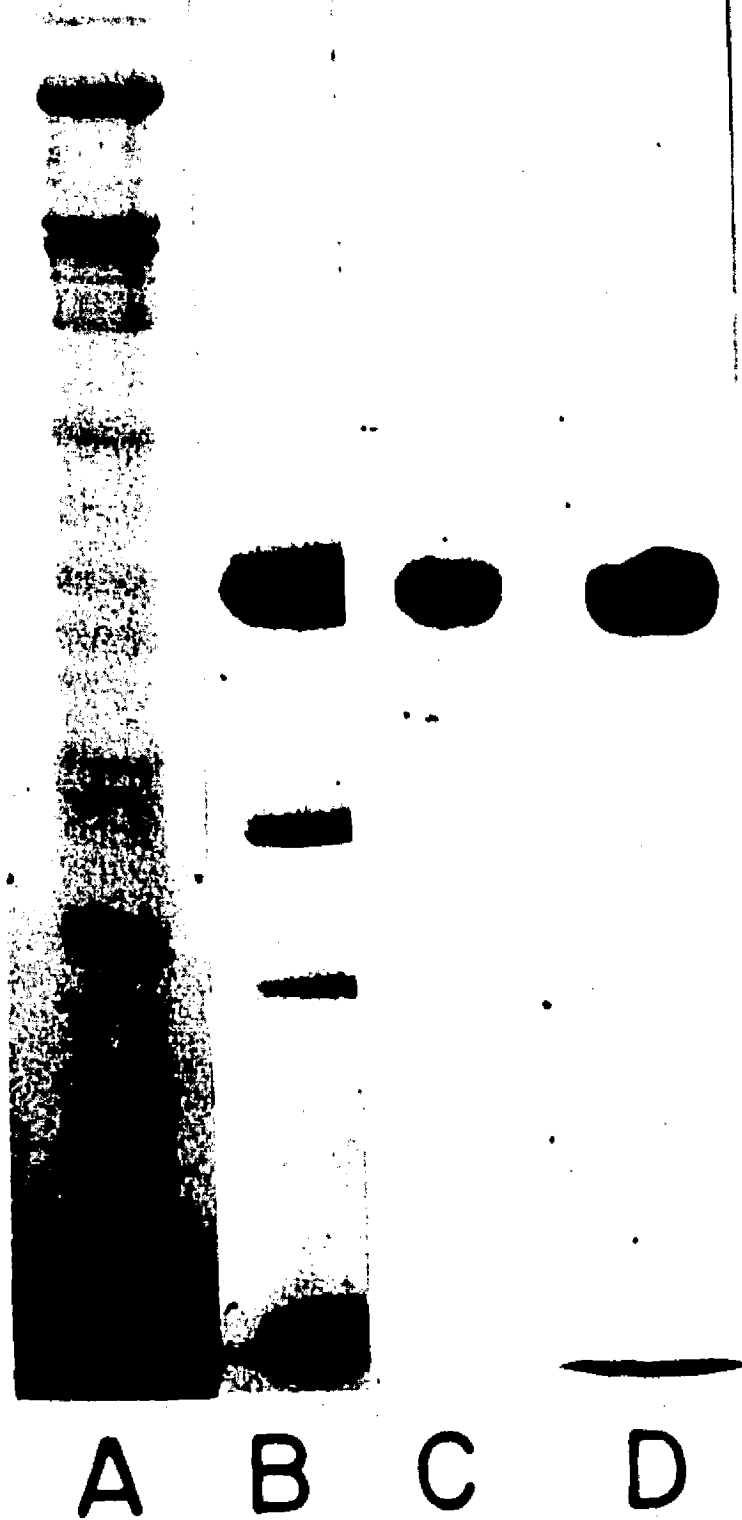


Figura 9.

Purificación del antígeno de 38 kDa. Carril A, sobrenadante de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45%. Carril B, Fracción enriquecida en Gp 38, sobrenadante de la precipitación a pH 4 y alcohol al 70%. (Fracción V de Seibert). Carril C, tinción de Coomassie de la proteína purificada por elución con urea 6 M. Carril D, inmunoblot del antígeno puro electrotransferido a papel de nitrocelulosa y revelado con un suero hiperinmune anti-H37/Rv.

E. PURIFICACION DE LA PROTEINA DE 16 KILODALTONES

Para la purificación de este antígeno se empleó parcialmente la metodología descrita para la obtención de extractos cetónicos del M. tuberculosis, utilizados en la inducción de artritis por adyuvante en ratas Lewis⁵⁹. Las bacterias muertas por calor se maceraron en un mortero y se resuspendieron en agua destilada por 48 h a 4° C; después de centrifugar el sobrenadante que contenía los antígenos se concentró por ultrafiltración; en el Carril A, de la Fig. 10, se muestra el patrón electroforético de las proteínas contenidas en el extracto obtenido por maceración; se observan unas 15 bandas debilmente teñidas con pesos moleculares entre 90 y 14 kDa. Es notorio el enriquecimiento de una proteína de 16 kDa por este procedimiento. Este material se utilizó como fuente para la purificación de este antígeno lo cual se llevó a cabo por elución de geles preparativos con urea 6 M. En el Carril B, se observa la tinción con Coomassie correspondiente a la proteína eluida y en el Carril C, la reactividad con el suero hiperinmune anti-H37/Rv. En ambos casos se observó una banda homogénea de 16 kDa libre de contaminantes.

16kDa-



Figura 10.

Purificación del antígeno de 16 kDa. Carril A, extracto obtenido de bacterias maceradas muertas por calor. Carril B, tinción de Coomassie de la proteína purificada por elución con urea 6 M. Carril C, inmunoblot del antígeno puro electro-transferido a papel de nitrocelulosa y revelado con un suero hiperinmune anti-H37/Rv.

6. HETEROGENEIDAD DE LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A LOS ANTIGENOS PROTEICOS PURIFICADOS EN EL RATON

La respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) a los diferentes antígenos purificados se examinó en ratones sensibilizados diez días antes con una sola dosis de ETF en adyuvante completo de Freund. Se midió el incremento en el grosor del cojinete inyectado con el antígeno de prueba, restándose el engrosamiento del cojinete contralateral. El incremento se expresó en mm. En todos los casos se hicieron mediciones las 24, 48 y 72 horas habiéndose notado que con todas las proteínas probadas el incremento máximo se obtuvo a las 24 horas lo cual coincide con lo reportado en la literatura. Los resultados (Fig. 11) muestran que la HR es mayor en ratones retados con el ETF. Las respuestas de HR a Gp 50-55, Fn 30-31 y P 16 fueron comparables en magnitud y de menor intensidad que las inducidas por el ETF. La Gp 38 indujo HR de baja magnitud. Es de interés que la dos proteínas de choque térmico, la de 70 y la de 65 kDa fueron virtualmente incapaces de inducir respuestas de HR.

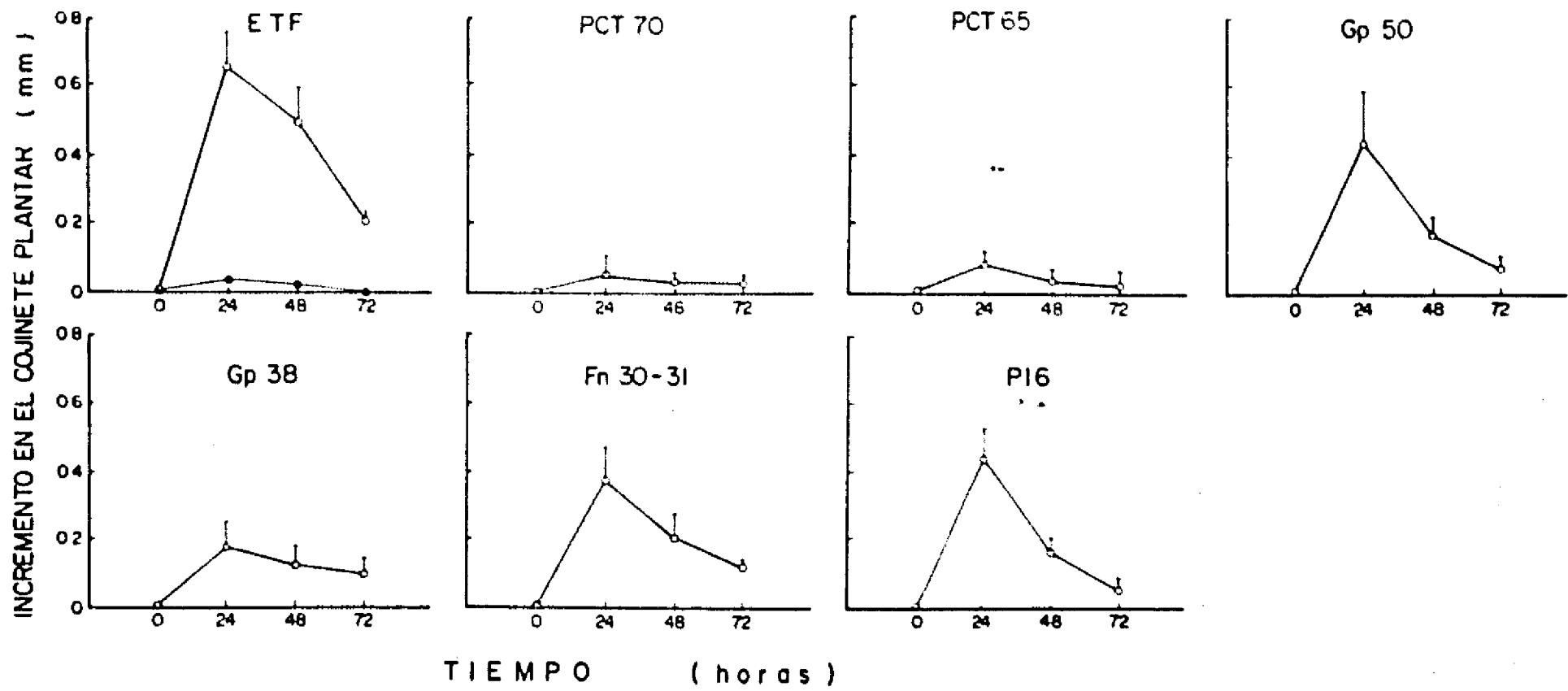


Figura 11.

Respuesta de hipersensibilidad retardada a los diferentes antígenos purificados en animales sensibilizados con ETF. Los resultados corresponden al promedio de diez animales. El control se señala con círculos cerrados.

7. LA RESPUESTA HUMORAL A ANTIGENOS PROTEICOS PURIFICADOS EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR

En la Fig. 12 y en la Tabla I, se señalan los resultados obtenidos con las 6 proteínas probadas. En primer lugar hay que señalar que al comparar por la prueba de Mann-Whitney Wilcoxon los títulos de anticuerpos, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre población tuberculosa y controles con los 6 diferentes antígenos (Tabla I). Es evidente la heterogeneidad de los resultados obtenidos. Se puede observar que la PCT 70 es un antígeno muy pobre para detectar anticuerpos circulantes en pacientes con tuberculosis ya que los títulos obtenidos son muy bajos. La densidad óptica promedio de los sueros tuberculosos fué de 0.160 y la de los sueros control fué de 0.060. El ELISA con la PCT 70 dió una especificidad de 0.97 pero la sensibilidad fué muy baja (0.31). La especificidad del ELISA con la PCT 65 fué de 0.94 pero de nuevo la sensibilidad fué muy baja. Los resultados obtenidos en el ELISA con la P16 fueron muy semejantes a los obtenidos con la PCT 65. Los mejores resultados se obtuvieron con las glicoproteínas. Con la Gp 50-55 se obtuvo una densidad óptica promedio de 1.064 en los sueros de los tuberculosos y de 0.096 en los sueros de los individuos sanos, siendo la especificidad y sensibilidad de 0.98 y de 0.70 respectivamente. Los resultados obtenidos con la GP 38 fueron muy semejantes. En la Tabla II se observa el efecto del tratamiento sobre los títulos de

anticuerpos en contra del Fn-30-31 y de la Gp 50-55 los cuales fueron significativamente mayores en el grupo de los individuos tratados ($P < 0.01$) y para la PCT 70 los niveles de anticuerpos fueron significativamente mayores en los pacientes no tratados ($P < 0.05$). Las diferencias no fueron significativas en los ELISAs con P16, Gp 38 y PCT 65.

Correlación entre las especificidades de anticuerpos.

Los niveles de anticuerpos obtenidos de pacientes con tuberculosis fueron analizados con la prueba del coeficiente de correlación de Spearman. Las correlaciones más altas fueron encontradas entre los títulos de anticuerpos en contra de la Gp 38 y el Fn 30-31, la Gp 38 y la Gp 50-55 ($r = 0.74$ y $r = 0.73$) respectivamente; ($P < 0.001$). La correlación de unión entre la P 16 con el Fn 30-31, con la Gp 38 y con la PCT 70 fueron de significancia menor.

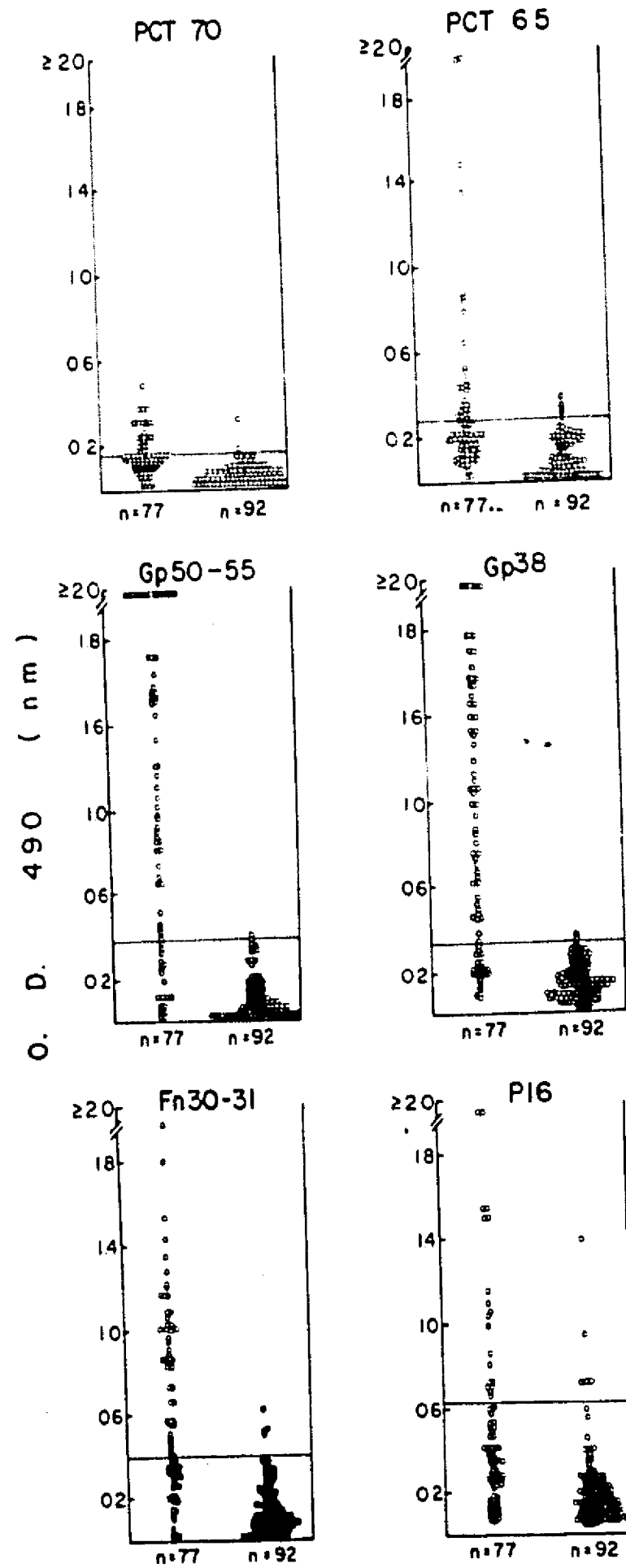


Figura 12.

Títulos de anticuerpos contra los antígenos de 70, 65, 50-55, 38, 30-31, y 16 kDa por ELISA en 77 enfermos con tuberculosis pulmonar (círculos de la izquierda) y 65

individuos sanos (círculos de la derecha). El punto de corte se estableció tomando la suma del promedio de DO del grupo testigo más dos desviaciones estandar (línea horizontal). Cada círculo representa un individuo.

 Tabla I
 Sensibilidad y especificidad del ELISA con antígenos purificados

Antígeno	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Promedio de DO_{490}		Corte ^a
			Enfermos (N = 77)	Testigos (N = 92)	
PCT 70	31	97	0.160±0.103	0.060±0.052 ^b	0.176
PCT 65	27	94	0.339±0.378	0.108±0.093 ^b	0.274
Gp 50-55	70	98	1.064±0.621	0.096±0.128 ^b	0.354
Gp 38	75	97	0.943±0.616	0.136±0.086 ^c	0.308
Fn 30-31	61	95	0.664±0.439	0.148±0.141 ^c	0.410
P 16	27	94	0.503±0.437	0.217±0.205 ^c	0.626

^aPromedio del grupo testigo más dos desviaciones estandar.

^b(P < 0.001). ^c(P = 0)

 Tabla II
 Efecto del tratamiento en la respuesta humoral a proteínas
 purificadas en tuberculosis pulmonar

Promedio de DO_{490} ..			
Antígeno	No Tratados (n = 35)	tratados (n = 42)	
PCT 70	0.184 ± 0.1	0.140 ± 0.00	(P < 0.05)
PCT 65	0.323 ± 0.327	0.352 ± 0.420	(P = 0.96)
Gp 50-55	0.817 ± 0.648	1.264 ± 0.730	(P < 0.01)
Gp 38	0.881 ± 0.595	0.991 ± 0.648	(P = 0.4)
Fn 30-31	0.504 ± 0.403	0.787 ± 0.430	(P < 0.01)
P 16	0.558 ± 0.476	0.458 ± 0.403	(P = 0.35)

V. DISCUSION

El objetivo fundamental de este trabajo fué la purificación y caracterización de componentes antigénicos individuales de Mycobacterium tuberculosis con el fin de estudiar la respuesta inmune inducida por éstos y de ésta forma poder identificar antígenos potencialmente útiles como reactivos de inmunodiagnóstico, o como instrumentos para el diseño de vacunas moleculares. Además, la caracterización estructural y funcional de los antígenos individuales podría ayudar a dilucidar algunas facetas de la relación bacilo/individuo infectado. En este contexto, pareciera que el enfoque de las investigaciones que conforman esta tesis es en esencia reduccionista ya que se basa en la premisa de que solo unos pocos de los cientos de moléculas que seguramente constituyen al bacilo de la tuberculosis son relevantes en la respuesta inmune que desarrollan los individuos infectados o en la patogenia de la tuberculosis. No es éste sin embargo nuestro pensamiento, ya que todos los componentes del bacilo bien sea estructural o funcionalmente deben jugar un papel definido. Al establecerse la relación huésped-parásito posiblemente, solo algunos de ellos serán responsables de los efectos sobre el sistema inmune. Sin embargo, en la integridad y sobrevivencia de la bacteria en el individuo infectado participan sin duda todos sus componentes.

