



9
03072 24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES**

**SEDE DEL PROYECTO EN BIOTECNOLOGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES A LIPOARABINOMANANA DE
M. tuberculosis**

*Tesis que presenta para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología*

ENRIQUE MELENDEZ HERRADA

*Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional
de la Nutrición Salvador Zubirán, bajo la tutoría
de la Dra. Yolanda López Vidal, Investigadora del
Departamento de Infectología*

Ciudad Universitaria, enero de 1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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

Página

LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE ESQUEMAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE DIAGRAMAS	iv
LISTA DE GRAFICAS	v
ABREVIATURAS	vi
1. RESUMEN	1
2. PARTE TEORICA	7
2.1 CARACTERISTICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	7
2.2 BIOTECNOLOGIA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	13
2.3 IMPORTANCIA EN EL DESARROLLO DE TECNICAS DE DIAGNOSTICO	21
2.4 ALTERNATIVAS EN LAS TECNICAS DE DIAGNOSTICO	23
2.5 EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS	25
2.6 METODOS DE DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS	31
2.7 METODOS CLASICOS	31
2.7.1 TUBERCULOSIS PULMONAR	32
2.7.2 METODOS TRADICIONALES A LAS FORMAS EXTRAPULMONARES	33
2.7.3 METODOS NO INMUNOLOGICOS	34
2.7.4 METODOS INMUNOLOGICOS	37
2.7.5 ANTIGENOS MICOBACTERIANOS	46
3. HIPOTESIS	52
4. OBJETIVOS	53
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	54
5.1 PURIFICACION DEL ANTIGENO	54
5.2 PROTOCOLO DE IMUNIZACION	58

5.3 FUSION CELULAR	60
5.3.1 CRECIMIENTO DE LAS CELULAS DE MIELOMA	60
5.3.2 PRODUCCION DE HIBRIDOMAS	60
5.4 SELECCION DE HIBRIDOMAS (CLONACION POR DILUCION LIMITADA)	63
5.5 OBTENCION DEL LIQUIDO DE ASCITIS	65
5.6 CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	67
5.6.1 ISOTIPIFICACION	67
5.6.2 INMUNOFLUORESCENCIA	68
5.6.3 ENSAYO DE INMUNODOT	69
5.6.4 INMUNOENSAYOENZIMATICO (ELISA)	70
6. RESULTADOS	72
7. DISCUSION	87
8. CONCLUSIONES	96
9. APENDICE	97
9.1 METODO DE CUANTIFICACION DE CARBOHIDRATOS.	97
9.2 MATERIALES Y REACTIVOS	98
10. BIBLIOGRAFIA	102

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	PROPIEDADES DE LAS INMUNOGLOBULINAS DE RATON	12
2	CIENCIAS RELACIONADAS CON LA BIOTECNOLOGIA	18
3	ETIOLOGIA INFECCIOSA DE ORGANISMOS OPORTUNISTAS EN INSTITUCIONES MEXICANAS Y DEL EXTRANJERO	28
4	CASOS REPORTADOS Y MORTALIDAD POR TUBERCULÓISIS EN TODAS SUS FORMAS EN MEXICO DE 1980-1988	30
5	RESULTADOS DE SEROLOGIA EN TUBERCULOSIS USANDO EL METODO DE ELISA	40
6	DETECCION DE ANTIGENOS DE <i>M.tuberculosis</i> EN DIFERENTES ESPECIMENES CLINICOS	41
7	HIBRIDOMAS EMPLEADOS EN LA PRODUCCION DE FLUIDO DE ASCITIS	65
8	PRESENTACION DE LAS CLONAS PRODUCTORAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LAM DE <i>M.tuberculosis</i> ...	78
9	REACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES A <i>M.tuberculosis</i> CONTRA OTROS MICROORGANISMOS POR INMUNOFLUORESCENCIA	81
10	REACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES A <i>M.tuberculosis</i> CONTRA MICOBACTERIAS POR INMUNOFLUORESCENCIA	81
11	CARBOHIDRATOS TOTALES DE SOBRENADANTES DE MICROORGANISMOS DIFERENTES A <i>M.tuberculosis</i>	82
12	DETECCION DE LAM CON DIFERENTES ANTICUERPOS POR ENZAYO DE INMUNODOT	84