La gran complejidad estructural de la micobacteria, la ineficiencia relativa de los métodos de inmunodiagnóstico que

fracaso relativo de la vacunación con el BCG en algunas partes del mundo han motivado mucho interés recientemente en identificar, aislar y caracterizar los componentes micobacterianos involucrados en la respuesta inmune. Por otra parte se sabe que los componentes de las micobacterias son muy heterogéneos en lo que concierne a sus efectos sobre el sistema inmune. En primer lugar es de esperarse que algunos componentes sean inertes desde un punto de vista inmunológico y que otros sean activos. Se sabe por ejemplo, que el efecto adyuvante de la pared radica en el muramil dipeptido¹¹², que algunos componentes inducen respuestas de inmunidad humoral muy potentes y que otros son inductores preferenciales de fenómenos de inmunidad celular^{113,114}. Igualmente hay datos que indican que ciertas sustancias micobacterianas son capaces de producir fenómenos de inmunosupresión⁷⁰ y que hay algunos componentes involucrados en el desarrollo de autoinmunidad⁵³. Al igual que ocurre con otros patógenos es factible que algunos de los componentes de bacilos sean antígenos inmunodominantes especie-específicos que puedan ser eficientes como reactivos de inmunodiagnóstico y para inducir inmunidad celular protectora y que por lo tanto puedan ser utilizados como vacunas.

En este trabajo consideramos necesario desarrollar métodos y criterios que nos permitieran identificar antígenos potencialmente relevantes antes de proceder a su aislamiento y evaluación. Esta estrategia que parecería obvia no ha sido observada por la mayoría de los investigadores que han tratado de aislar antígenos; en general ha sido la factibilidad de

purificar un componente micobacteriano la consideración principal.

No obstante que los antígenos no protéicos de la pared pueden ser importantes en diversos aspectos de la respuesta inmune al M. tuberculosis, en este trabajo solo se consideraron para su purificación antígenos de naturaleza protéica. Las consideraciones en que se basó esta decisión fueron las siguientes: las proteínas son quizás las moléculas más inmunogénicas y las que están más estrechamente relacionadas con el desarrollo de hipersensibilidad retardada al bacilo de Koch que es una forma de inmunidad mediada por linfocitos T; éstas células son muy probablemente las involucradas en el desarrollo de inmunidad protectora. En cambio los carbohidratos de la pared bacilar juegan un papel importante en el desarrollo de inmunidad mediada por anticuerpos la cual es irrelevante como mecanismo inmunitario protector⁴⁸; por otra parte no se ha documentado que los lípidos y carbohidratos de la pared celular del bacilo sean capaces de inducir inmunidad celular. Los criterios que utilizamos para seleccionar los antígenos protéicos por purificar fueron los siguientes:

- Bandas de proteína abundantes en extractos antigénicos totales resueltos por EGP-DSS.
- Proteínas que fueran más frecuentemente reconocidas por anticuerpos séricos de pacientes con tuberculosis pulmonar en estudios de inmunoblot.
- Proteínas con residuos de carbohidratos.
- Proteínas caracterizadas como biológicamente relevantes en la

literatura.

No obstante que existen variaciones en la proporción relativa de las diferentes bandas de proteína en geles de poliacrilamida de extractos obtenidos del medio de cultivo del M. tuberculosis teñidos con azul de Coomassie, hay bandas de proteína que destacan por su abundancia y que, por esta sola razón, podrían ser candidatos para su purificación. Tal es el caso del Fn 30-31 el cual por análisis densitométrico de los geles representa el 13.7% del total de la proteína presente en los extractos de filtrados del medio de cultivo y solamente el 4.15% en los sonicados. Además, nuestros estudios de inmunoblot e "immunoplot" nos permitieron identificarlo como un antígeno inmunodominante para la respuesta de inmunidad humoral ya que fué reconocido por el 74% de los sueros estudiados. Además de estas observaciones realizadas en nuestro laboratorio, se sabe que este antígeno está presente en otras micobacterias^{81, 115}. Ahora se conoce que el Fn 30-31 corresponde al complejo BCG 85 A y B descrito inicialmente por Closs y col. en el M. bovis BCG¹¹⁶. Por otra parte hay datos recientes que sugieren que éste es un antígeno activamente secretado al medio de cultivo. Se ha observado en experimentos de marcaje metabólico con metionina radioactiva, que aparecen bandas del 30-31 kilodaltones a partir del tercer día de cultivo¹¹⁷. El gen que codifica para esta proteína fué recientemente clonado, documentándose que la proteína posee hacia el extremo amino terminal una secuencia de aminoácidos que corresponde a un péptido señal necesario para las proteínas que van a ser

secretadas⁸¹. Se ha documentado además que el Fn 30-31 tiene afinidad por fibronectina. Estas observaciones se originan en estudios de Morales y col. en el tratamiento del cáncer de la vejiga urinaria por instilación intracavitaria del BCG. En pacientes con carcinoma superficial, se observó una mejoría notable que se atribuyó a destrucción de células tumorales por macrófagos activados por el BCG¹¹⁸. Posteriormente se observó que los bacilos se unían a superficies recubiertas de fibronectina¹¹⁹. El estudio de unión del BCG a fibronectina soluble sigue una cinética sugestiva de la existencia de receptores para fibronectina en la superficie de las bacterias¹²⁰. Abou-Zeid y col. identificaron las moléculas micobacterianas responsables de esta reactividad. Estos investigadores observaron por inmunoblot que la fibronectina se unía con gran intensidad al doblete de 30-31 kDa y debilmente a bandas poco aparentes de 58 y 60 kDa⁸⁸. Se han identificado componentes que unen fibronectina en varios otros patógenos como son el Staphylococcus aureus¹²¹, Treponema pallidum¹²², Leishmania donovani¹²³ y el Trypanosoma cruzi¹²⁴. El papel biológico de estos antígenos es hasta ahora desconocido. Hay sin embargo, observaciones que sugieren que estas moléculas podrían servir para evadir la respuesta inmune o como puentes que permitirían la fagocitosis por macrófagos a través de receptores de membrana para fibronectina, un evento crucial en la patogenia de las infecciones intracelulares¹²⁵. Todas las razones anteriores parecen justificar la elección del Fn 30-31 para su aislamiento y caracterización inmunológica. También se seleccionó para ser

purificada una proteína de 38 kDa. Esta proteína ha sido estudiada ampliamente tanto por nosotros como por otros investigadores siendo en la actualidad una de las proteínas del M. tuberculosis que más interés está suscitando. Las razones para este interés son múltiples. En primer lugar se trata de una proteína con una especificidad de especie muy alta, ya que con anticuerpos monoclonales y con sondas de DNA que portan secuencias del gen que codifica para esta proteína se ha demostrado que está presente únicamente en el complejo M. tuberculosis (M. tuberculosis y M. bovis BCG.)^{31,126,127}. En relación quizá con esta característica, la Gp38 se ha revelado como el antígeno más prometedor para el diagnóstico serológico de la tuberculosis. En estudios de inhibición competitiva¹²⁸ o por ELISA^{20,21} se logran identificar hasta un 83% de pacientes con tuberculosis. Estos estudios además son de muy alta especificidad ya que la proteína no es reconocida por los individuos sanos. Las razones expuestas anteriormente hacen que la Gp 38 sea considerada como un antígeno inmunodominante. Esta proteína es también activa en la inducción de fenómenos de inmunidad celular. Se ha observado que induce la transformación blastoide de linfocitos T aislados de ratones, de cobayos y de humanos adecuadamente sensibilizados^{73,126}. Los estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que este antígeno posee carbohidratos⁷⁴, lo cual al igual que ocurre con otras glicoproteínas podría explicar su alta inmunogenicidad¹²⁹. A esto también podría contribuir el hecho de que es una proteína aparentemente de secreción¹¹⁷ y que se

encuentra localizada en la pared y en la superficie bacteriana (Ver Anexo II). El gen que codifica para esta proteína ha sido clonado y secuenciado⁸⁰. Se han hecho observaciones de interés que podrían ayudar a entender mejor a esta molécula; por ejemplo se ha observado que posee dos sitios de posible glicosilación y al igual que con otras proteínas la secuenciación ha ayudado a identificar posibles funciones en la Gp 38. Como se señala en el Anexo II de esta tesis, la Gp38 parece estar involucrada en el metabolismo de fosfatos. Esto se derivó inicialmente de la observación de que la proteína compartía un 30% de homología con la proteína PhoS de la *E. coli* que une fosfatos⁸⁰. Andersen y col. han hecho recientemente observaciones que apoyan esta posibilidad¹³⁰ y en el Anexo II de esta tesis se presentan evidencias adicionales que involucran a la Gp 38 en el metabolismo de fosfatos.

Otro antígeno elegido para ser purificado fué la glicoproteína de 50-55 kDa. Esta proteína se eligió con base en los estudios con concanavalina A, mismos que han demostrado que posee residuos de manosa⁷⁴. Se pensó que este hecho conferiría a esta molécula relevancia biológica, pues es bien conocido que las glicoproteínas son moléculas inmunogénicas comunes a muchos organismos, que participan en diversos procesos de interacción y comunicación celular¹³¹. Se escogió esta molécula a pesar de que no se trata de una proteína abundante ni inmunodominante a juzgar por el inmunoblot²¹. Hasta donde sabemos este antígeno no ha sido descrito anteriormente en la literatura.

En este trabajo y en el que conformó mi tesis de Maestría

hemos hechos la observación sin precedente de la presencia de carbohidratos en proteínas de un procariote importante como es el bacilo de la tuberculosis. Al igual que la Gp 50-55 la Gp 38 fue identificada por nosotros como una glicoproteína. Los estudios con Con A, demostraron que las dos proteínas poseen residuos de manosa. La especificidad de ésta unión se demostró por la pérdida de reactividad con Con A, cuando se incubaron las proteína en presencia de Con A y α -metil D-manosido o se trataron con metaperiodato. Además la naturaleza protéica de estas moléculas se dedujo de la observación de que se tiñen con azul con azul de Coomassie en geles de acrilamida y son susceptibles a la acción de proteasas⁷⁴. A pesar de que existen razones para definir a las moléculas que unen Con A en M. tuberculosis como glicoproteínas, es necesario hacer un comentario a este respecto. Las glicoproteínas en procariotes son raras y han sido poco estudiadas. Verdaderas glicoproteínas esto es, proteínas con carbohidratos unidos covalentemente a un aminoácido se han caracterizado bioquímica y funcionalmente únicamente en algunas arqueobacterias. Una verdadera unión carbohidrato-proteína definida a nivel molecular no ha sido aún documentada en las eubacterias¹³². Por lo tanto es necesaria la caracterización química de estas moléculas con el fin de determinar si son verdaderas glicoproteínas.

Basados también en el criterio de abundancia se decidió purificar una proteína de 16 kDa la cual demostró ser muy abundante en extractos provenientes de macerados de las bacteria muertas por calor. En estudios de densitometría de

extractos obtenidos por sonicación hemos observado que ésta es la proteína más abundante constituyendo el 20.5% de la proteína total. Por otra parte hay datos que indican que la P16 es el antígeno más frecuentemente reconocido por niños con tuberculosis pulmonar¹³³ y por lo tanto de posible utilidad en el diagnóstico de la tuberculosis infantil..

Basados en la relevancia que la literatura reciente concede a las proteínas de choque térmico decidimos aislar la proteína de 70 kDa y estudiar la proteína recombinante de 65 kDa. La PCT 70 se ha catalogado como un antígeno inmunodominante en el hombre ya que se encuentran anticuerpos contra ella en el suero de enfermos con tuberculosis y lepra⁷¹. Uno de los hallazgos más importantes con respecto a este antígeno es que pertenece a la familia de proteínas de choque térmico que tienen actividad funcional de ATPasa, aunque esta actividad no ha sido demostrada en la PCT 70 de micobacterias, se ha observado que la PCT 70 presente en los filtrados del medio de cultivo de M. tuberculosis se une a ATP acoplado a Sefarosa y se eluye específicamente con ATP^{77,86}. Indirectamente nosotros definimos a la proteína de 70 kDa presente en la fracción de Seibert como la PCT porque los anticuerpos monoespecíficos originados contra ésta en el ratón reaccionaron con la proteína eluida de ATP-Sefarosa con ATP.

Por otra parte la PCT 65 ha sido uno de los antígenos micobacterianos más estudiados en la literatura debido a su aparente inmunodominancia a nivel de la respuesta humoral y celular^{95,134}. La secuencia de aminoácidos de las PCT 65 de M.

tuberculosis , M. bovis BCG y M. leprae han sido determinadas y se ha encontrado que las dos primeras son idénticas y comparten un 95% de homología con la PCT 65 de M. leprae¹³⁵. Así mismo, con base en la homología en la secuencia de aminoácidos se ha demostrado que la PCT 65 pertenece a una familia de proteínas bacterianas altamente conservadas representadas por el producto del gen groEl de la E. coli⁸⁵.

Como ha sido descrito anteriormente, los intentos por purificar antígenos micobacterianos han estado acompañados de innumerables problemas¹¹³. Nosotros consideramos que uno de los posibles factores involucrados en este fracaso podría ser la enorme complejidad de las mezclas antigénicas. Por lo anterior obtuvimos fracciones de los extractos del filtrado del medio de cultivo para simplificar su composición.

Para el propósito anterior, el fraccionamiento ácido alcohólico descrito por Seibert¹⁰⁰ resultó de una enorme utilidad. Por este método se logró obtener una fracción altamente enriquecida en la Gp 38 con muy pocos contaminantes; así mismo se obtuvo una fracción enriquecida en la PCT 70. Igualmente la fracción obtenida por precipitación con sulfato de amonio al 45% seguida de precipitación a pH 5 nos permitió obtener una fracción enriquecida en la Gp 50-55. Este mismo procedimiento resultó en la obtención de una fracción enriquecida en el Fn 30-31. De las fracciones enriquecidas señaladas y como un paso final se obtuvieron los antígenos individuales eluyendolos de geles preparativos con urea 6 M. De esta manera igualamos las condiciones de purificación de las proteínas para compararlas

condiciones de purificación de las proteínas para compararlas como antígenos. Con estos métodos la antigenicidad de las proteínas purificadas se preserva en mayor o menor grado, al igual que otras propiedades como son la reactividad con Con A de la Gp 38 y Gp 50-55 y del Fn 30-31 con fibronectina.

Las proteínas purificadas fueron analizadas y comparadas entre sí en dos parámetros de actividad inmunológica. En primer lugar evaluamos la capacidad de las proteínas P 16, Fn 30-31, GP 38, Gp 50-55, PCT 65 y PCT 70 de inducir hipersensibilidad retardada con el propósito de obtener información preliminar que pudiera ayudarnos a identificar antígenos puros inductores de inmunidad celular y potencialmente de inmunidad protectora. La aparición de hipersensibilidad retardada es aceptada hoy en día como una indicación de que el individuo es portador de un estado de inmunidad celular en contra del antígeno o "elicitina" utilizado. Estos experimentos se condujeron en ratones singénicos BALB/c a los cuales se les midió el desarrollo de HR después de sensibilizarlos apropiadamente con extractos totales del M. tuberculosis. El estudio comparativo nos permitió clasificar a los antígenos estudiados en tres categorías: Con capacidad inductora alta: Gp 50-55, Fn 30-31 y p16, con capacidad inductora media: Gp 38 y no inductores: PCT 65 y PCT 70. Estos hallazgos son importantes porque definen la potencia de un antígeno con respecto a otros de despertar una respuesta de HR y por lo tanto debe ser considerado como un candidato potencialmente inductor de inmunidad protectora. La comparación de la RH a el ETF y a la Gp 50-55 y la P 16 nos

potentes inductores de HR. Los resultados obtenidos por nosotros con la Gp 38 coinciden con los documentados por otros investigadores. No así, los obtenidos con el Fn 30-31, DeBruyn and col. no obtuvieron respuesta de HR a este antígeno en cobayos y ratones sensibilizados⁷⁶. Desconocemos la causas de estas diferencias. Por otra parte, bajo las condiciones utilizadas en este trabajo no encontramos una respuesta HR a la PCT 70 y PCT 65. Estos resultados no coinciden con lo reportado en la literatura ya que se han catalogado estas proteínas como inmunodominantes^{85,95}. La PCT 70 purificada con anticuerpos monoclonales utilizada en humanos, indujo una RH en el grupo de individuos vacunados con el BCG y en sujetos PPD⁷¹ sin embargo, en ratones sensibilizados con M. tuberculosis no se generaron clonas de linfocitos T en contra de este antígeno⁹³. Los estudios con la PCT 65 recombinante de M. leprae demostraron que esta proteína induce HR en ratones sensibilizados con M. leprae¹⁰⁸, la alta homología existente entre la PCT 65 del M. lepra M. tuberculosis¹³⁵ presupodría la existencia de algún grado de respuesta en los animales sensibilizados con el M. tuberculosis y retados con PCT 65, sin embargo nuestros resultados no demuestran esto. La existencia de reactividad cruzada se ha documentado con la PCT 65 recombinante de Mycobacterium gordonae la cual induce HR en cobayos sensibilizados con M. leprae y M. bovis BCG¹³⁶. No encontramos antecedentes de un estudio previo donde se utilice la PCT 65 del M. leprae para inducir RH en animales sensibilizados con el M. tuberculosis. A la luz de lo que se conoce hoy en

con el M. tuberculosis. A la luz de lo que se conoce hoy en día de estos antígenos, como proteínas de choque térmico altamente conservadas, no es sorprendente que en condiciones normales no se monte una respuesta significativa en contra de ellas, nuestros hallazgos van de acuerdo con esto, sin embargo hay que tener en mente la variabilidad de los ensayos.

Estas observaciones muestran que las proteínas de choque térmico son pobres inductoras de HR a diferencia de las otras proteínas estudiadas (Gp 50-55, P 16, Fn 30-31 y Gp 38). Estas observaciones deberán ser ampliadas estudiando linfocitos de individuos con tuberculosis pulmonar y animales sensibilizados.

El análisis comparativo llevado a cabo utilizando los mismos reactivos y métodos y durante la misma sesión hicieron posible comparar la antigenicidad humoral de las 6 proteínas aisladas de M. tuberculosis en pacientes con tuberculosis pulmonar comprobada. Observamos que los antígenos más potentes desde un punto de vista humoral fueron las glicoproteínas de 38, 50-55 kDa, mientras que las PCT 70 y 65 fueron pobremente inmunogénicas ya que los títulos de anticuerpos más bajos se obtuvieron en contra de estos dos antígenos. Un trabajo de ésta magnitud utilizando antígenos puros solo ha sido realizado antes por Jackett y col. Estos investigadores compararon el valor como reactivos de serodiagnóstico de antígenos protéicos purificados de 14, 38 y 65 kDa y de la lipoarabinomanana. Esta comparación se llevó a cabo por ELISA directo y por inhibición competitiva utilizando anticuerpos monoclonales en contra de los antígenos mencionados²⁰. Algunos de los resul-

tados reportados son similares con los obtenidos en la presente tesis, como fué el caso de la Gp38 la cual resultó ser el antígeno con mayor sensibilidad. Nuestros resultados con la PCT 65 difieren de los suyos en que nosotros encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los títulos de anticuerpos de los individuos sanos y enfermos mientras que en su trabajo los altos títulos de anticuerpos registrados en el grupo testigo no permitieron discriminar entre las dos poblaciones. No tenemos una explicación para esta observación. Podría ser que diferencias metodológicas o de muestreo de poblaciones fuera un factor. En este trabajo hemos identificado un nuevo antígeno con características similares a la Gp 38, la Gp 50-55 con la cual se obtuvo la especificidad más alta la sensibilidad fue comparable a la obtenida con la Gp38.

Estos estudios muestran que el principal factor limitante para el desarrollo de una prueba serológica confiable en tuberculosis es la existencia de un grupo de pacientes en los cuales no se demuestran anticuerpos circulantes, lo cual podría deberse a que tienen una enfermedad limitada circunscrita, o a un estado anérgico. Esto es contrario a la suposición prevalente de que el principal problema en el diagnóstico de la tuberculosis es la existencia de falsos positivos por sensibilización previa¹³⁷.

Finalmente, es de interés que los títulos de anticuerpos en contra del Fn 30-31 y la Gp 50-55 fueron significativamente mayores en el grupo de enfermos tratados, el significado de

este hallazgo no es claro, pero es posible que este relacionado a un estímulo en la producción de anticuerpos por parte de los antígenos liberados por el tratamiento. Ahora bien, la elevación de los títulos de anticuerpos podría ser también un reflejo de la disminución de la carga antigénica, que ocasionaría un consumo menor de anticuerpos. Estas dos afirmaciones en principio parecen contradictorias sin embargo, es posible los dos fenómenos se den temporalmente diferenciados.

Como un último comentario es necesario anotar que el análisis de todos los antígenos incluyó únicamente grupos polares de sujetos enfermos y sanos. Es necesario analizar la influencia de otros factores como son la extensión de la enfermedad, la presencia de hipersensibilidad retardada al PPD, la vacunación con BCG, el tratamiento. Además se deberá incluir dentro de los controles a grupo de alto riesgo (convivientes con tuberculosos) que por razones obvias estan en continuo contacto con el bacilo. Todas estas consideraciones deben ser necesarias para poder establecer el valor real de un antígeno como reactivo de serodiagnóstico.

VI. CONCLUSIONES

- El agente causal de la tuberculosis, el bacilo de Koch, posee una mezcla compleja de moléculas de antigenicidad heterogénea.
 - La purificación de proteínas del Mycobacterium tuberculosis se facilita notablemente a partir de fracciones de menor complejidad obtenidas del extracto total del filtrado.
 - La purificación final por elución con urea 6 M no parece afectar drásticamente la antigenicidad y funcionalidad de las proteínas purificadas.
 - La proteínas con mayor capacidad para inducir reacciones de inmunidad celular de tipo hipersensibilidad retardada en el raton son las Gp 50-55 y P 16.
 - De la proteínas ensayadas las de choque térmico de 65 y 70 kDa son las menos antigénicas tanto a nivel humoral como celular.
 - En individuos adultos con tuberculosis pulmonar comprobada es más frecuente encontrar anticuerpos séricos circulantes en contra de las glicoproteínas de 50-55 y 38 kDa que son los antígenos más prometedores para desarrollar pruebas confiables de serodiagnóstico.
- El valor real de estas proteínas en el diagnóstico de la tuberculosis deberá determinarse por estudios prospectivos amplios que consideren los múltiples factores participantes.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Bloom, B.R. and Godal, T. 1983. Selective primary health care: strategies for control of diseases in the developing world. V. Leprosy. Rev. Infect. Dis. 5:765-780.
2. Nunn, P.P. and McAdam, K.P.W.J. 1988. Mycobacterial infections and AIDS. Brit. Med. Bull. 44:801-813.
3. Tuberculosis Prevention Trial, Madras. 1979. Trial of BCG vaccines in South India for tuberculosis prevention. Indian. J. Med. Res. 70:349-363.
4. Daniel, T.M. and Debanne, S.M. 1987. The serodiagnosis of tuberculosis and the other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. Am. Rev. Resp. Dis. 135:1137-1151.
5. Sensi, P. 1989. Approaches to development of new anti-tuberculosis drugs. Rev. Infect. Dis. II suppl 2:S467-S470.
6. IUAT/WHO. Study group 1982. Tuberculosis control. Tubercle 53:157-169.
7. Styblo, K. Tuberculosis control and surveillance. 1986. In Flenley DC, Petty TL, Eds. Recent advances in respiratory medicine. Edinburgh: Churchill Livingstone. 77-108.
8. Harries, A.D. 1990. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection in developing countries. Lancet. 335:387-390.
9. Informe Epidemiológico anual. 1984. Bol. Epidemiología. (México) 4:1-70
10. Informe epidemiológico de la tuberculosis. 1982. Bol. Epidemiología. (México) 3:37-39.
11. Sunderam, G., McDonald, M.J., Maniatis, T. 1986. Tuberculosis as a manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). J. Am. Med. Assoc. 256:362-366.
12. Centers for disease control. 1987. Tuberculosis in acquired immunodeficiency syndrome-Nueva York. MMWR.36: 785-795.
13. Hernández, S. 1988. El problema de la tuberculosis en la era del SIDA. OPS IV Seminario Regional de tuberculosis. Pub. Cient. 511:45-49.
14. Slutkin, G., Leowski, J. and Mann, J. 1988. Tuberculosis

- and AIDS. The effects of the AIDS epidemic on the tuberculosis problem and tuberculosis programmes. Bull. Int. Union. Tuberc. Lung. Dis. 63: 21-24.
15. WHO Epidemiological Record. 1989. Global programme on AIDS and tuberculosis programmes. Geneva: WHO 28 April.
 16. Fine, P.E.M. BCG vaccination against tuberculosis and leprosy. 1988. Brit. Med. Bull. 44:691-703.
 17. Young, R.A., Bloom, B.R., Grosskinsky, C.M., Ivanyi, J., Thomas, D. and Davis, R.W. 1985. Dissection of Mycobacterium tuberculosis antigens using recombinant DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:2583-2587.
 18. Jacobs, W.R., Snapper, S.B., Tuckman, M. and Bloom, B.R. 1989. Mycobacteriophage system. Rev. Infect. Dis. II suppl 2:S404-S410.
 19. Benjamin, R.G. and Daniel, T. 1982. Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) of antibody to Mycobacterium tuberculosis antigen 5. Am. Rev. Respir. Dis. 126:1013-1016.
 20. Jackett, P.S., Bothamley, G.H., Batra, H.V., Mistry, A., Young, D.B. and Ivanyi, J. 1988. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 26:2313-2318
 21. Espitia, C. Cervera, I., Gonzalez, R. and Mancilla R. 1989. A 38-kD M. tuberculosis antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. Clin. Exp. Immunol. 77:373-377.
 22. Sada, E., Lavenia, D., Ferguson, E. and Daniel, T.M. 1990. An Elisa for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000-Da native antigen of Mycobacterium tuberculosis. J. Infect. Dis. 162:928-931.
 23. Lupi, E., Sánchez, G. y Castillo, U. 1972. Reactividad cutanea al PPD y a los antígenos de micobacterias atípicas (kansassi, avium y fortuitum) en pacientes con arteritis inespecífica. Archivos del Instituto de Cardiología de México. 42:717-725.
 24. Rubina, J.P., Piessens, W.F., Davis, J.R. and Dyann, F.W.A. 1989. Cloned DNA fragment for identification of Mycobacterium tuberculosis. Rev. Infect. Dis. II suppl. 2: S411-419.
 25. Tenover, F. C. 1988. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infection diseases. Clin. Microbiol. Rev. 1:82-101.

26. Eisenach, K.D., Crawford, J. T. and Bates, J. 1988. Repetitive sequences as probes for Mycobacterium tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 26:2240-2245.
27. Hermans, P.W., Van Sooligen, D., Dale, J.W., Schuitema, A. R.J., McAdam, R.A., Catty, D. and Van Embden, J. 1990. Insertion element IS986 from Mycobacterium tuberculosis: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 28:2051-2058.
28. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scarf, S.J., Hoguchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with the thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.
29. Brisson-Noel, A., Gicquel, B., Lecossier, D., Levy-Frebault, V., Nassif, X. and Hance, A.J. 1989. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet ii:1069-1071.
30. Pao, C.C., Tyen, B., You, J., Maa, J., Fiss, E.H. and Chang, C. 1990. Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA amplification. J. Clin. Microbiol. 28:1877-1880.
31. Sjöbring, U., Mecklenburg, M., Andersen, A.B. and Miörner, H. 1990. Polymerase chain reaction for detection of M. tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 28:2200-2204..
32. Chase, M.W. 1945. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 59: 134-135.
33. Lurie, M.B. 1942. Studies on the mechanisms of immununity in tuberculosis. The fate of tubercle bacilli ingested by mononuclear phagocytes derived of normal and immunized animals. J. Exp. Med. 75: 247-267.
34. Mackannes, G.B. 1964. The immunological basis of acquired cellular resistance. J. Exp. Med. 120: 105-120.
35. Collins, F.M., Congdon, C.C. and Morrison, N.E. 1975. Growth of Mycobacterium bovis (BCG) in T-lymphocyte depleted mice. Infect. Immun. 11:57-64.
36. Lefford, M.J. 1975. Transfer of adoptive immunity to tuberculosis in mice. Infec. Immun. 11:1175-1181.
37. Lester, C.F., and Atwell R.J. 1958. The tuberculin skin reactive in active pulmonary tuberculosis. Am. Rev. Tuberc. 78:399-402.
38. Trnka, L., and Skvor, J. 1979. Direct migration inhibition test with leukocytes as indicator of mycobacterial antigens

- in the human body. *Tubercle*. 60:49-53.
39. Lenzini, L., Rottoli, P. and Rottoli, L. 1977. The spectrum of human tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 27:230-237.
 40. Heilman, K., Brehmer, W. and Schraegle, H. 1975. Fatal course of generalized BCG histiocytosis in congenital immune deficiency. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 100: 2604-2610.
 41. Hahn, H., and Kaufmann, S.H.E. 1981. The role of cell-mediated immunity in bacterial infections. *Rev. Infect. Dis.* 3: 1221-1250.
 42. Collins, F.M. 1982. The immunology of tuberculosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 125 (suppl). 3:42-49.
 43. Rook, G.A.W., Champion, B.R., Steele, J., Varey, A. M. and Stanford, J.L. 1985 I-A restricted activation by T cell lines of anti-tuberculosis activity in murine macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 59:414-420.
 44. Kaufmann, S.H.E. 1988. CD8⁺ T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol Today* 9:168-174.
 45. De Libero, G., Flesh, I. and Kaufmann, S.H.E. Mycobacterium reactive Lyt-2⁺ cell. 1988. *Eur. J. Immunol.* 18:59-66.
 46. Kumararatne, D.S., Pithie, A.S., Drysdale, P., Gaston, J.S. H., Kiessling, R., Iles, P.B., Ellis, C.J. Innes, J. and Wise, R. 1990. Specific lysis of mycobacterial antigen-bearing macrophages by class II MHC-restricted T cell lines in healthy donors or patients with tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 80:314-323.
 47. O'Brien, R.L., Happ, M.P., Dallas, A.M. Palmer, E., Kubo, R. and Born, W.K. 1989. Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor $\gamma\delta$ by an antigen derived from Mycobacterium tuberculosis. *Cell* 57:667-674.
 48. Janis, E.M., Kaufmann, H.E., Schwartz, R.H. and Pardoll, D. M. 1989. Activation of T cells in the primary immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Science.* 244:713-716.
 49. Born, W. Happ, M. P., Dallas, A., Reardon, C., Kubo., Shinnick, T., Brennan, P. and O'Brien. 1990. Recognition of heat shock proteins and T cell function. *Immunol. Today.* 11:40-43
 50. Reggiardo, Z., and Middlebrook, G. 1974. Failure of passive serum transfer of immunity against aerogenic tuberculosis in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145:173-175.
 51. David, H.L. 1990. The spectrum of tuberculosis and leprosy.

What can be the the significance of specific humoral response?. Res. Microbiol. 141:191-205

52. Oldestone, M.B. 1987. Molecular mimicry and autoimmune disease. Cell. 50:819-820
53. Shoenfeld, Y. and Isenberg, D.A. 1988. Mycobacteria and autoimmunity. Immunol. Today 9:178-182.
54. Thorns, C.J. and Morris, J.A. 1985. Common epitopes between mycobacterial and certain host tissue antigens. Clin. Exp. Immunol. 61:323-328.
55. Shonfeld, Y., Vilner, Y., Coates, A.R.M., Rauch, J., Lavie, G., Shaul, D. and Pinkhas, J. 1986. Monoclonal anti-tuberculosis antibodies react with DNA, and monoclonal anti-DNA autoantobodies react with M. tuberculosis. Clin. Exp. Immunol. 66:255-261.
56. Pearson, C.M. 1956. Development of arthritis peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvant. Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 91:95-101.
57. Pearson, C.M. and Wood, F.D. 1956. Passive transfer of adjuvant arthritis by lymph or spleen cells. J. Exp. Med. 120:547-560.
58. Van Eden, W., Thole, J. E. R., van der Zee, R., Noordzij, A., Van Embden, J.D., Hensen, E.J. and Cohen, I.R. 1988. Cloning of the mycobacteria epitope recognized by T-lymphocytes in adjuvant arthritis. Nature (Lond) 331:171-174.
59. Holoshitz, J., Klajman, A., Druker, I., Lapidot, Z., Yaretzky, A., Frenkel, A., Van Eden, W. and Cohen, R. 1986. T lymphocytes from rheumatoid arthritis patients show augmented reactivity to a fraction of mycobacterium cross-reactive with cartilage. Lancet 2:305-309.
60. Billingham, E. J., Carney, S., Butler, R. and Colston, M.J. 1990. A mycobacterial 65-kD heat shock protein induce antigenic-specific suppression of adjuvant arthritis, but is not itself arthritogenic. J. Exp. Med. 171:339-334.
61. Van Den Broek, M. F., Hogervorst, E.J.M., Van Bruggen, M.C.J., Van Eden, W., Van Der Zee, R. and Van Den Breg, W.B. 1989. Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat shock protein. J. Exp. Med. 170:449-446.
62. Muller, I. and Kaufmann, S.H.E. 1985. Antigen-reactivity pattern of T-cell hybridomas from Mycobacterium bovis BCG infected mice. Infect. Immun. 49:838-840.
63. Rooney, J.J., Croceo, J.A. and Kramer, S. 1976. Further

observations on tuberculin reactions in active tuberculosis.
Am. J. Med. 60:517-522.

64. Watson, S.R. and Collins, F.M. 1980. Development of suppressor T-cells in mice heavily infected with mycobacteria. Immunol. 39:367-373.
65. Jaffe, M.I. and Rabson, A.R. 1981. Suppression of L.I.F. production but not blastogenesis in patients with tuberculous meningitis. Clin. Exp. Immunopathol. 18:245-253.68
66. Ellner, J.J. 1978 Suppressor adherent cells in humans tuberculosis. J. Immunol. 121:2573.
67. Wade, A.A., Mendelsohn, D. and Rabson, A.R. 1983. Characterization of suppressor cell-activating factor (SCAF) released by adherent cells treated with M. tuberculosis. J. Immunol. 130:2266
68. Parra, C., Montaña, L.F., Huesca, M., Rayon, I., Willms, K. and Goodsaid, F. 1986. Inhibition of mitogenesis induced by Phytohemagglutinin and Lens Culinaris lectin and adherent cells supernants treated with protein extract of M. tuberculosis. Infect. Immun. 309:313-317.
69. Kaplan, G., Ghandi, R., Weinstein, D.E., Levis, W.R., Patarroyo, M.E., Brennan, P.J. and Chon, Z.A. 1987. Mycobacterium leprae antigen-induced suppression of T cell proliferation in vitro. J. Immunol. 138:3034-3038.
70. Sibley, L.D., Hunter, S.W., Brennan, P.J. and Krahenbuhl, J.L. 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. Infect. Immun. 56:1232-1236.
71. Britton, W.J., Hellqvist, L., Basten, A. and Ingkis, A.S. 1986. Immunoreactivity of a 70 kD protein purified from Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin by monoclonal antibody affinity chromatography. J. Exp. Med. 164:695-708.
72. DeBruyn, J., Bosmans, R., Turner, M., Maurice, W., Nyabenda, J., Van Vooren, J.P., Falmagne, P., Wiker, H.G., and Harbor, M. 1987. Purification, partial characterization, and identification of skin-reactive protein antigen of Mycobacterium bovis BCG. Infect. Immun. 55:245-252.
73. Young, D., Kent, L. Rees, A., Lamb, J., and Ivanyi, J. 1986. Immunological activity of a 38-Kilodalton protein purified from Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun. 54:177-183.
74. Espitia, C. and Mancilla, R. 1989. Identification, isolation and partial characterization of M. tuberculosis glycoprotein antigens. Clin. Exp. Immunol. 77:373-377.

75. Daniel, T.M., and Andersen, P.A. 1978. The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of Mycobacterium tuberculosis antigen. *5.Am. Rev. Res. Dis.* 117:533-539.
76. DeBruyn, J., Huygen, K., Bosmans, R., Fauville, M., Lippens, R., Van Vooren, J., Falmagne, P., Weeckx, M., Wiker, H.G., Harboe, M. and Mireille, T. 1987. Purification, characterization and identification of 32 kDa antigen of Mycobacterium bovis BCG. *Microb. Patho.* 2:351-366.
77. Garsia, R.J., Hellqvist, L., Booth, R.J., Radford, A.J., Britton, W.J., Astbury, I, Trent, R.J. and Basten, A. 1989. Homology of the 70-kilodalton antigen from Mycobacterium leprae and Mycobacterium bovis with the Mycobacterium tuberculosis 71-kilodalton antigen and with the conserved heat shock protein 70 of eucaryotes. *Infect. Immun.* 57:204-212.
78. Shinnick T.M. 1987. The 65-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis. *J. Bacteriol.* 169:1080-1088.
79. Garbe, T., Jones, C., Charles, I., Dougan, G. and Young, D. 1990. Cloning and characterization of the aroA gene from M. tuberculosis. *J. Bacteriol.* 172:6774-6782.
80. Andersen, A.B. and Hansen, E.B. 1989. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.* 57:2481-2488.
81. Borremans, M., De Wit, L., Volckaert, G., Ooms, J., DeBruyn, J., Huygen, K., Van Vooren, J., Stelandre, M., Verhofstad, R and Content, J. 1989. Cloning, sequence determination and expresion of a 32 Kilodalton-protein gene of Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immuno.* 57:323-313
82. Thangaraj, H.S., Lamb, F.I., Davis, E.O., Jenner, P.J. Jeyakumar, L.H. and Colston, M.J. 1990. Identification, sequencing and expression of Mycobacterium leprae superoxide dismutase a major antigen. *Infect. Immun.* 58:1937-1942.
83. Ashbridge, K.R., Prestidge, R.L., Booth, R.J. and Watson, J. 1990. The mapping of an antibody-binding region on the Mycobacterium tuberculosis 19 kilodalton antigen. *J. Immunol.* 144:3137-3142.
84. Kingston, A.E., Salgame, P.R., Mitchison, N.A. and Colston, M.J. 1987. Immunological activity of a 14-kilodalton recombinant protein of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Infect. Immun.* 55:3149-3154.
85. Young. D., Lathigra, R., Hendrix, R., Sweetser, D., Young,