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema		Página
1	EVENTOS DE LA FUSION CELULAR PARA LA PRODUCCION DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	9
2	INMUNIZACION A RATONES BALB/C CON LAM DE <i>M.tuberculosis</i>	59
3	METODOLOGIA GENERAL PARA LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	62

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	MODELO DE LA INMUNOGLOBULINA IgG DE RATON	10
2	MAGNITUD Y DINAMICA DEL PROBLEMA MUNDIAL DE LA TUBERCULOSIS	25
3	ESTRUCTURA DE LA ARABINOMANANA DE LA MICOBACTERIA	48
4	ESTRUCTURA DE PARED CELULAR DE <i>Mycobacterium leprae</i>	49
5	CULTIVO DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LAM DE <i>M.tuberculosis</i>	64
6	PATRON DE LOS EVENTOS ELECTROFORETICOS EN LA PURIFICACION DE LAM DE <i>M.tuberculosis</i>	75
7	ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA LA DETECCION DE <i>M.tuberculosis</i> CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LAM.	79

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama

Página

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | PURIFICACION DE LIPOARABINOMANANA DE <i>M.tuberculosis</i> | 56 |
| 2 | PURIFICACION DE LIPOARABINOMANANA DE <i>M.tuberculosis</i> | 57 |

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica		Página
1	INCIDENCIA DE TUBERCULOSIS DE 1969-1989 EN LA CIUDAD DE NUEVA YORK	26
2	DISTRIBUCION DE MUERTES POR TUBERCULOSIS EN MEXICO DURANTE 1985.	30
3	CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO COLUMNA DE DEAE-SEPHACEL FRACCION A'	73
4	CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DEAE-SEPHACEL CON GRADIENTE DE NaCl 1M	74
5	CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL CON BIO-GEL A-5M	74
6	TITULACION DE LOS ANTICUERPOS SERICOS MURINOS CONTRA LAM DE <i>M.tuberculosis</i> POR ELISA EN EL RATON NUMERO 2.	76
7	TITULACION DE LOS ANTICUERPOS SERICOS MURINOS CONTRA LAM DE <i>M.tuberculosis</i> POR ELISA EN EL RATON NUMERO 3.	77
8	REACTIVIDAD DE LOS SOBRENADANTES OBTENIDOS POR SONICACION DE 10 MICROORGANISMOS DIFERENTES CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL LAM 11:6 CONTRA <i>M.tuberculosis</i> POR ELISA.	86

ABREVIATURAS

<i>Ara</i> ₁	=	Arabinosa en forma furanosa
BCG	=	Bacilo de Calmette Guérin
BF ₃	=	Trifluoruro de Boro
°C	=	Grados centígrados
Co ⁶⁰	=	Cobalto radiactivo sesenta
DEAE	=	Dietilaminoetil
DNA	=	Acido Desoxirribonucleico
ELISA	=	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
fg	=	Fentogramos
°GL	=	Grados Gay-Lussac
HAT	=	Hipoxantina, Aminopterina, Timidina
h	=	Horas
Il-6	=	Interleucina 6
I.V	=	Intravenosa
Kb	=	Kilobases
LAM	=	Lipoarabinomanana
LCR	=	Líquido Cefalorraquídeo
Man _p	=	Manosa en forma piranosa
min	=	Minutos
ml	=	Mililitros
mM	=	Milimolar
nm	=	Nanómetros
pb	=	Pares de Bases
PCR	=	Reacción de Polimerasa en Cadena
PPD	=	Derivado Proteico Purificado
PEG	=	Poliethylenglicol
RIA	=	Radioinmunoensayo
RNA	=	Acido Ribonucleico
rpm	=	revoluciones por minuto
seg	=	segundos
SIDA	=	Síndrome de la Inmunodeficiencia Humana
SSI	=	Solución Salina Estéril
Tris	=	Tris (hidroximetil) aminometano
vol	=	volumen
VIH	=	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
µg	=	Microgramos
µl	=	Microlitros
µm	=	Micrómetros

*Aprendí ésto, cuando menos, con mis experimentos
si uno avanza confiado en la dirección de sus
sueños, e intenta vivir la vida que ha imaginado,
se encontrará con un éxito inesperado en las
horas ordinarias. En la medida en que simplifique
su vida, las leyes del universo le parecerán menos
complejas, y la soledad no le parecerá soledad
ni la pobreza pobreza, ni la debilidad debilidad*

Henry D. Thoreau

I. RESUMEN

La tecnología para producir anticuerpos monoclonales se deriva del campo de estudios de investigación básica en inmunología. Se han producido y desarrollado muchos métodos para el diagnóstico de enfermedades usando por vez primera los en la búsqueda de fusiogénesis de anticuerpos con una calidad homogénea de una manera específica y constante.