- R. 1988. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 85:4267-4270.85.
86. Mehlert, A., and Young, D.B. 1989. Biochemical and antigenic characterization of the Mycobacterium tuberculosis 71 Kd antigen a member of the 70 Kd heat-shock protein family. Mol. Microb. 3:125-130..
87. Craig, E.A. The heat shock response. 1985. CRC Crit. Rev. Biochem. 18:239-280.
88. Abou-Zeid, C., Ratliff, T.L.L., Wiker, H. G., Harboe, M., Bennedsen, J. and Rook, G.A.W. 1988. Characterization of fibronectin-binding antigens released by Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG. Infect. Immun. 56: 3046-3051.
89. Huygen, K., Van Vooren, J. P., Turneer, M., Bosmans, R., Dierckx, P. and DeBruyn, J. 1988. Specific lymphoproliferation γ -interferon production and serum immunoglobulin G direct againts a purified 32 kDa mycobacterial antigen (P32) in patients with active tuberculosis. Scand. J. Immunol. 27: 187-194.
90. Worsaae, A., Ljungqvist, L., Haslov, K., Heron, I. and Bennedsen, J. 1987. Allergenic and blastogenic reativity of three antigens from Mycobacterium tuberculosis in sensitized guinea pigs. Infect. Immun. 55:2922-2927.
91. Daniel, T.M., Balestrino, E.A., Balestrino, O.C., Davidson, P.T., Debanne, S.M., Kataria, S., Kataria, Y.P., and Scocozza, J.B. 1982. The tuberculin specificity in humans of Mycobacterium tuberculosis antigen 5. Am. Rev. Res. Dis. 126:600-606.
92. Oftung, F., Mustafa, A.S., Husson, R., Young, R.A. and Godal, T. 1987. Human T cell clones recognize two abundant Mycobacterium tuberculosis protein antigens expressed in Escherichia coli. J. Immunol. 138:927-931.
93. Boom, W.H., Husson, R.N., Young, R. A., David, J.R. and Piessens. W.F. 1987. In vivo and In vitro characterization of of murine T-cell clones reactive to Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immunol. 55:2223-2229.
94. Oftung, F., Mustafa, A.S., Shinnick, T.M., Houghten, A.R., Kvalheim, G., Degre, M., Lundin, K.E.A. and Godal, T. 1988. Epitopes of Mycobacterium tuberculosis 65-kilodalton protein antigen as recognized by human T cells. J. Immunol. 141:2749-2754.
95. Kaufmann, S.H.E., Vath, U., Thole, J.E.R., Van Eden, J.D.A. and Emmrich, F. 1987. Enumeration of T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis organisms and specific for the

- recombinant 64 kDa protein. Eur. J. Immunol. 17:351-357.
96. Young, D.B., Ivanyi, J., Cox, J.H. and Lamb, J.R. 1987. The 65 kDa antigen of mycobacteria-a common bacterial protein? Immunol. Today 8:215-219.
 97. Youmans G.P. 1946. A method for determination of the culture cycle and the growth rate virulent human type tubercle bacilli. J. Bact. 51:703-710.
 98. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
 99. Seibert, F.B. 1949. Isolation of three different proteins and two polysaccharides from tuberculin by alcohol fractions Their chemical and biological properties. Am. Rev. Tuberc. 59:86-101.
 100. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randell, R.J. 1954. Protein measurement with Follin phenol reagent. J. Biol. Chem. 26:350-326.
 101. Dubois, M, Gilles, K.A., Hamilton, J.H., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.
 102. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76:4350-4354.
 103. Larralde, C., Montoya, R., Sciutto, E., Diaz, M.L., Govezensky, T. and Coltorti. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigens (Taenia solium, Echinococcus granulosus and Taenia crassiceps) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40:282-290.
 104. Zacharius R.M., Zell, T.E., Morrison J.H. and Woodlock J.J. 1969. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. Anal. Biochem. 30:148-152.
 105. Glass II, W.F., Briggs, R.C. and Hnilica, L.S. 1981. Use of lectin for detection of electrophoretically separated glycoproteins transferred onto nitrocellulose sheets. Anal. Biochem. 115: 219-222.
 106. Parekh, B.S., Metha, H.B., West, M.D. and Montecarlo, R.C. 1985. Preparative elution of proteins from nitrocellulose membranes after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 148:87-93
 107. Medel-Hatving, I. 1982. A simple and rapid method for the

- isolation of peptides from sodium dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 121:215-217.
108. Lamb, F.I., Kingston, A.E., Estrada-G, I. and Colston, M. J. 1988. Heterologous expression of the 65-kilodalton antigen Mycobacterium leprae and murine T-cell responses to the gene product. Infect. Immun. 56:1237-1241.
 109. Higgins, R.C. and Dahmus, M. E. 1970. Rapid visualization of protein bands in preparative SDS polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 93:257-260.
 110. Baenziger, J. U. and Fiete, D. 1979. Structural determinants of concanavalin A specificity for oligosaccharides. J. Biol. Chem. 24:2400-2407.
 111. Dulaney, J.T. 1970. Factors affecting lectin-glycoprotein binding. Anal. Biochem. 99:256-267.
 112. Goren, M. 1982. Immunoreactive substances of mycobacteria. Am. Rev. Respir. Dis. 125:50-69.
 113. Daniel, T.M., and Janicki, B. 1978. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. Microbiol. Rev. 42:84-113.
 114. Crowle, A. J. 1988. Immunization against tuberculosis What Kind of vaccine? Infect, Immun. 56 (suppl) 11:2769-2773.
 115. DeBruyn, J., Bosmans, R., Nyabenda, J. and Van Vooren, J.P. 1989. Effect of zinc deficiency on the appearance of two immunodominant protein antigens (32-kDa and 65 kDa) in culture filtrates of mycobacteria. J. Gen. Microbiol. 135:79-84.
 116. Closs, O., Harboe, M., Axelsen-Christensen, H. and Magnussen, M. 1980. The antigens of Mycobacterium bovis strain BCG, studied by cross-immuno-electrophoresis: a reference system. Scand. J. Immunol. 12:249-263.
 117. Abou-Zeid, C., Smith, I., Grange, J.M., Ratliff, T.L., Steele, J. and Rook, G.A.W. The secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis and the relationship to those recognized by the available antibodies. J. Gen. Microbiol. 134:531-538.
 118. Morales, E., Eidingler, and Bruce, A.W. 1976. Intracavitary bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. J. Urol. 116:180-183.
 119. Ratliff, T.L., McGarr, J.A., Abou-Zeid, C., Rook, G.A.W, Stanford, J.L., Aslanzadeh, J. and Brown, E.J. 1988. Attachment of mycobacteria to fibronectin-coated surfaces. J. Gen. Microbiol. 134:1307-1313.

120. Aslanzadeh, J., Brown, E.J., Quillin, S.P., Ritchey, J.K. and Ratliff, T.L. 1989. Characterization of soluble fibronectin binding to bacille Calmette-Guérin. *J. Gen. Microbiol.* 135:2735-2741.
121. Froman, G., Switalski, L.M., Speziale, P. and Hook, M. 1987. Isolation and characterization of a fibronectin receptor from Staphylococcus aureus. *J. Biol. Chem.* 262:6564-6571.
122. Peterson, K.M., Baseman, J.B. and Alderete, J.F. 1983. Treponema pallidum receptor binding proteins interact with fibronectin. *J. Exp. Med.* 157:1958-1969.
123. Rizvi, F.S., Ouaisi, M. A., Marty, B., Santoro, F. Capron, A. 1988. The major surface protein of Leishmania promastigotes is a fibronectin-like molecule. *Eur. J. Immunol.* 18:473-476.
124. Ouaisi, M.A., Afchain, D., Capron, A. and Grimaud, J.A. 1984. Fibronectin receptors on Trypanosoma cruzi trypanomastigotes and their biological functions. *Nature* 308:380-382.
125. Ouaisi, M.A. 1988. Role of the RGD sequence in parasite adhesion to host cells. *Parasitology Today.* 4:169-173.
126. Kadival, G.V., Chaparas, S.D. and Hussong, D. 1987. Characterization of serological and cell mediated reactivity of a 38 kDa antigen isolated from Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol.* 139:2447-2451.
127. Andersen, A.B. Yuang, Z., Haslov, K., Vergmann, B., and Bennedsen J. 1986. Interspecies reactivity of five monoclonal antibodies to Mycobacterium tuberculosis as examined by immunoblotting and Enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 23:446-451.58.
- 128 Wilkins, E.G.L., and Ivanyi, J. 1990. Potential value of serology for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Lancet.* 336:641-644.
- 129 Hamburger, J., Lustignam, S., Arap Siongok, T.K., Ouma, J.H. & Mahmoud, A.A.F. 1982 Characterization of a purified glycoprotein from Schistosoma mansoni eggs: specificity stability and the involvement of carbohydrate and peptide moieties in its serologic activity. *J. Immunol.* 128, 1864-1869.
130. Andersen, A. B., Ljungqvist, L. and Olsen, M. 1990. Evidence that protein antigen b of Mycobacterium tuberculosis is involved in phosphate metabolism. *J. Gen. Microbiol.* 136:477-480.

131. Kornfeld, K. and Kornfeld, S. 1976. Comparative aspects of glycoprotein structure. *Ann. Rev. Biochem.* 45:217-237.
132. Lechner, J. and Wieland, F. 1989. Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58:173-194.
133. García-Ortigoza, E., López de Arcila, C., Pérez-Fernández, L y Arcila-Castaño, L.E. 1987. Evaluación de la respuesta inmune en pacientes pediátricos con tuberculosis pulmonar. *Memorias VII Cong. Nac. Inmunol. Soc. Mex. Inmunol. México.* 36, 120.
134. Watson, J.D. 1989. Leprosy: understanding protective immunity. *Immunology Today* 10:218-221.
135. Shinnick, T.M., Sweetser, D., Thole, J., Van Embden, J. and Young, R.A. 1987. The aetiological agent of leprosy and tuberculosis share an immunoreactive protein antigen with the vaccine strain Mycobacterium bovis BCG. *Infect. Immun.* 56:1344-1351.
136. Gillis, T.P., and Job, C.K. 1987 Purification of the 65 KD protein from Mycobacterium gordonae and use in skin test response to Mycobacterium leprae. *Int. J. lepr. Other Mycobact. Dis.* 55:54-57.
- 137 Bardana, Jr. E.J., McClatchy, J.K., Farr, R. and Minden, P. 1973. Universal occurrence of antibodies to tubercle bacilli in sera from non-tuberculous and tuberculous individuals. *Clin. Exp. Immunol.* 13:65-77.

VIII. APENDICES

Clinical and Experimental Immunology

EDITOR Dr R A Thompson

Regional Immunology Laboratory, East Birmingham Hospital, Bordesley Green East, Birmingham, B9 5ST

ASSOCIATE EDITOR Professor P J Lachmann

Molecular Immunopathology Unit, MRC Centre, Hills Road, Cambridge, CB2 2QH

Please reply

East Birmingham Hospital
P O Box 1696
Bordesley Green
BIRMINGHAM B9 5PZ - UK
Tel: 021-766 8125
Fax: 021-766 6879

Dr. Raul Mancilla
Departamento de Inmunologia
Instituto de Investigaciones Biomedicas
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Apartado Postal 70-228, 04510
Mexico, D.F.

17th June 1991

Dear Dr. Mancilla,

RE: HIGH ANTIBODY LEVELS TO THE MYCOBACTERIAL ETC.. (MS 9218B)

The above manuscript by Clara Espitia, Edda Sciutto, Oscar Botasso et al which you kindly submitted to the journal has now been reviewed by members of the Editorial Board.

Your manuscript is unacceptable in its present form, but we are willing to reconsider it when it is rewritten according to the referees' reports.

When resubmitting the manuscript, please do so in triplicate, with any alterations made UNDERLINED in two of the copies.

Yours sincerely,

Vicki Johnson
Editorial Assistant

RP R.A. Thompson
Editor

1.
Comments for transmission to the authors should be typed on these self duplicating sheets. Please return white and pink sheets to the Editorial Office and retain the yellow sheet for your own file. Do not sign.

CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY

TITLE: MS 9218B "High antibody levels to the etc..."

AUTHOR: C.Espitia et al

COMMENTS: This is a good paper but there are some points which the authors should check.

1. Leprosy classification. Were all 12 tuberculoid leprosy patients really classified as TT? This is a reasonably rare classification in some areas. Often the majority of tuberculoid leprosy patients are BT (borderline tuberculoid). Similarly, of 43 lepromatous leprosy patients, some would be expected to be borderline lepromatous (BL) by the clinical histological criteria proposed by Ridley and Jopling.
2. Assessment of antibodies to antigens of Mycobacterium leprae is not necessary for distinguishing between tuberculoid and lepromatous patients. They can easily be distinguished clinically, with added back-up from skin slit smears for assessing organism numbers in lesions and from the histology of the lesions. The authors should concentrate their discussion on the fact that antibodies to the 30.31 kd fibronectin-binding protein of M.leprae have not previously been detected since this antigen appears to be absent from extracts of M.leprae prepared by ultra sonication of whole organisms (as stated in the last sentence of the discussion).

MS 9218B "High antibody levels to the etc....."

C. Espitia et al

The title indicates precisely the subject of this paper. The paper is interesting, and the use of a fibronectin-biotin conjugate to detect fibronectin (Fn) binding proteins is new and quite elegant. The isolation of the 30-31kD Fn-binding proteins from culture fluid is also obtained by a new technique. The demonstration of antibodies to these Fn-binding proteins in tuberculosis and leprosy is clearly documented, but this observation is not new.

Before publication, the manuscript requires in my view revision on several points:

Summary, p. 7: "None of the tuberculoid leprosy and control sera gave significant binding" to the Fn-binding 30-31kD proteins. This description corresponds to the statement at the bottom of p. 10 concerning Fig. 1. It is in my view not correct and has to be revised. In Fig. 1 we see distinct binding to the doublet in the 30-31kD area by most of the sera. I accept, however, that visually from Fig. 2 and Fig. 3 binding is stronger with sera from patients with pulmonary tuberculosis and lepromatous leprosy.

Summary 1. 12 "Fn 30-31 was purified to homogeneity....." The purity of this preparation is illustrated in Fig. 4. Electrophoresis was an essential step in the purification, and homogeneity as tested by electrophoresis (in lane C) is thus to be expected if the electrophoresis procedure is of high quality. Lane D is fine as evidence of homogeneity, provided that the anti-*M.tuberculosis* antiserum shows many bands in blots of whole *M.tuberculosis* culture fluid. This should be demonstrated in the paper as there is no formal proof of homogeneity at present.

Towards the end of the Summary it is stated that the Fn-binding antigen has been demonstrated in culture filtrates of *M.bovis* BCG and *M.tuberculosis* "but not in sonic extracts of *M.leprae*". This statement is not correct. Antigen 85 was demonstrated by ELISA assays in 3 of 5 *M.leprae* sonicates by Wiker et al. (*Amer. Rev. Respir. Dis.* 1990; 141: 830-838). Concerning other statements in the paper it should also be noted that Wiker et al. demonstrated that antigen 85 (MPB59) is immunogenic *in vivo* inducing antibody formation in armadillos with systemic *M.leprae* infection (*Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 1986; 81:307-314).

Immunohistochemistry - p. 9 and Fig. 6. The figure is very nice, but it should certainly be shown that the results are negative using the same antibody and procedure on biopsy material from leprosy lesions containing only few bacilli, preferably in a reactional state.

In the discussion it is stated on p. 14.: "A specificity of 0.97 and a sensibility of 0.63 were obtained by ELISA with sera of patients with pulmonary tuberculosis." I do not understand this statement concerning specificity when it is demonstrated in this very paper that antibodies to the Fn-binding proteins occur in tuberculosis as well as in lepromatous leprosy. The Fn 30-31 proteins, which correspond to components of the antigen 85 complex, have been known for years to be widely crossreacting

proteins present in several species of mycobacteria. This implies that antibodies to these proteins may be rather sensitive indicators of mycobacterial infection, but they would not be expected to be specific for a particular mycobacterial disease. Further, statements concerning specificity relating to mycobacterial disease compared with other diseases should be based on studies with control sera from patients with other chronic infections.

HIGH ANTIBODY LEVELS TO THE MYCOBACTERIAL FIBRONECTIN-BINDING
ANTIGEN OF 30-31 KD IN TUBERCULOSIS AND LEPROMATOUS LEPROSY.

Clara Espitia, Edda Sciutto, Oscar Botasso*,
Roberto González-Amaro[†], Rogelio Hernández-Pando
and Raúl Mancilla.

Departamento de Inmunología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
México, D. F.

Facultad de Medicina
Universidad de Rosario
Argentina*

Facultad de Medicina
Universidad de San Luis Potosí
México[†]

Short title: Antibodies to fibronectin-binding antigens.

Correspondence: Raúl Mancilla, M.D.
Departamento de Inmunología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-228, 04510
México, D.F.

Key words: Mycobacterium tuberculosis, fibronectin,
antigens, ELISA, Immunoblot.

SUMMARY

Imunoblot assays showed that mycobacterial fibronectin-binding antigens are important targets of the humoral immune response in tuberculosis and leprosy. Using culture filtrate antigens of Mycobacterium tuberculosis, significant reactivity with the fibronectin-binding of 30-31 kD (Fn 30-31) was demonstrated in 55.9% of tuberculosis sera and in 56.5% of lepromatous leprosy sera. None of the tuberculoid leprosy and control sera gave significant binding. Reactivity with the fibronectin-binding antigen of 58-60 kD (Fn 58-60) was less conspicuous. The ability to react with fibronectin of the antigens of 58-60 and 30-31 kD was demonstrated by parallel labelling with a fibronectin-biotin conjugate. Fn 30-31 was purified to homogeneity by a two step procedure and used for ELISA. Positive titers were found in 63% of 65 tuberculosis sera and in 60.5% of 43 lepromatous leprosy sera. Antibody titers in lepromatous leprosy sera were higher than in tuberculosis sera. In 2 of 12 tuberculoid leprosy sera and in 2 of 96 control sera borderline positive titers were found. ELISA with purified Fn 30-31 could be useful for the serodiagnosis of tuberculosis and to distinguish the polar forms of leprosy. Our observations indirectly indicate that Mycobacterium leprae posses a highly immunogenic molecule homologous to M. tuberculosis Fn 30-31 which elicits a high antibody response in lepromatous leprosy but not in

tuberculoid leprosy. Up to now this antigen has been demonstrated in culture filtrates of Mycobacterium bovis BCG and M. tuberculosis but not in sonic extracts of M. leprae (Abou-Zeid et al., 1988). In this investigation, direct evidence for the presence of this antigen in M. leprae was obtained by immunochemistry of lepromatous leprosy lesions with a monospecific antibody raised against M. tuberculosis Fn 30-31.

INTRODUCTION

In recent years our understanding of the molecular structure of mycobacteria has greatly advanced due to improved protein purification methods and to the introduction of hybridoma and recombinant DNA technologies (Young et al., 1985). A number of native or recombinant antigens have been isolated to study their roles in immunity. Furthermore, some of these antigens have been sequenced and a search for epitopes involved in antibody and cell-mediated immune responses has been undertaken in some laboratories (Oftung et al., 1988; Andersen & Hansen, 1989). The understanding of the role mycobacterial components play in infectivity and virulence could be as important as the knowledge of their immunologic properties. In this context the recent demonstration of molecules with affinity for fibronectin in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG culture filtrates is an interesting achievement (Abou-Zeid et al., 1988). Fibronectin is a multifunctional molecule abundant in plasma and connective tissues, which interacts with a number of molecules including IgG, C1q, collagen, gelatin, and surface cell receptors (for a review see Proctor, 1987). Mycobacteria could use fibronectin to escape immune detection or as a bridge to interact with molecules and cells of the host. The potential relevance of mycobacterial fibronectin-binding antigens prompted this investigations aimed to assess their

role in humoral immunity in tuberculosis and leprosy. These antigens were first identified in M. tuberculosis culture filtrates and then, in paired immunoblots, their recognition by test sera was investigated. In addition, the major fibronectin-binding antigen, a doublet protein of 30-31 kD (Fn 30-31), was isolated and used as an ELISA reagent.

MATERIALS AND METHODS

Bacterium and antigens

Mycobacterium tuberculosis strain H37/Rv was cultured until it formed a surface pellicle (6-8 weeks) on the Proskawer and Beck synthetic medium. Antigens for immunoblot were obtained by filtration of the culture medium, first through a Whatman No. 3 filter and then consecutively through filters of 1.2, 0.45 and 0.22 μ (Millipore Corp., Bedford, MA). Antigens were precipitated with 90% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.

Sera

Sera from 65 adults with pulmonary tuberculosis were obtained from various medical centers in Mexico City. Diagnosis was established by smear and/or culture of sputum. Twenty five patients had received anti-tuberculous chemotherapy for at least six months. Serum was obtained from the remaining patients before initiating treatment. A total of 55 leprosy sera were obtained. Thirty one came from patients assisting to Hospital Carrasco in Rosario, Argentina and 26 from Mexican individuals living in the San Luis Potosi area. In accordance with established criteria (Ridley & Jopling., 1966), 43 cases were classified as lepromatous leprosy (LL) and 12 as tuberculoid leprosy (TT). None of the leprosy patients were BCG vaccinated or had tuberculosis at the time

of serum collection. All but seven LL patients were receiving single drug therapy with diamino diphenyl sulphone. Five of the twelve TT patients were receiving a similar treatment. Sera were obtained from 9 asymptomatic individuals living in close contact with patients with LL. Control serum was obtained from 96 healthy adults.

Identification of fibronectin-binding antigens.

Fibronectin was purified from human plasma by affinity chromatography using gelatin coupled to cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) as described elsewhere (Rouslathi et al., 1982). Purified fibronectin was conjugated to biotin and used for detection of fibronectin-binding antigens. Briefly, mycobacterial proteins were separated by PAGE-SDS under reducing conditions in a discontinuous buffer system (Laemmli, 1970) on slab gels of 10% of acrylamide. Gels were mounted in an electrotransference chamber (Idea Scientific, Corvallis, PA) and transferred to nitrocellulose sheets (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) according with the method of Towbin, Staehelin & Gordon (1979). Unbound sites on the paper were blocked with 3% BSA in PBS-Tween 20. Strips were incubated with the biotin-fibronectin conjugate for 1 h at 37°C. After rinsing, strips were exposed to streptavidine conjugated to horseradish peroxidase (Zymed laboratories Inc. San Francisco, CA) for 90 min to reveal bound fibronectin.

Peroxidase was revealed with H_2O_2 and 4-chloro-1-naphtol for 15 min.

Immunoblot

Antigens were electrophoretically separated and transferred into nitrocellulose as described above. After blocking unbound sites on the paper with 3% BSA, strips were separately incubated with test sera diluted 1:10 in PBS-Tween 20 for 3 h at room temperature. To reveal bound IgG antibodies, strips were incubated with Protein A labelled with horseradish peroxidase (Sigma) for 90 min. Peroxidase was revealed as above.

Purification of Fn 30-31 from Mycobacterium tuberculosis culture filtrates.

Fn 30-31 was isolated from culture filtrates precipitated with 90% $(NH_4)_2SO_4$ in two steps. First, whole antigens were brought to pH 5. The supernatant obtained from this precipitation was passed through a Concanavalin A-Sepharose 4B column (Pharmacia, Upsala Sweden). PAGE-SDS of the unbound fraction showed, among other minor bands, a thick 30-31 kD band. Four mg of this fraction were applied to a preparative slab gel. After staining with 4 M sodium acetate, a strip containing the 30-31 kD band was excised and eluted in a buffer of 6 M urea, 50 mM K_2HPO_4 and 20 mM EDTA, pH 7. The

purity of the antigen obtained was assessed by PAGE-SDS and immunoblot with biotin-conjugated fibronectin and with a hyperimmune anti-M. tuberculosis antiserum raised in rabbits.

ELISA with purified Fn 31-30

Sera were processed in one session and included two replicates per each serum. Immulon II microtitre plates (Dynatech Industries, McLean, VA) were used. Wells were sensitized with 0.5 µg of antigen in 100 µl carbonate buffer, pH 9.6 at 37°C for 5 h. Blocking of possible remaining active sites on the plastic was done with 1% BSA in PBS for 1 h at 37°C. Test sera diluted 1/1000 were applied to the wells for 1 h at 37°C. After rinsing, Protein A labelled with horseradish peroxidase was added to reveal bound antibodies. Peroxidase was developed with 50 µl of 1 mg/ml orthophenyldiamine and 0.03% H₂O₂ in citrate buffer 0.1 M, pH 4.5, for 4 min at room temperature. The reaction was stopped with 200 µl of 1N sulphuric acid. Optical density readings at 492 nm were done in a Behring automatic ELISA processor. Statistical analysis was carried out by the Mann-Whitney-Wilcoxon Test. (Statgraphics V 1.1, Statistical Graphics Co.).

Immunohistochemistry of lepromatous leprosy lesions

For these studies a polyclonal antibody was obtained as follows. The unbound fraction obtained by Concanavalin A

affinity chromatography was preparatively transferred into nitrocellulose. The 30-31 kD band was excised, treated with dimethyl sulfoxide as described elsewhere (Abou-Zeid et al., 1987), emulsified in incomplete Freund's adjuvant and injected subcutaneously into the inguinal regions of Balb/C mice. Each mice received two weekly subcutaneous injections of about 5 µg of antigen and after two weeks a booster intraperitoneal injection of antigen in saline was applied. IgG isolated from sera in an Affi-Gel-Protein A MAPS-II column (Bio-Rad) was conjugated to biotin. The antibody obtained proved to be monospecific since it reacted only with the 30-31 kD band on immunoblots of whole culture filtrates (not shown). Skin biopsies were obtained from three patients with LL, frozen in liquid nitrogen and sections taken in a cryostat. After brief fixation in cold acetone sections were exposed to the anti-Fn 30-31 biotin-conjugated antibody for 30 min. After rinsing, sections were incubated with streptavidin labelled with peroxidase. Peroxidase was revealed with 3,3-diaminobenzidine (Sigma). A skin biopsy fixed in 10% formalin and included in paraffin was similarly treated after dewaxing.

RESULTS

Identification of fibronectin-binding antigens in 6 week-old cultures of Mycobacterium tuberculosis.

Isolation of fibronectin from fresh human plasma was successful with a single 200 kD Coomassie blue stained band seen on PAGE-SDS reducing gels of the material eluted from the gelatine-sepharose column (not shown). The migration pattern of fibronectin was not altered by conjugation to biotin (not shown). On blotted 6-week-old culture filtrates the fibronectin-biotin conjugate invariably labelled with high intensity an abundant doublet protein of 30-31 kD and with lesser intensity two minor bands of 58 and 60 kD (Fig. 1, Fn).

High antibody binding to the fibronectin-binding antigen of 30-31 kDa in tuberculosis and lepromatous leprosy demonstrated by immunoblot.

Antibody recognition of fibronectin-binding antigens was assessed by aligning strips incubated with the fibronectin-biotin conjugate and with test sera. Results are shown on Table I.

Control sera (Fig. 1).- Binding to Fn 30-31 and to Fn 58-60 was absent from most sera and when present it ranged from weak to moderate.

Pulmonary tuberculosis (Fig. 2).- Weak to intense reactivity with Fn 58-60 was observed in about half of sera. Significant reactions (moderate to very intense) with Fn 30-31 were seen with 56.3% of sera. Reactivity seems to be higher in sera of treated patients.

Lepromatous leprosy (Fig. 3).- Moderate to intense reactivity with Fn 58-60 was observed with 30.1% of sera. Moderate to very intense binding to Fn 30-31 was detected in 56.5% of sera. In sera taken before treatment overall band reactivity was very high and binding to Fn 30-31 was very intense in all 8 sera. In sera of the 35 patients treated with diamino diphenyl sulphone overall band reactivity was much less but intense to very intense binding to Fn 30-31 remained in about half of such sera.

Tuberculoid leprosy (Fig. 3).- Moderate to intense reactivity with Fn 58-60 was detected in 41.6% of sera. There was no significant reactivity with Fn 30-31.

Contacts of lepromatous leprosy patients (Fig. 3).- Moderate to very intense reactions with Fn 58-60 were detected in 44.4% of sera. There was no significant binding to Fn 30-31 in these sera.

Purification of Fn 31-30

Fig.4 shows the steps followed in the isolation procedure. In Lane A, a Coomassie blue stained PAGE-SDS gel shows the protein profiles of the starting material which were

filtrates of 6 week-old cultures precipitated with 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. In the material unbound to the Con A column there was a thick 30-31 kD doublet band among other minor bands (Lane B). In the specifically eluted material a 50-55 kD protein antigen was demonstrated (not shown). These observations were the subject of a previous publication (Espitia & Mancilla, 1989). To get rid of contaminants, Fn 30-31 was eluted with 6 M urea from preparative gels loaded with 4 mg of the enriched fraction shown on Lane B. A single Coomassie blue stained band of 30-31 kD was observed on the gels of the eluted material (Lane C). The purity of the isolated antigen was further assessed by immunoblot with an anti-M. tuberculosis rabbit antiserum. A single 30-31 kD band antigen free of contaminant bands was observed (Lane D). The purified antigen retained the capacity to bind fibronectin on blots (Lane E).

ELISA demonstration of high antibody titers to Fn 31-30 in sera of patients with pulmonary tuberculosis and with lepromatous leprosy.

On Fig. 5 are the results of the ELISA. Antibody titers in sera of patients with pulmonary tuberculosis were significantly higher than in control sera ($p < 0.001$). Taking as cutoff point two standard deviations above the mean optical density of control sera, specificity of the ELISA was

0.97 and sensibility was 0.63. In patients treated with anti-tuberculous chemotherapy for six months or more, antibody titers were significantly higher than in untreated patients ($p < 0.001$). In sera of patients with LL titers were also significantly higher than in control sera ($p < 0.001$). Differences were not found to be significant when comparing titers of tuberculosis and LL sera ($p = 0.17$). In contrast to that observed in tuberculosis, in LL treatment was associated with a sharp decrease in antibody titers to Fn 30-31. Antibody titers of 12 TT sera and of 9 sera of healthy individual living in close contact with LL patients were not different from those of healthy control sera.

Demonstration of an antigen homologous to Mycobacterium tuberculosis Fn 30-31 in Mycobacterium leprae by immunohistochemistry of lepromatous leprosy lesions.

In all biopsies examined, the anti-Fn 30-31 antibody labelled many rods within macrophages (Fig. 6). In control slides in which the anti-Fn 30-31 antibody was replaced by an irrelevant antibody or by normal mouse serum labelling was not observed.

DISCUSSION

The aim of this work was to investigate the role of mycobacterial fibronectin-binding antigens in humoral immunity in patients with tuberculosis and leprosy. These antigens were first identified with a fibronectin-biotin conjugate and then, in paired immunoblots, their recognition by test sera was assessed. As shown by Abou-Zeid et al. (1988) in early cultures, 6-week old M. tuberculosis culture filtrates express an abundant 30-31 kD fibronectin-binding band and minor bands migrating in the 58-60 kD range. By immunoblot, significant reactivity with Fn 30-31 was detected in the majority of sera of patients with tuberculosis and LL. Recognition of Fn 58-60 was much less frequent. Fn 30-31 was isolated to carry out ELISA. Purification was accomplished by a simple two step procedure which yielded an homogeneous product with retained fibronectin-binding activity. A specificity of 0.97 and a sensibility of 0.63 were obtained by ELISA with sera of patients with pulmonary tuberculosis. In sera of patients with LL, antibody titers to Fn 30-31 were high even more than in sera of patients with tuberculosis. In contrast, titers in TT sera were not different from those of control sera. Thus, the current observations portray the fibronectin-binding antigen of 30-31 kD as a major target of the antibody response in the two leading mycobacteriosis. Recognition of antigens of similar mass by leprosy and

tuberculosis sera have been reported before but they were not characterized as fibronectin-binding antigens (Rumschlag, Shinnick & Cohen, 1988; Vega-Lopez et al., 1988; Turner et al., 1988). Fn 30-31 could be useful as a reagent in the immunodiagnosis of tuberculosis and to distinguish serologically the polar forms of leprosy. Since LL patients were free of tuberculosis and had not received BCG vaccination, the antibody response to Fn 30-31 would indicate the presence of an antigen in M. leprae cross-reactive with M. tuberculosis Fn 30-31. This is supported by the immunohistochemical demonstration of labelled bacilli in LL lesions using a monospecific antibody against M. tuberculosis Fn 30-31.

The effects of treatment on the antibody response to Fn 30-31 are of interest. In patients with pulmonary tuberculosis, chemotherapy was associated with an increase in antibody titers. Similar observations have been reported before (Turner et al., 1988). A decrease in antigen load with a resulting increase in free antibody could be an explanation for this phenomenon. In contrast to that observed in tuberculosis, in LL treatment was associated with a decrease in antibody titers to Fn 30-31. The effects of treatment on the immunoblot profiles of LL sera were also striking. In LL overall band reactivity was sharply decreased by treatment but intense binding to Fn 30-31 was still present in about half of sera. The persistence of binding to Fn 30-31 as the

sole reactivity of LL sera even after many years of treatment is intriguing. It could be due to incomplete sterilization of lesions by chemotherapy with a persistent, preferential production of Fn 30-31 by the remaining bacilli.

Fn 30-31 is a biologically relevant molecule not only because it binds fibronectin. It corresponds to the BCG 85 complex initially characterized by Closs et al. (1980). This antigen is abundant, accounting for 7% of the protein excreted in the culture medium (De Bruyn et al., 1989). By metabolic labelling studies, Abou-Zeid et al. (1988) have recently characterized Fn 30-31 as a secretion product in cultures of M. tuberculosis and M. bovis BCG. On the other hand, the interaction of whole bacilli with fibronectin coated surfaces (Ratliff et al., 1988) and with soluble fibronectin (Aslanzadeh et al., 1989) as well as preliminary immunogold electronmicroscopy carried out in our laboratory (unpublished observations) suggest that Fn 30-31 is a surface located moiety. The above features could account, at least in part, for the high antibody response to this antigen documented in this work. In leprosy sera this response has probably passed unnoticed since Fn 30-31 seems to be absent from the sonic extracts of M. leprae (Abou-Zeid et al., 1988) which are usually used for antibody detection.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank Mrs. Sofia Fragoso for typing the manuscript.

LITERATURE CITED

- Abou-Zeid, C., Filley, E., Steele, J. & Rook, G. A. W. (1987) A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes in vitro after converting bands cut from Western blots into antigen-bearing particles. J. Immunol. Methods. 98, 5.
- Abou-Zeid, C., Ratliff, T. L., Wiker, H. G., Harboe, M., Bennedsen, J. & Rock, G.A.W. (1988) Characterization of fibronectin-binding antigens released by Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG. Infect. Immun. 56, 3046.
- Andersen, A.B. & Hansen, E.B. (1989) Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun. 57, 2481.
- Aslanzadeh, J., Brown, E. J., Quillin, S. P., Ritchey, J. K. & Ratliff, T. (1989) Characterization of soluble fibronectin binding to bacille Calmette-Guérin. J. Gen. Microbiol. 135, 2735.
- Closs, O., Harboe, M., Axelsen, N. H., Bunch-Christensen, K. & Magnusson, M. (1980) The antigens of Mycobacterium bovis, strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: a reference system. Scand. J. Immunol. 12, 249.
- De Bruyn, J., Bosmans, R., Nyabenda, J. & Van Vooren J.

- (1989) Effect of zinc deficiency on the appearance of two immunodominant protein antigens (32-kDa and 65-kDa) in culture filtrates of mycobacteria. J. Gen. Microbiol. 135, 79.
- Espitia, C. & Mancilla, R. (1989) Identification, isolation and partial characterization of M. tuberculosis glycoprotein antigens. Clin. Exp. Immunol. 77, 378.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227, 680.
- Oftung, F., Mustafa, A.S., Shinnick, T.M., Houghten, A.R., Kvalheim, G., Degre, M., Lundin, K.E.A. & Godal, T. (1988) Epitopes of Mycobacterium tuberculosis 65-kilodalton protein antigen as recognized by human T cells. J. Immunol. 141, 2749.
- Proctor, R.A. (1987) Fibronectin: a brief overview of structure, function and physiology. Rev. Infect. Dis. 9, S317.
- Ratliff, T.L., McGarr, J.A., Abou-Zeid, C., Rook, G.A.W., Stanford, J.L., Aslanzadeh, J. & Brown, E. (1988) Attachment of mycobacteria to fibronectin-coated surfaces. J. Gen. Microbiol. 134, 1307.
- Ridley, D.S., & Jopling W.H. (1966) Classification of leprosy according to immunity. A five group system. Int. J. Lepr. 34, 255.
- Rouslahti, E., Hayman, E. G., Pierschbacher, M. & Engvall, E.

- (1982) Fibronectin: purification, immunological properties and biological activities. *Methods. Enzymol.* 82, 803.
- Rumschlag, H. S., Shinnick, T. M. & Cohen, M. L. (1988) Serological responses of patients with lepromatous and tuberculoid leprosy to 30-, 31-, and 32-Kilodalton antigens of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2200.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350.
- Turner, M., Van Vooren, J., De Bruyn, J., Serruys, E., Dierckx, P. & Yernault, J. (1988) Humoral immune response in human tuberculosis: immunoglobulins G, A, and M directed against the purified P32 protein antigen of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1714.
- Vega-Lopéz, F., Stoker, N. G., Lochniskar, M. F., Dockrell, H. M., Grant, K. & McAdam, K. P. W. J. (1988) Recognition of mycobacterial antigens by sera from patients with leprosy. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2474.
- Young, R. A., Bloom, B. R., Grosskinsky, C.M., Ivanyi, J., Thomas. D. and Davis, R. W. (1987) Dissection of Mycobacterium tuberculosis antigens using recombinant DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 2583.

TABLE I. FREQUENCY (%) AND DEGREE OF BINDING TO FN 58-60 AND FN 30-31 OF TUBERCULOSIS, LEPROSY AND CONTROL SERA.

Degree of Binding	C (n=48)		Tb (n=62)		LL (n=43)		TT (n=12)		Con (n=9)	
	Fibronectin-binding antigens (kD)									
	58-60	30-31	58-60	30-31	58-60	30-31	58-60	30-31	58-60	30-31
No binding	62.5	52	48.3	25.8	55.8	32.5	41.6	25	44.4	22.3
Weak	17	45.8	32.2	17.7	13.9	9	16.6	75	11.1	77.7
Moderate	20.5	2	11.2	27.4	13.9	6	25	0	33.3	0
Intense	0	0	8	20.9	16.2	4	16.6	0	0	0
Very intense	0	0	0	8	0	46.5	0	0	11.1	0

C, control sera; Tb, pulmonary tuberculosis; LL, lepromatous leprosy; TT, tuberculoid leprosy; Con, contacts of lepromatous leprosy patients.