El empleo de anticuerpos monoclonales como reactivos de diagnóstico presenta ventajas importantes ya que permite el reconocimiento de antígenos particulares (enzimas, agentes infecciosos, etc.) con alta sensibilidad y especificidad los cuales son difícilmente muy difíciles de conseguir en las técnicas para el diagnóstico clínico de uso rutinario. La aplicación de los anticuerpos monoclonales al diagnóstico es efectuada de dos maneras: el diagnóstico "in vivo" para la detección de padecimientos como el cáncer o algunas enfermedades cardíacas con empleo de radiomarcadores.

El segundo corresponde al diagnóstico "in vitro" encontrando su principal aplicación en los ensayos inmunoenzimáticos en los cuales se acoplan en-tanto a anticuerpos y en presencia de un sustrato orgánico desarrollan reacciones coloridas las cuales son posibles cuantificar colorimétricamente reconociéndose de esta manera la reacción antígeno anticuerpo los más conocidos son los ensayos en-tiendose inmunoacoplado (ELISA) éstos han sido aplicados para el diagnóstico de enfermedades tales como: desórdenes genéticos, enfermedades múltiples, padecimientos hormonales, enfermedades infecciosas, etc.

Esto último es un campo muy amplio de aplicación, ya que estos anticuerpos se han utilizado para una gran variedad de agentes patógenos incluyendo virus, hongos, protozoarios y diversas bacterias, las aplicaciones principalmente son generalistas por grupos de anticuerpos con fines de inmunización activa, tal es el caso de los anticuerpos monoclonales para la detección de la leishmaniasis, tripanosomiasis, tuberculosis, virus de la inmunodeficiencia humana etc.

1. RESUMEN

La tecnología para producir anticuerpos monoclonales se desarrolló a partir de estudios de investigación básica en inmunología, lo que ocasionó el desarrollo de nuevas técnicas para el diagnóstico de enfermedades, dado que por primera vez en la historia se dispuso de anticuerpos con una calidad homogénea de una manera segura y constante.

El empleo de anticuerpos monoclonales como reactivos de diagnóstico presenta ventajas importantes ya que permite el reconocimiento de antígenos (proteínas, hormonas, agentes infecciosos, etc.) con alta sensibilidad y especificidad las cuales son características muy difíciles de conseguir en las técnicas para el diagnóstico clínico de uso rutinario. La aplicación de los anticuerpos monoclonales al diagnóstico es efectuado de dos maneras, el diagnóstico "in vivo" para la detección de padecimientos como el cáncer y algunas enfermedades cardíacas con empleo de radioimágenes.

El segundo corresponde al diagnóstico "in vitro" encontrando su principal aplicación en los ensayos inmunoenzimáticos en los cuales se acoplan enzimas a anticuerpos y en presencia de un sustrato orgánico desarrollan reacciones coloridas las cuales son posibles cuantificar colorimétricamente reconociéndose de estos resultados la reacción antígeno anticuerpo los más conocidos son los ensayos enzimáticos inmunoacoplado (ELISA) éstos han sido aplicados para el diagnóstico de enfermedades, tales como: desórdenes genéticos, enfermedades malignas, padecimientos hormonales, enfermedades infecciosas, etc.

Esto último es un campo muy amplio de aplicación, ya que estos anticuerpos se han utilizado para una gran variedad de agentes patógenos incluidos virus, hongos, protozoarios y diversas bacterias, las aplicaciones principalmente son generadas por grupos de científicos con fines de investigación básica, tal es el caso de los anticuerpos monoclonales para la detección de la leishmaniasis, tricomonirosis, tuberculosis, virus de la inmunodeficiencia humana etc.