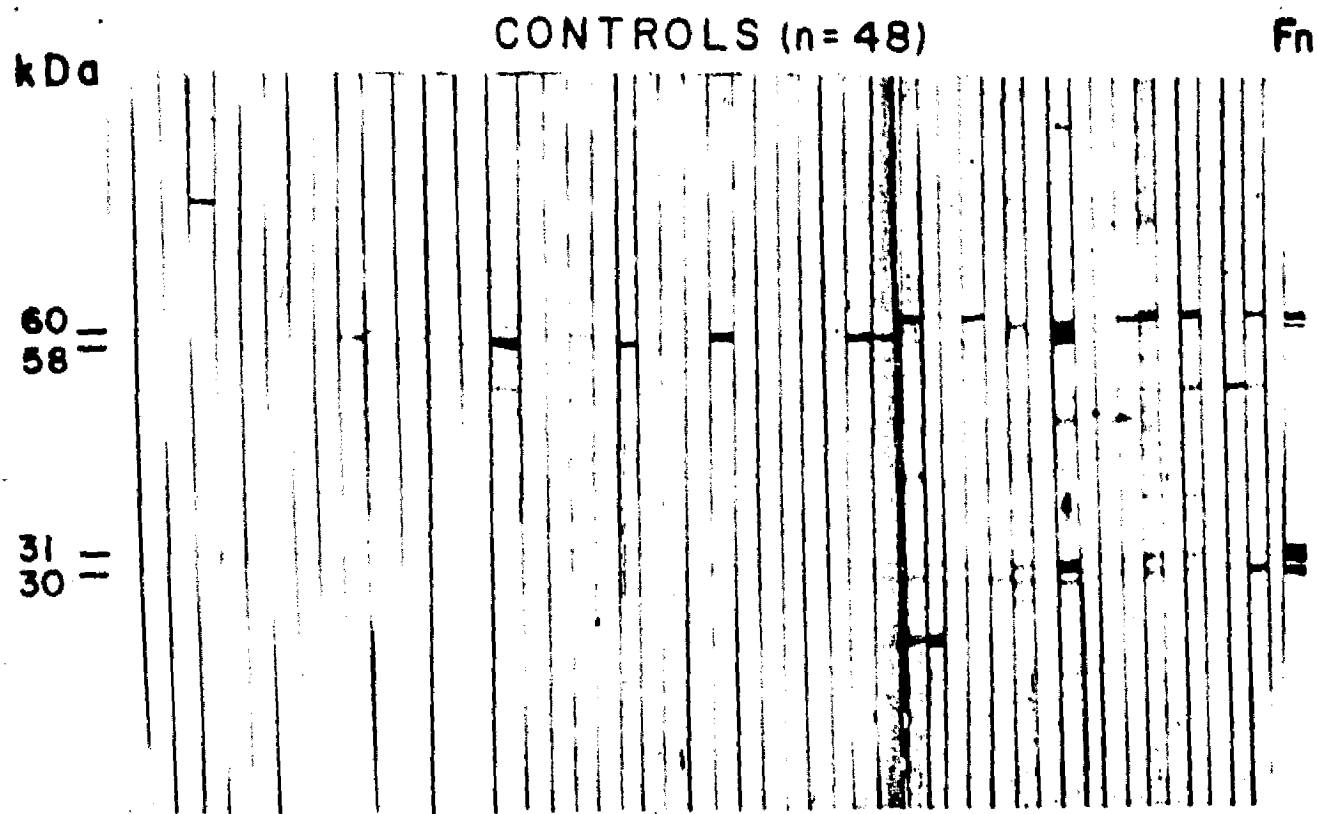


Figure 1.

Immunoblot patterns of anti-M. tuberculosis reactivity in sera from forty eight healthy individuals. Binding to the fibronectin antigens of 58-60 and 30-31 kD is indicated. These antigen were identified by immunoblot with a fibronectin biotin conjugate (Fn).

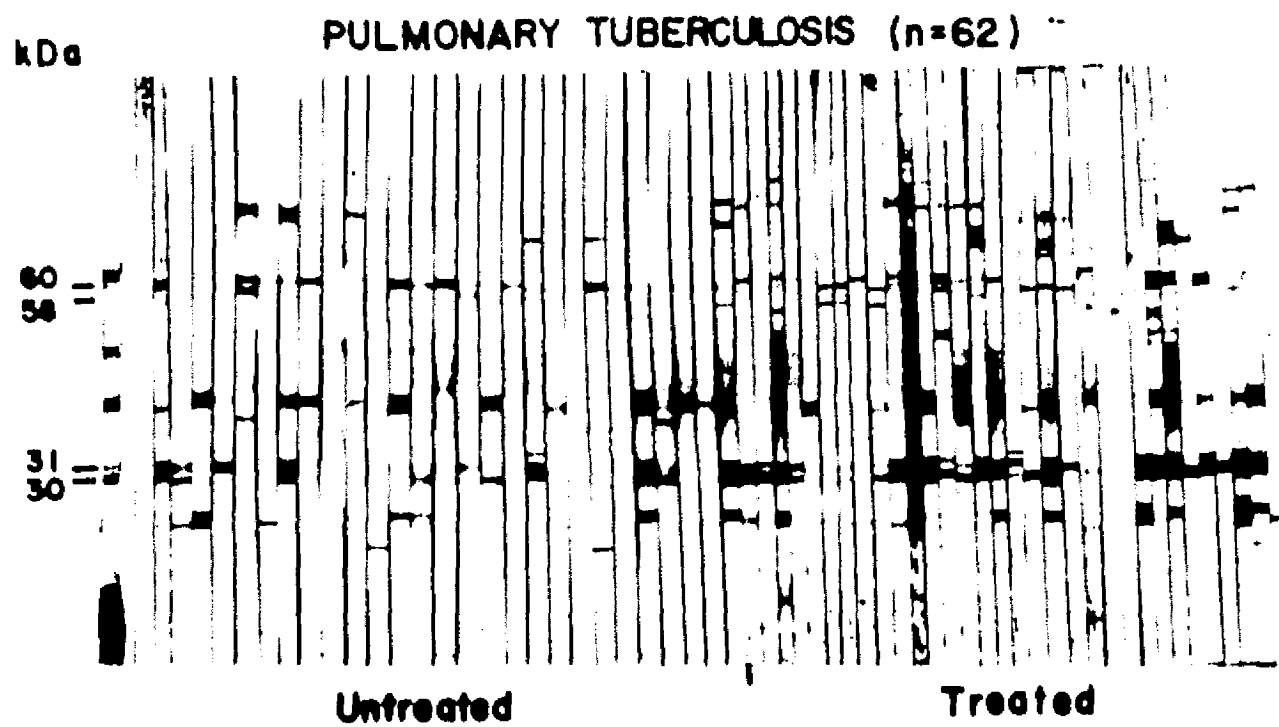


Figure 2.

Immunoblot patterns of anti-*M. tuberculosis* IgG reactivity in sera from patients with treated and untreated pulmonary tuberculosis. Location of fibronectin-binding antigens is indicated.

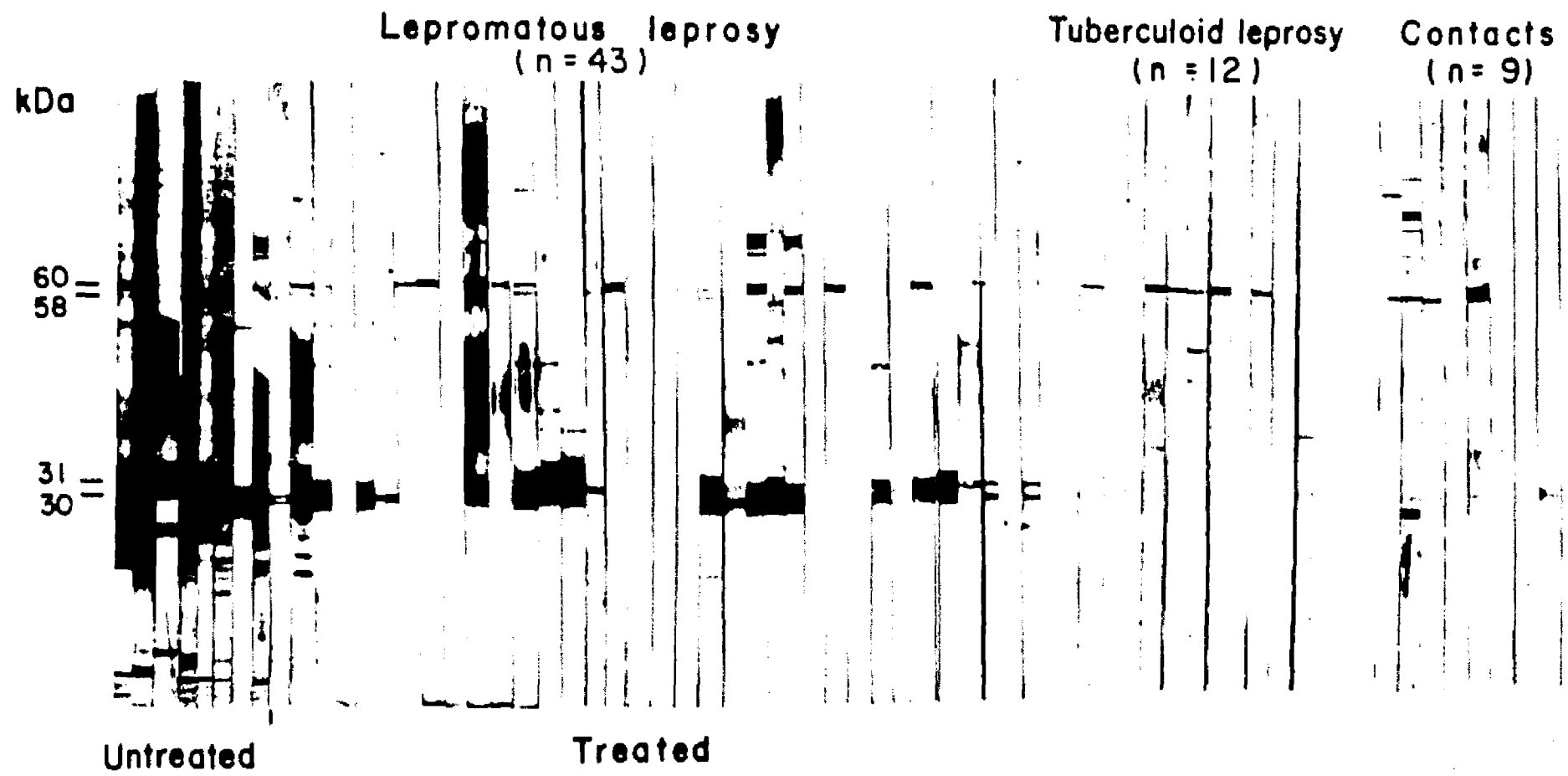


Figure 3.

Reactivity with fibronectin-binding antigens of sera from patients with lepromatous leprosy, tuberculoid leprosy and contacts of patients with lepromatous leprosy. Eight lepromatous leprosy patients had not received treatment (Untreated) and the remaining 35 patients were under single drug therapy with diamino diphenil sulphone (Treated).

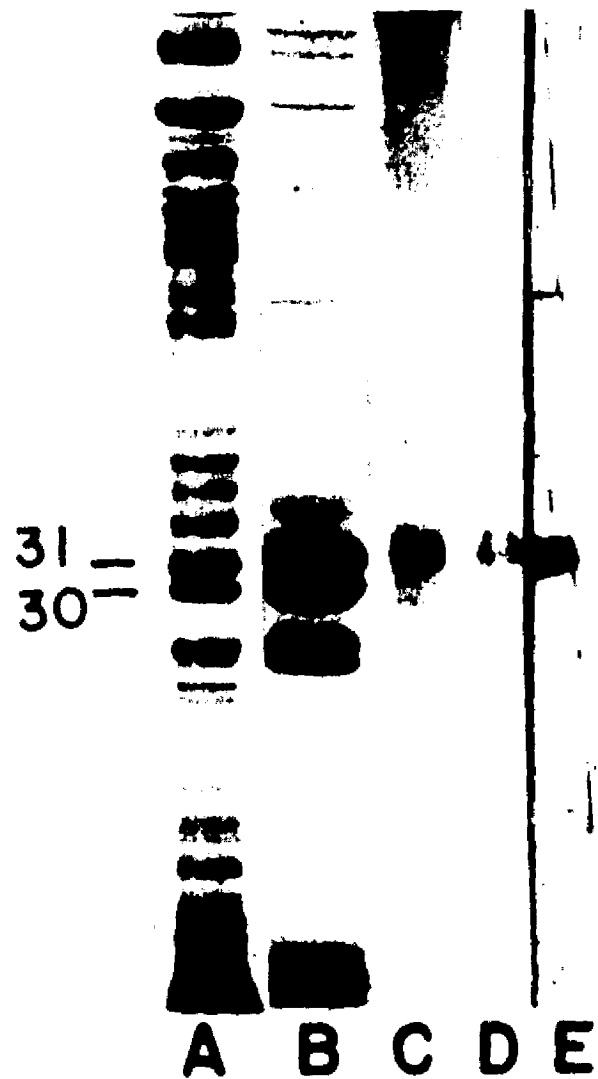


Figure 4 .

The fibronectin-binding antigen of 30-31 kD was purified from culture filtrates of *M. tuberculosis* in two steps. First, the unbound fraction obtained after passing a whole filtrate (Lane A) through a Con A column was enriched in Fn 30-31 (Lane B, Coomasie blue). Fn 30-31 was eluted from a preparative PAGE-SDS gel with urea 6M (Lane C, Coomasie blue). The purified antigen retained the capacity to react with a hyperimmune anti-*M. tuberculosis* antiserum (Lane D), and with fibronectin (Lane E).

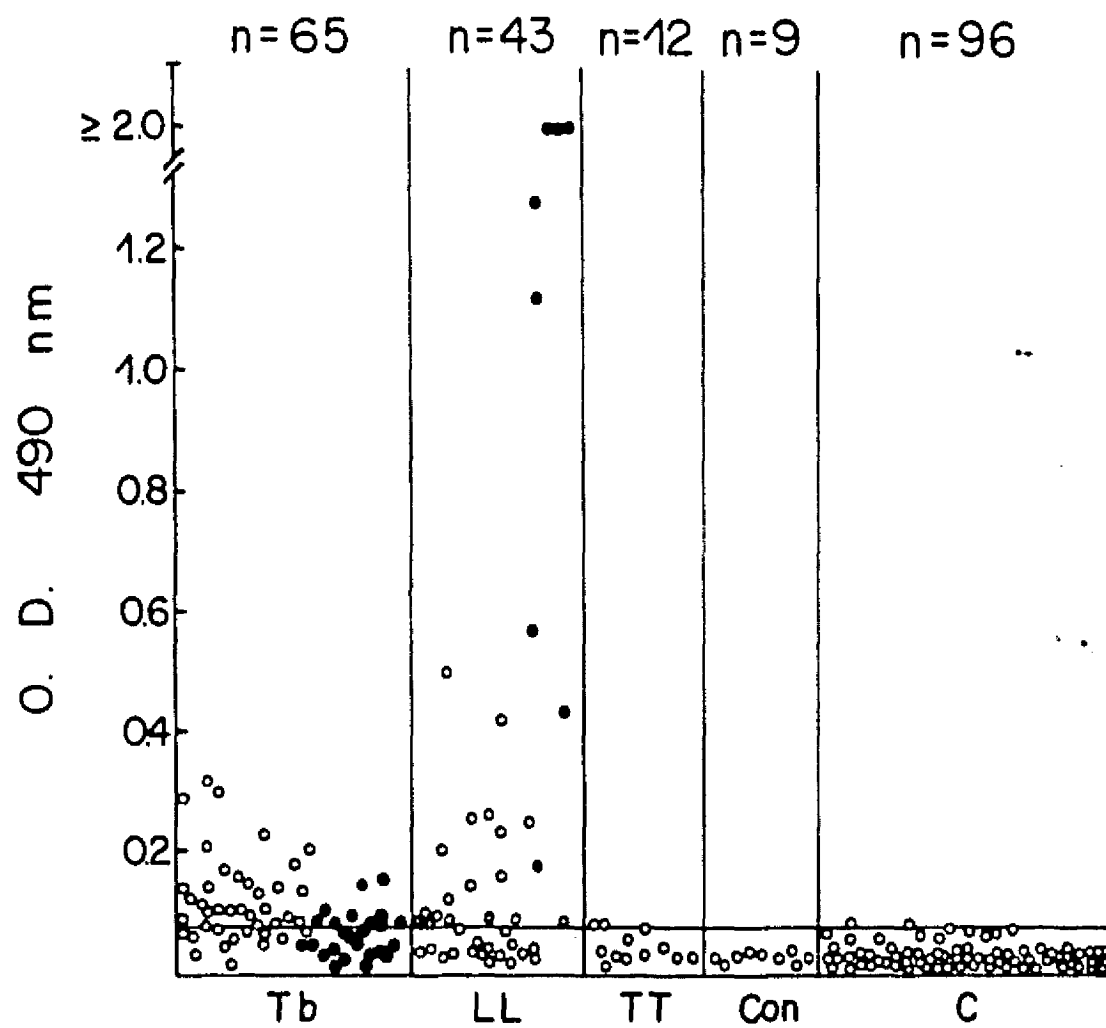


Figure 5.

Serum antibody titers against purified Fn 30-31 by ELISA in pulmonary tuberculosis (Tb) lepromatous leprosy (LL), tuberculoid leprosy (TT), contacts of lepromatous leprosy (Con) and in healthy individuals (C). The horizontal line represents the cutoff value of 2 standard deviations above the mean optical density of control sera. Closed circles indicate treated patients.