La presencia de una gran diversidad de agentes infecciosos en humanos ha presentado la dificultad de mantener líneas de investigación en el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas.

Sin embargo, dada la necesidad de contar con reactivos de diagnóstico más específicos muchas empresas se han dado a la tarea de comercializar los anticuerpos monoclonales. En este sentido han penetrado al mercado los productos de diagnóstico con los llamados kits o estuches de diagnóstico, siendo el diagnóstico del embarazo uno de sus éxitos más conocidos a nivel mundial.

En México y otros países subdesarrollados los problemas causados por enfermedades infecciosas representan serios problemas contra la salud, el caso de la tuberculosis en nuestro país se presenta de una manera prevalente y es la decimoprimer causa de muerte, esta enfermedad se manifiesta con mayor frecuencia como una infección pulmonar. Aunque, las formas extrapulmonares (piel, pleura, riñón, meninges, etc.) se presentan en un número inferior de muertes, pero tienen mayor dificultad en su diagnóstico.

El agente causal de la tuberculosis es *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*) aunque las variedades *Mycobacterium bovis* (*M.bovis*) y *Mycobacterium africanum* (*M.africanum*) son también infectivas al humano su identificación se realiza tradicionalmente por medio de la baciloscopia y cultivo en los centros hospitalarios, en la forma pulmonar la especificidad es alta pero la sensibilidad es baja, en el diagnóstico de las enfermedades extrapulmonares la sensibilidad y especificidad son aun menores por ejemplo en la forma meníngea la sensibilidad es menor al 50% por baciloscopia.

Existen métodos alternos de diagnóstico para la tuberculosis a los ya señalados los cuales están basados en técnicas de cromatografía de gases y radiométricas que presentan mayor sensibilidad y especificidad pero requieren del uso de equipo de alto costo lo que resulta de difícil adquisición en los laboratorios de rutina.

El uso de técnicas de biología molecular ha permitido el desarrollo de métodos de diagnóstico con alta especificidad y sensibilidad, tal es el caso del uso de sondas marcadas y la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), éste último teóricamente tiene la capacidad de detectar una micobacteria en los especímenes clínicos. Sin embargo, el PCR no es capaz de diferenciar las micobacterias pertenecientes al complejo de tuberculosis (*M.tuberculosis*, *M.bovis* y *M.africanum*), además requieren de personal altamente calificado y el uso de reactivos y equipo que ordinariamente no disponen la inmensa mayoría de laboratorios clínicos.

El empleo de técnicas de inmunodiagnóstico ha permitido también el desarrollo de métodos simples, confiables y accesibles a los laboratorios de análisis clínicos, por ejemplo, el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Sin embargo, no se tiene disponibilidad en México de un reactivo inmunológico comercial adecuado que permita una alta sensibilidad y especificidad en su aplicación en laboratorios de rutina al diagnóstico de la tuberculosis.

De acuerdo a esto, para el diagnóstico de tuberculosis por los métodos inmunológicos se tienen como antecedentes los estudios hechos por diversos investigadores como Daniel(16), Brennan(7), Sada(75), Kadival(42), Krambovitis(48), etc. y por otra parte se han realizado intentos para desarrollar anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de esta enfermedad con el fin de mejorar su sensibilidad y especificidad pero los resultados de las distintas investigaciones no han llegado a una disponibilidad comercial de este inmunorreactivo, el cual podría ser usado en cualquier laboratorio clínico con una técnica de uso común.

Dados estos antecedentes, el objetivo básico del presente trabajo de tesis es el desarrollar anticuerpos monoclonales dirigidos contra un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* que permitan el desarrollo y la aplicación de una técnica ordinaria de rutina la identificación temprana de la micobacteria.

Desde el punto de vista médico esto último es de singular importancia ya que la oportuna detección de este bacilo sobre todo en las formas extrapulmonares (p.ej.

meningitis) permitiría salvar la vida del paciente o bien reducir las severas secuelas de la enfermedad por la aplicación de un rápido y adecuado tratamiento.

Para el desarrollo de este trabajo se selecciono al antígeno de lipoarabinomanana (LAM) que es un polisacárido constituyente de la pared de *Mycobacterium tuberculosis* cuya actividad inmunogénica se manifiesta con la producción anticuerpos de una manera sustancial en la enfermedad natural y en esquemas de inmunización a los animales de laboratorio (7).