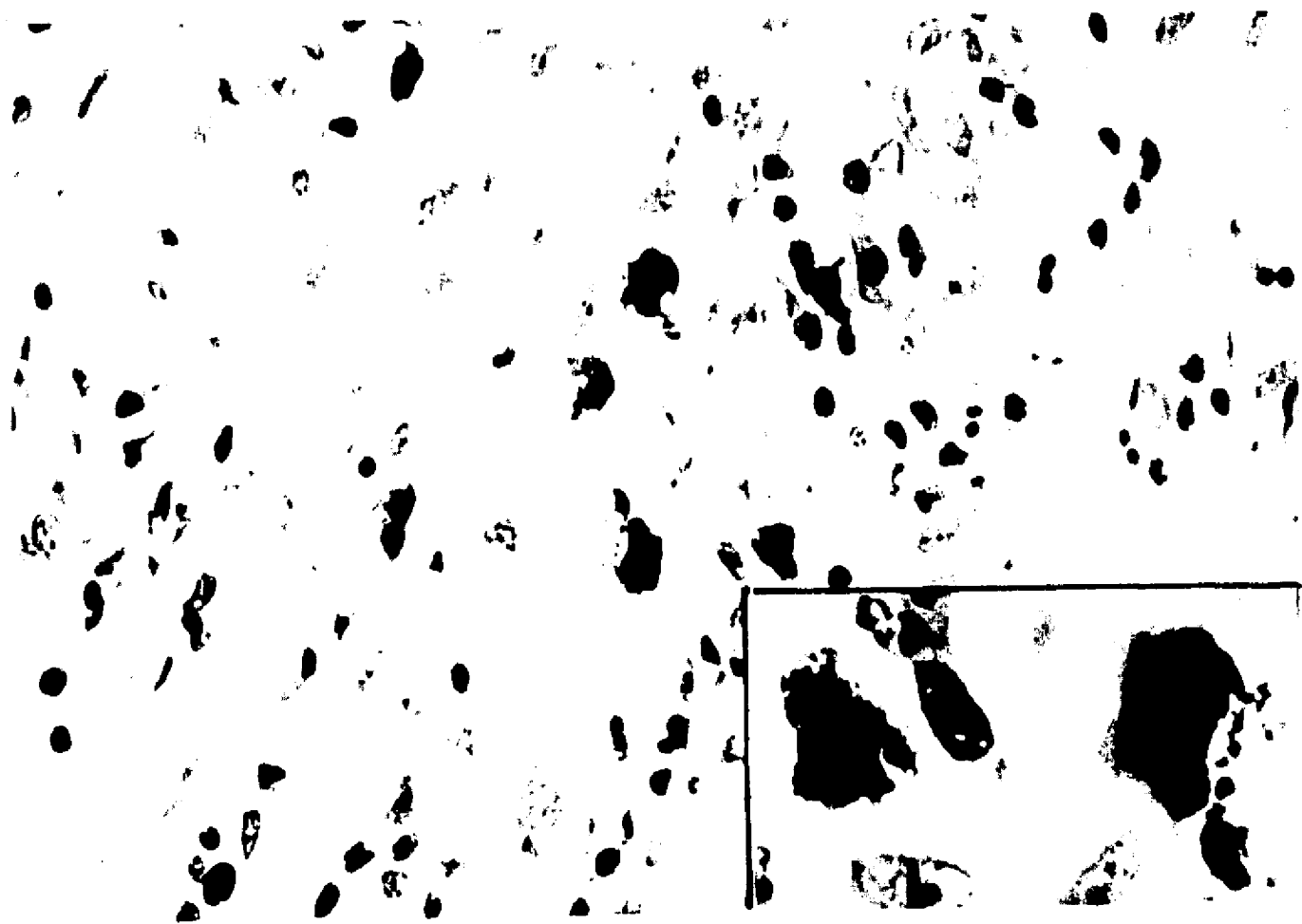


Figure 6.

Indirect immunoperoxidase of LL lesions with an antibody raised against M. tuberculosis Fn 30-31. Macrophages with positive intracytoplasmatic granules are seen.

PHOSPHATES STARVATION AUGMENTS THE EXPRESSION OF THE
38-kilodalton Mycobacterium tuberculosis PROTEIN. Biochemical
and Protein A-gold immunoelectronmicroscopy studies.

Clara Espitia, Rogelio Hernández-Pando*, Martha Elinos
and Raúl Mancilla

Departamento de Inmunología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Mexico, D.F.

Instituto Nacional de Enfermedades de la Nutrición
Salvador Zubiran*
México, D.F.

Short Title: Phosphates modulates expression of P38

Correspondence: Raúl Mancilla M.D.
Departamento de Inmunología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-228, 04510
México, D.F.

Key Words: Mycobacterium tuberculosis, phosphates,
immunoblot, immunoelectronmicroscopy

SUMMARY

In this work we have grown Mycobacterium tuberculosis in a modified Prokauer-Beck-Youmans culture medium supplemented with BSA, Glucose and Tween 80 in the presence or absence of phosphates salts. It was observed by immunoblot that the expression of the antigen of 38 kDa is enhanced by phosphate deprivation while the expression of the remaining antigen bands is not altered. These observations were confirmed by Protein A-gold immunoelectronmicroscopy with a monoclonal antibody to P38. The number of gold particles was significantly higher in bacilli grown in phosphates-deprived medium than bacilli grown in medium containing phosphates. P38 was mainly located in the wall and at the cell surface.

INTRODUCTION

Knowledge on the molecular structure of Mycobacterium tuberculosis has greatly improved during the last years thanks to the advent of sophisticated methods to purify and analyze proteins. A number of molecules are known in their antigenic properties and the function of some them in mycobacterial metabolism is under study^{1,2}.

Among the now well known molecules, the 38-kilodalton (P 38) has attracted much interest. It is an immunodominant antigen which carries carbohydrate residues³. By a competitive radioimmunoassay using monoclonal antibodies and by ELISA with the isolated antigen, up to 83% of patients with pulmonary tuberculosis have positive titers; in healthy individuals titers are mostly negative^{4,5,6}. The other striking feature of this protein is its high species-specificity since it can be demonstrated only in the M. tuberculosis complex^{7,8}. The gene coding the synthesis of P38 has been recently cloned by Andersen et al. The aminoacid sequence of P38 shows a 30% aminoacid sequence homology with the phosphate-binding Escherichia coli PhoS protein⁹. Furthermore, data has been obtained suggesting that M. tuberculosis phosphate-starved cells overproduce P38¹. In this study we obtained further biochemical evidence implicating P38 in phosphate metabolism. In addition, we showed by immunogold electronmicroscopy that phosphate-deprived bacilli express increased amounts of P38 and that this protein is mainly located in the cell wall and at the

cell surface.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria and growth conditions

Mycobacterium tuberculosis, strain H37/Rv was grown on the synthetic medium of Proskawer and Beck modified by Youmans (PBY)¹⁰. At the end of 4 to 6 weeks the bacteria were translated to PBY medium enriched with 0.5% bovine serum albumine (BSA), 7.5% glucose and 0.05% Tween 80. These modifications were introduced to allow a faster and disperse growth of bacilli. Bacilli were grown at 37° C in a New Brunswick R86 water-bath reciprocal shaker at 75 rpm. The kinetics of growth were established by reading at 460 nm the optical density (OD) of the cultures daily in a Spectronic 20 Spectrophotometer (Bausch and Lomb). At the mid-logarithmic phase of growth, samples of 40 ml each of the culture were taken and extensively washed by centrifugation at 6,000 rpm. Bacilli were suspended in 40 ml of the enriched PBY culture medium to which the usual amount of phosphates salts had been added. Other samples were suspended in 40 ml of enriched PBY prepared without phosphates salts. The phosphates-deprived medium was adjusted to pH 6.8 with Tris/HCL pH 7.6 to a final concentration of 10 mM. Bacilli were grown at 37° C as described above. At the end of the culture, bacilli were harvested and, when necessary, optical density was equalized by adding culture medium.

ELECTROPHORESIS AND IMMUNOBLOT

Equal volumes of phosphates-containing and phosphates-deprived cultures were centrifuged at 6,000 rpm and suspended in electrophoresis cocktail (62 mM-Tris, pH 6.8, 2% w/v, sodium dodecyl sulphate, 0.7 % 2-mercaptoethanol), boiled for 15 min and sonicated at four microtips with many pulses during 30 min in ice. Then, electrophoresis cocktail was added to the sonicated bacilli, boiled and centrifuged in an Eppendorf microfuge. The supernatants obtained were separated by PAGE-SDS following the method of Laemmli¹¹ in 10 % gels. Gels were mounted in an electrotransference chamber (Idea Scientific, Corvallis, PA, USA) and transferred to nitrocellulose sheets (Bio-Rad, Richmond, CA) according to the method of Towbin et al¹². Thereafter, the nitrocellulose sheets with the transferred proteins were treated overnight with 3% BSA in PBS Tween 20. After rising, strips were incubated for 2 h at room temperature with the various antisera. After rising five times, the adsorbed antibodies were revealed with a goat anti-mouse IgG labelled with horseradish peroxidase (Zymed Laboratories, San Francisco CA) diluted 1/100 or with a Protein A-horseradish peroxidase conjugate (Sigma Chemical Co., St Louis MO). Peroxidase was revealed with H₂O₂ and 4-chloro-1-naphtol for 15 min. Finally, strips were rinsed in tap water, dried and photographed.

Antisera.

The monoclonal antibody TB71 which recognizes with P38 was a kind gift from J. Ivanyi, Hammersmith Hospital, London, England. A polyclonal monospecific antibody to P38 was obtained as follows. Cultures filtrates from M. tuberculosis strain H37/Rv were fractionated as described before³ and a fraction enriched in P38 was electrophoresed and transferred to nitrocellulose. Strips taken from the peripheral parts of the sheet were stained with amido black to identify the P38 band. A strip containing this antigen was excised, treated with DMSO as described by Abou-Zeid et al.¹³, incorporated in incomplete Freund's adjuvant and used to immunize Balb/C mice. A total 5 of immunizations were given, each with about 5 g of antigen. The first two were in incomplete Freund's adjuvant and were given subcutaneously into the inguinal regions. The other 3 immunizations were intraperitoneal and contained no adjuvant. A similar procedure was followed to obtain a monospecific polyclonal antisera against the fibronectin-binding antigen of 30-31 kDa¹⁶. A hyperimmune serum against whole M. tuberculosis bacilli was obtained from rabbits as described elsewhere³.

IMMUNOELECTRONMICROSCOPY

Bacilli grown on PBY enriched medium prepared with and without phosphates were harvested, centrifuged and fixed in 1% glutaraldehyde in Sorensen buffer pH 7.4 for 1 h at 4° C. After rinsing, free aldehyde groups were blocked in 0.5 M NH₄Cl in PBS for 1 h. Postfixation with OsO₄ was omitted.

Dehydratation through a series a graded ethanol solutions was carried out. Bacilli were embedded in Epon B12. One micron semithin sections were taken to select fields with bacilli. Ultrathin sections were obtained with a diamond knife, placed on formvar coated 200 or 300 mesh nickel grids (Electron Microscopy Sci, Washington, PA). Epon was removed with a 10% H_2O_2 solution. 10%. After rinsing grids were treated with PBS containing 1% BSA and 0.5% Tween 20. Then, grids were incubated with the anti-P38 mouse monoclonal antibody TB 71 diluted 1/100 in PBS with 1% BSA and 0.5% Tween. After rinsing extensively with PBS, grids were incubated with Protein A conjugated to 15 nm gold particles diluted 1/30 in the above buffer. The grids were examined in a Zeiss M-10 electronmicroscope Electronmicrographs at a 16,000 x magnification were taken and the number of gold particles in 20 consecutively photograped bacilli were counted and expressed as the number of gold particles by squared micron. The Mann-Whitney test was used to analyze the results obtained. In control grids, the TB72 was omitted or replaced by normal mouse serum.

RESULTS AND DISCUSSION

Metabolic studies of M. tuberculosis are difficult to perform because it grows slowly forming large aggregates which makes impossible to follow the kinetics of growing by optical density readings. To overcome these limitations we used in

these experiments PBY enriched with BSA, glucose and Tween 80. In this medium, the logarithmic phase of growth starts usually at five days of culture and the stationary phase is attained five days later (Fig. 1). To study the effects of phosphate deprivation, bacilli were taken at the mid-logarithmic period of growth, usually at the seventh day when optical density at 460 nm was about 0.6. It was observed that the growth of bacilli cultured in phosphates-deprived medium was slower than that of bacilli grown in medium with phosphates (Fig. 2). This difference was bigger at 12 h. To analyze the effects of phosphate starvation in P38 expression, immunoblots were carried out with a monospecific antiserum to P38 diluted 1/100 and using 30 μ l of the sonicated antigen. Based on the thickness and intensity of the band, expression of P38 was higher in bacilli grown in culture medium deprived from phosphates. This effect was best seen at 12 h of culture. In earlier and later times there were not clear differences seen (Fig. 3). To better define the enhancing effects of phosphate starvation in P38 expression, immunoblots were done lowering the amount of protein electrophoresed and increasing antibody dilution (Fig. 4). With the same 30 μ l of sonicated antigen and the antibody diluted 1/200, the difference in P38 expression by bacilli grown in phosphate-deprived (Lane A) and phosphate-containing (Lane B) media was better seen. Results were even more striking lowering the amount of the sonicated antigen to 15 μ l and 5 μ l (Fig. 4. Lanes, C, D, E and F).

To rule out the possibility that the differences observed

were due to unequal loading of gels, we revealed immunoblots with a hyperimmune antiserum to whole bacilli (Fig. 5). It was observed that the density of the vast majority of the bands was similar in both cultures (Lanes A y B). Similar results were obtained in immunoblots using an antibody against the 30-31 kDa fibronectin-binding antigen (Lane C y D). These observations showed that the differences observed are not artefactual and that the deprivation of phosphates affects only the expression of P38. To further analyze the effects of phosphate starvation on P38 expression, we carried Protein-gold immunoelectron-microscopy. By using the monoclonal antibody TB 71, it was observed that the total number of gold particles was higher in phosphate- deprived bacilli (Fig. 6). These differences were shown to be significant by the Mann Whitney Test ($p < 0.002$). Asides from to helping to define P 38 as a protein involved in phosphate metabolism, gold immunoelectronmicroscopy studies have come to define the topographic distribution of P38. Gold particles were mainly located in the wall and outer surface of bacilli. The cell wall location of P38 would go along with its function in phosphate metabolism. On the other hand, the surface location revealed by these studies could explain, at least in part, the high immunogenicity of P38 revealed in serologic studies of patientes with tuberculosis.

REFERENCES

1. Andersen, A.B., Ljungqvist, L. and Olsen, M. 1990. Evidence that protein antigen b of Mycobacterium tuberculosis is involved in phosphate metabolism. *J. Gen. Microbiol.* 136:477-478.
2. Garbe, T., Jones, C., Charles, I., Dougan, G. and Young, D. 1990. Cloning and characterization of the aroA gene from M. tuberculosis. *J. Bacteriol.* 172:6774-6782.
3. Espitia, C. and Mancilla, R. 1989. Identification, isolation and partial characterization of Mycobacterium tuberculosis glycoprotein antigens. *Clin. exp. Immunol.* 77:378-383.
4. Jackett, P.S., Bothamley, G.H, Batra, H.V., Mistry, A., Young, D.B. and Ivanyi, J. 1988. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 26:2313-2318
5. Espitia, C. Cervera, I., Gonzalez, R. and Mancilla R. 1989. A 38-kD M. tuberculosis antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin. Exp. Immunol.* 77:373-377.
6. Wilkins, E.G.L., and Ivanyi, J. 1990. Potential value of serology for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Lancet.* 336:641-644.
7. Kadival, G.V., Chaparas, S.D. and Hussong, D. 1987. Characterization of serological and cell mediated reactivity of a 38 kDa antigen isolated from Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol.* 139:2447-2451.
8. Andersen, A.B. Yuang, Z., Haslov, K., Vergmann, B., and Bennedsen J. 1986. Interspecies reactivity of five monoclonal antibodies to Mycobacterium tuberculosis as examined by immunoblotting and Enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 23:446-451.58.
9. Andersen, A.B. and Hansen, E.B. 1989. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.* 57:2481-2488.
10. Youmans G.P. 1946. A method for determination of the culture cycle and the growth rate virulent human type tubercle bacilli. *J. Bact.* 51:703-709..

11. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 277:680-685.
12. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4350-4354.
13. Abou-Zeid, C., Filley, E., Steele, J. and Rook G.A.W. 1987. A simple new method for using antigens separated by polyacrilamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes in vitro after converting bands cut from Western blots into antigen-bearing particles. *J. Immunol. Meth.* 98:5-9

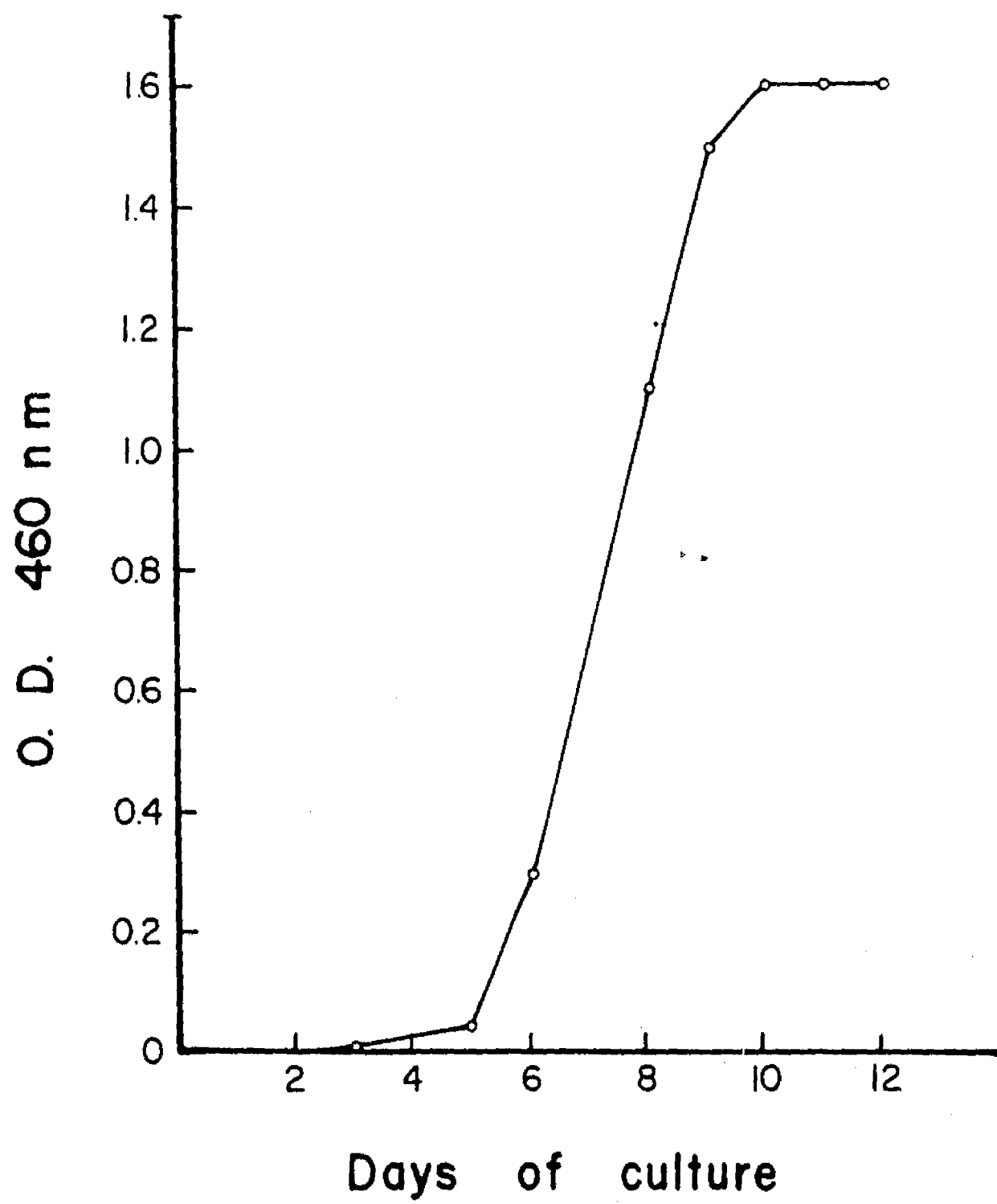


Figure. 1

Growth of M. tuberculosis H37/Rv in a PBY medium modified by the addition of BSA, glucose and Tween 80.

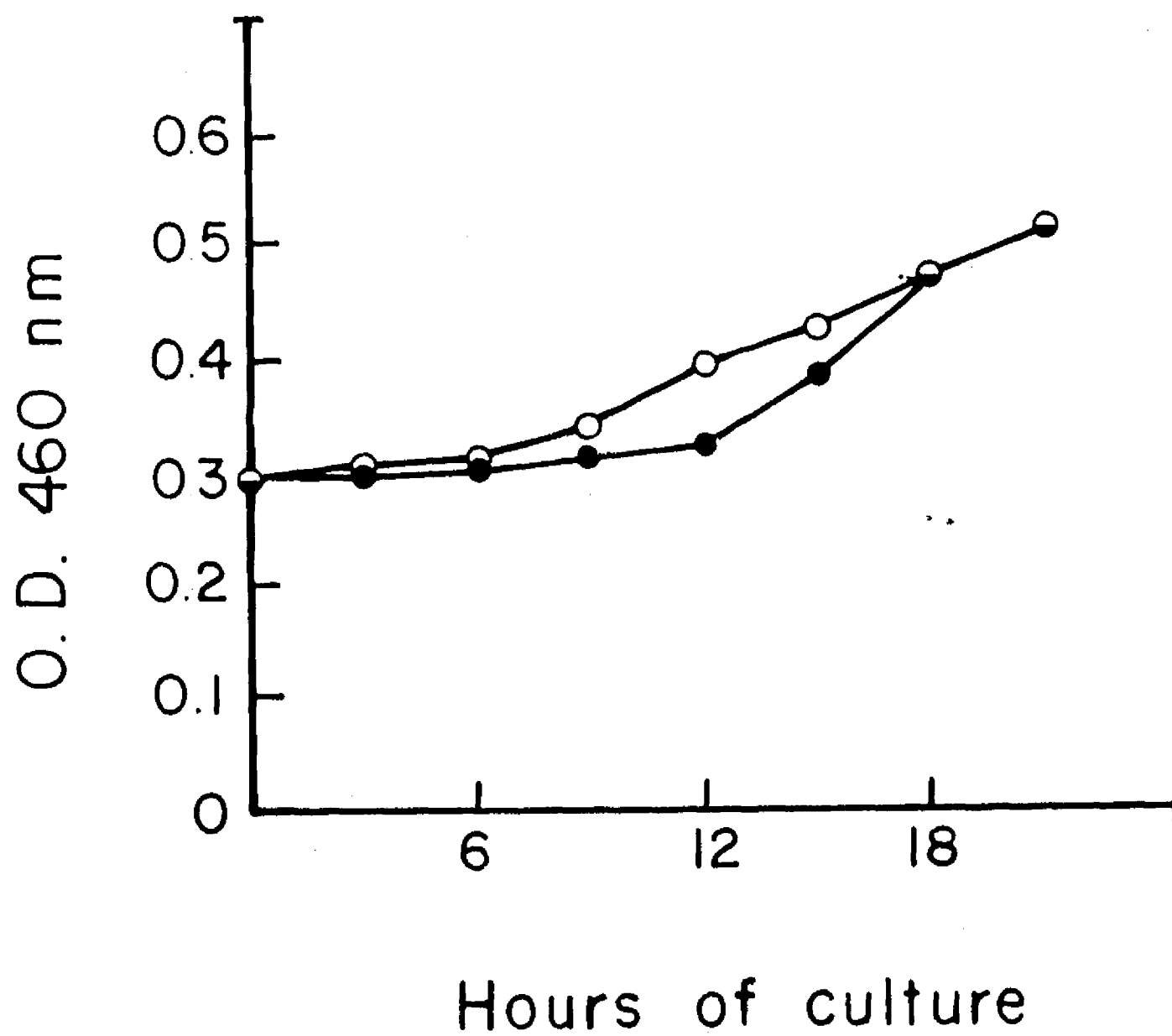


Figure 2.

Kinetics of growth of bacilli grown in PBY with (o) and without (o) phosphates.

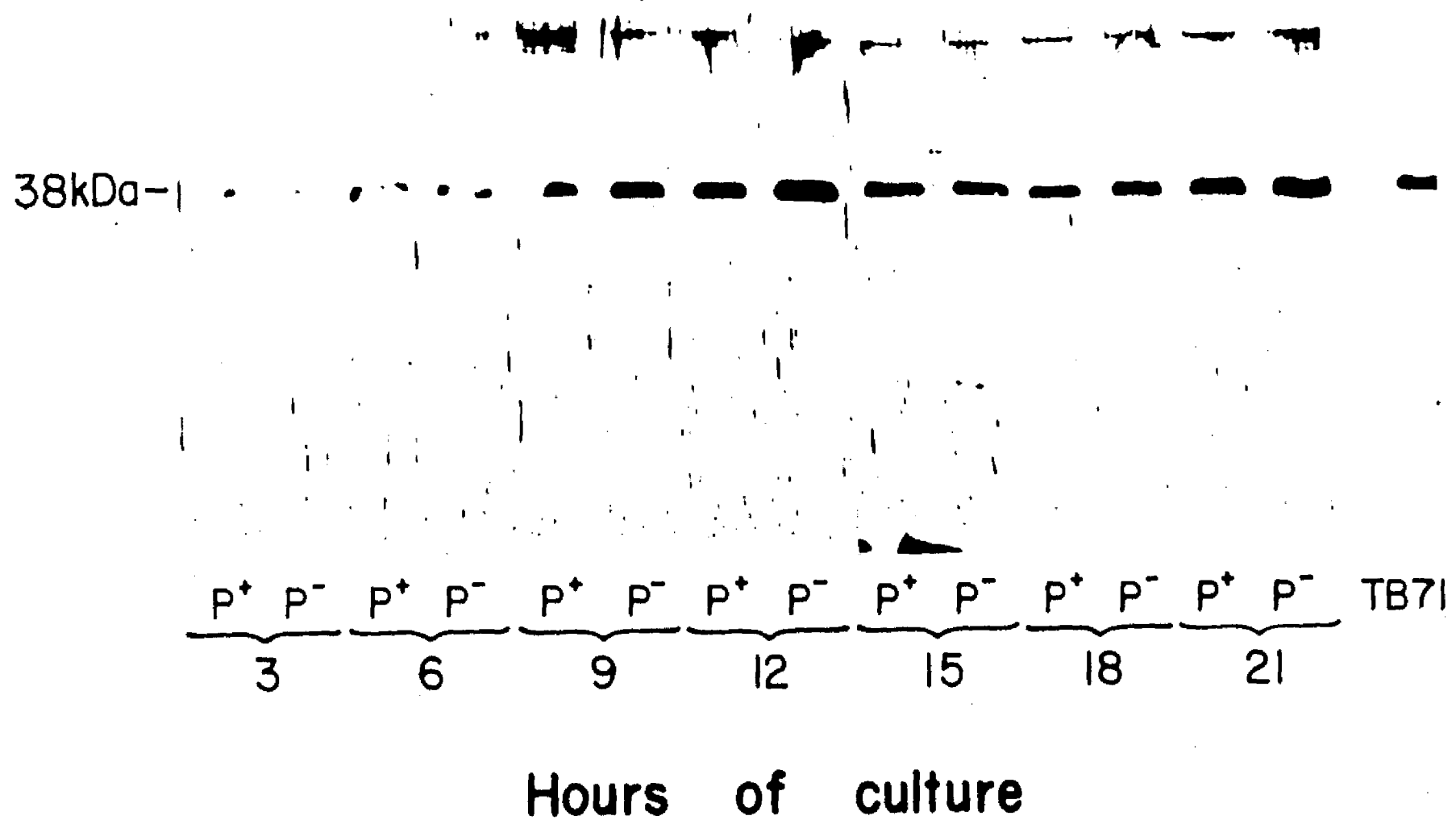


Figure 3.

Immunoblot of cultures taken at various times and revealed with an antibody to P38. Overexpression of P38 in phosphates-deprived bacilli was better seen at 12 h of culture. The overexpressed 38 kDa band is recognized by the TB71 monoclonal antibody. (P⁺) bacilli grown with phosphates; (P⁻) bacilli grown without phosphates.

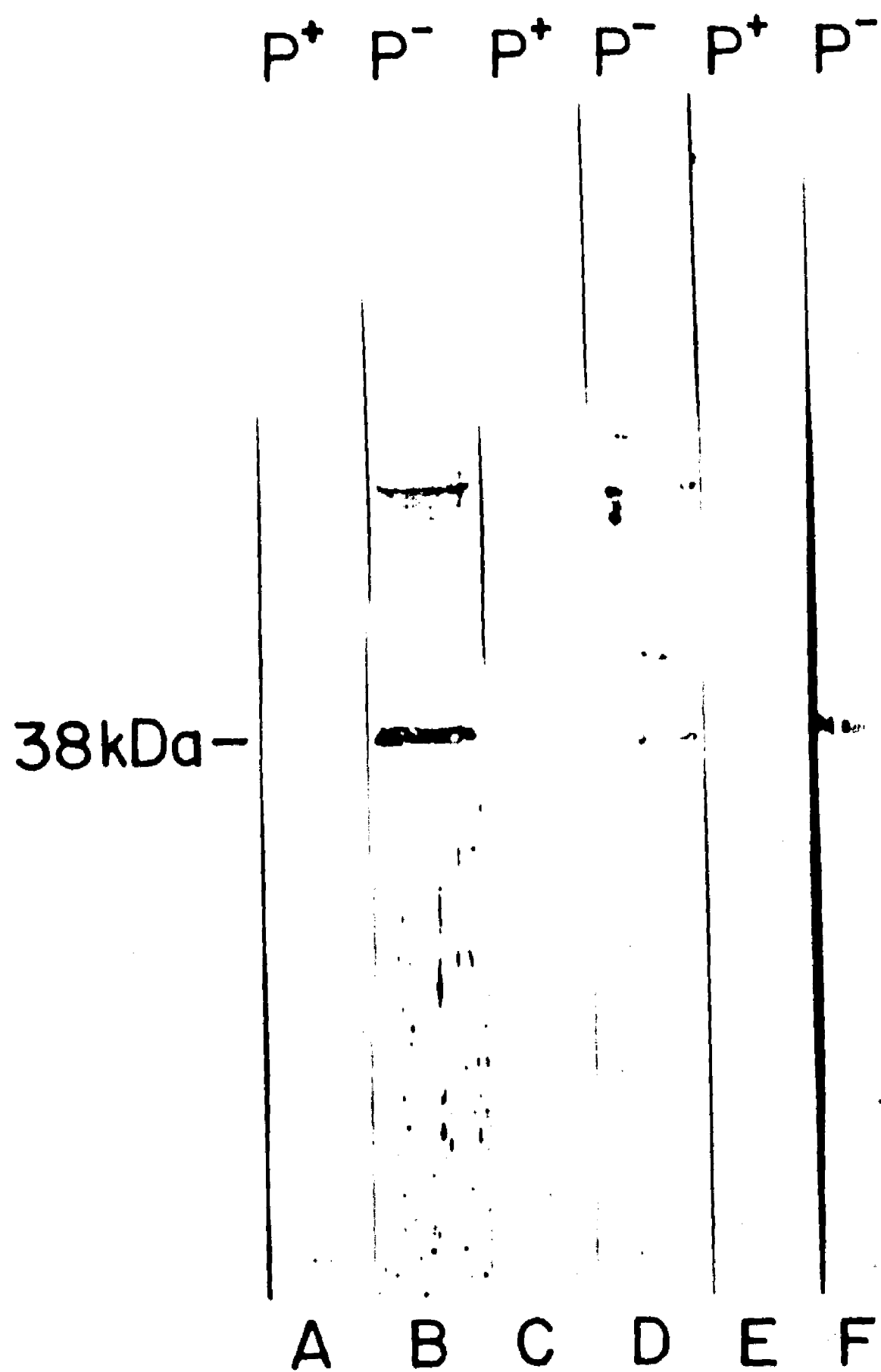


Figure 4.

Immunoblot analysis of the expression of P38 in bacilli grown in phosphate-deprived (P⁺) and phosphates-containing (P⁻) media.

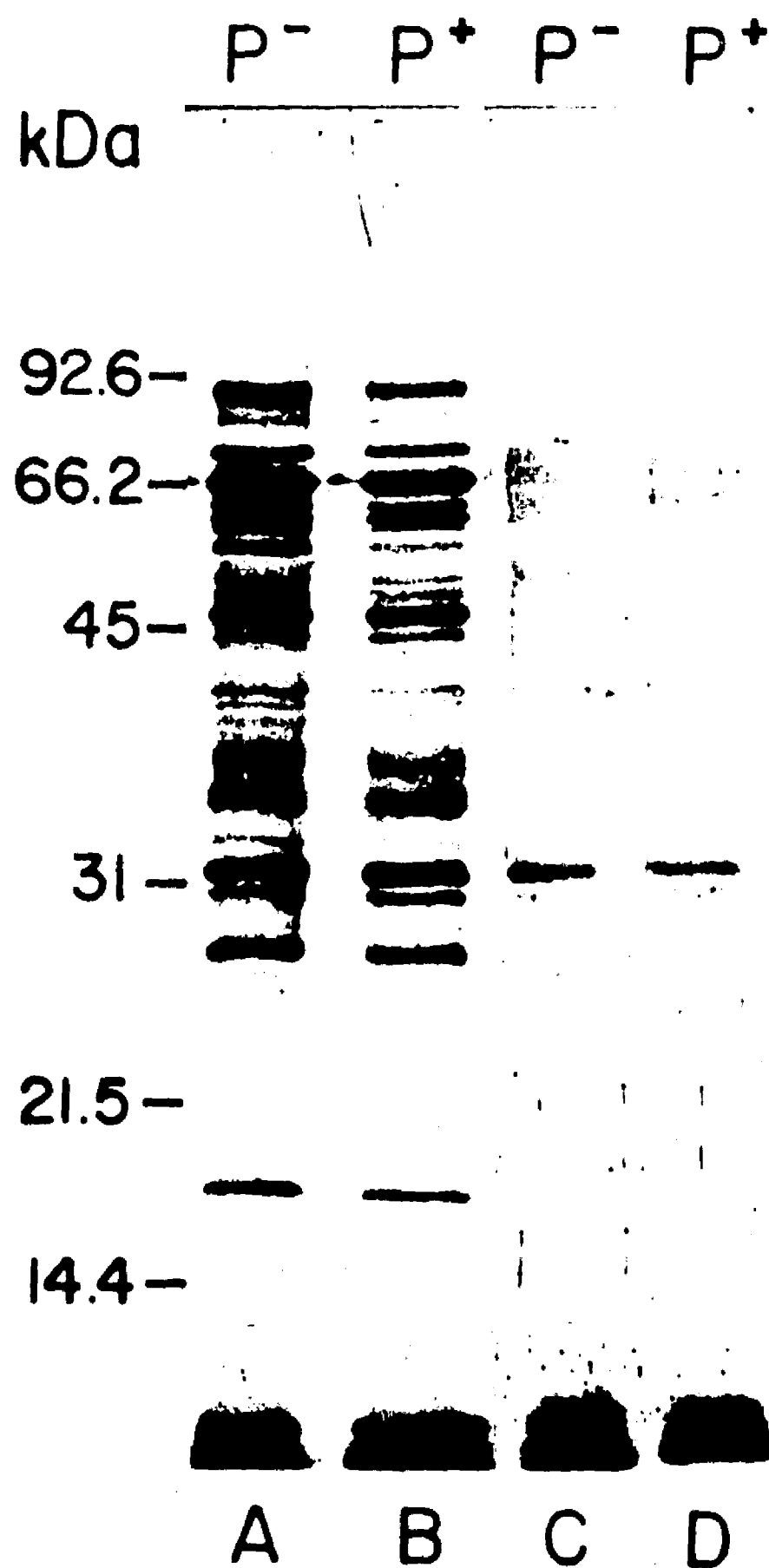


Figure 5.

Immunoblot analyses of sonicated bacilli revealed with a hyperimmune antiserum against whole *M. tuberculosis* (Lanes A and B) and with an antibody to the fibronectin-binding antigen of 30-31 kDa (Lanes C and D). (P^+) bacilli grown without phosphates; (P^-) bacilli grown with phosphates.

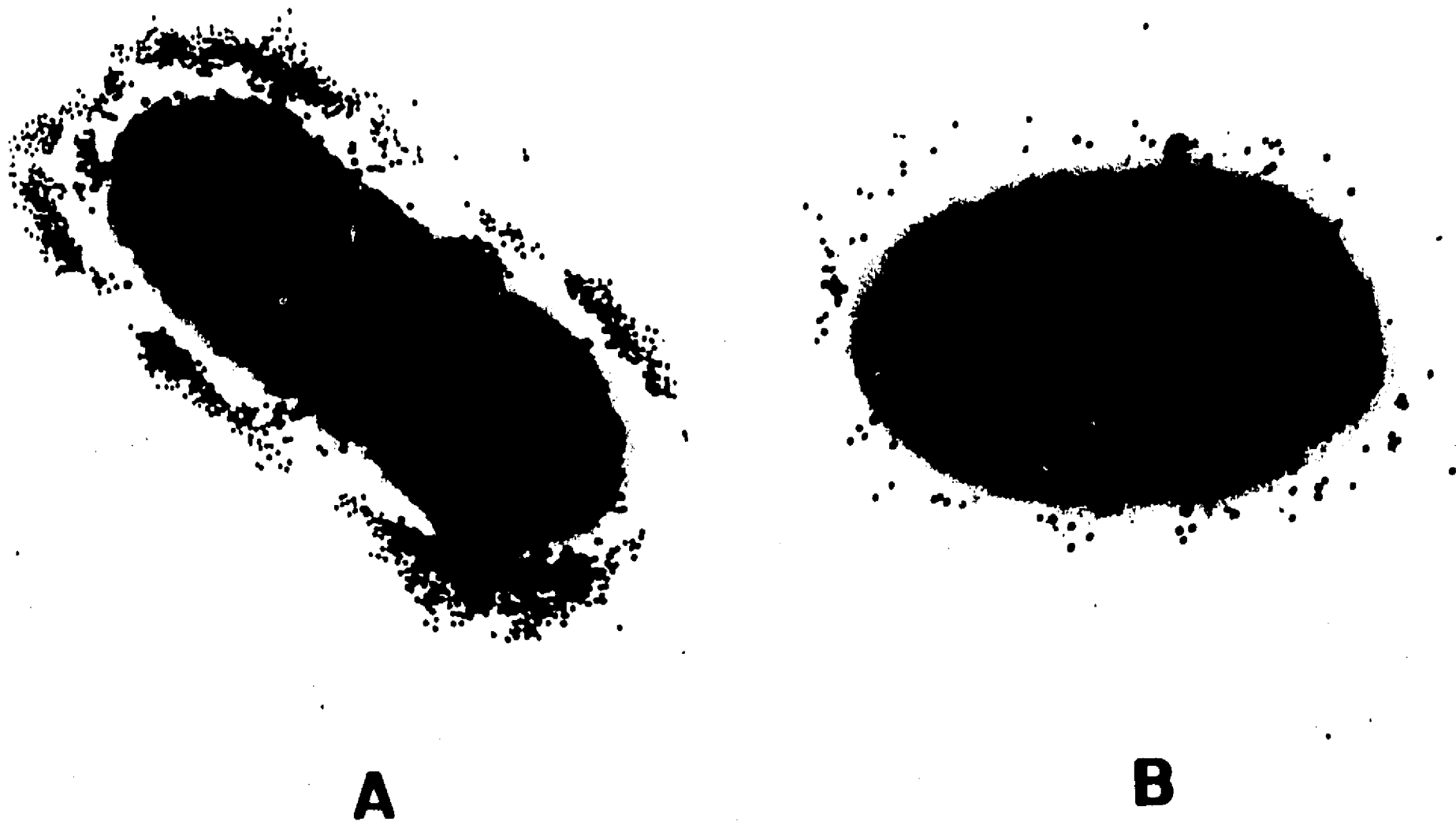


Figure 6.

Electronmicrographs of bacilli grown in PBY without (A) and with phosphates (B).