Como parte del desarrollo experimental este antígeno se purificó a partir de técnicas de extracción y cromatográficas convencionales descritas en la literatura científica POR Hunter y cols.(38) obteniéndose en el laboratorio resultados de bajo rendimiento de este antígeno.

El antígeno LAM fue utilizado en el protocolo de inmunización a ratones BALB/c y se seleccionó al ratón, que presentó el mayor título de anticuerpos, de él se extrajo el bazo, para realizar la fusión celular en la producción de hibridomas de acuerdo al protocolo de Fazekas de St.Groth y Scheidegger (24).

La selección de los de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales se realizó por técnica de ELISA indirecta y de ella se seleccionaron los hibridomas productores de anticuerpos y clonados por la técnica de dilución limitante. Las clonas se expandieron "in vitro" para aumentar la masa celular y, finalmente, tres clonas de once totales fueron introducidas en peritoneo de ratón para la obtención de líquido de ascitis.

Como resultados experimentales, los tres anticuerpos monoclonales producidos fueron nombrados como LAM 11:4, LAM 11:5 y LAM 11:6 fueron caracterizados como IgG2a en su isotipo, se estudió también la capacidad de los monoclonales para reconocer *Mycobacterium tuberculosis* en su forma completa o nativa mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizándose los controles negativos microorganismos como: *Candida albicans* (C.albicans), *Cryptococcus neoformans* (C.Neoformans), *Nocardia asteroides* (N. asteroides), *Nocardia brasiliensis* (N.brasiliensis),

Coccidioides immitis (*C.immitis*), *Histoplasma capsulatum* (*H.capsulatum*), *Aspergillus fumigatus* (*A.fumigatus*), y *Mycobacterium avium* (*M.avium*).

Se determinó que el anticuerpo LAM 11:6 es capaz de reconocer a LAM obtenido de la purificación mediante ensayos de inmunodot, se utilizaron los extractos solubles obtenidos de lisados celulares obtenidos mediante sonicación de los microorganismos antes señalados, los cuales presentaron reconocimiento antigénico hacia *C.neoformans*, *C.albicans*, *N.asteroides*, *H.capsulatum*, *C.immitis*, *A.fumigatus*, *M.avium*, *E.coli*, extracto y LAM purificado de *M.tuberculosis*.

Los lisados de estos microorganismos fueron valorados por ELISA empleándose los mismos lisados que en inmunodot. Se utilizó el anticuerpo monoclonal LAM 11:6 mismo que reconoció LAM purificado cuya absorbancia a 492 nm fue de 0.45 ± 0.031 y 0.528 ± 0.035 de *M.avium* 0.773 ± 0.057 mientras que empleando anticuerpos policlonales a LAM de referencia se obtuvieron lecturas de 0.441 ± 0.039 y *S.aureus* 0.318 ± 0.022 . Para los sonicados de otros microorganismos estudiados la absorbancia fue menor a 0.3, como: *C.neoformans* 0.120 ± 0.045 , *C.albicans* 0.072 ± 0.010 , *N.asteroides* 0.257 ± 0.025 , *N.brasiliensis* 0.170 ± 0.015 , *H.capsulatum* 0.293 ± 0.023 , *C.immitis* 0.317 ± 0.010 y *A.fumigatus* 0.131 ± 0.008 . En base a este ensayo fue posible diferenciar la reactividad cruzada de los microorganismos.

Los resultados aquí generados sugieren el desarrollo de una técnica de diagnóstico por inmunofluorescencia la cual permite apreciar visualmente a estos microorganismos al microscopio dado que los anticuerpos aquí generados reconocieron a *Mycobacterium tuberculosis* en su forma bacilar completa en muestras de expectoración con baciloscopia confirmatoria, y del cultivo de este mismo microorganismo. Sin embargo, es necesario continuar con este trabajo de investigación y con el ensayo de todos los anticuerpos monoclonales producidos en las muestras de cultivo para otras micobacterias de interés clínico.

Es de suma importancia utilizar muestras provenientes de líquidos biológicos como cefalorraquídeo, pleural, muestras de espectoración, etc. las cuales presenten baciloscopia y cultivo positivos así como con las que presenten sospecha de este bacilo, con el fin de darle validez y utilidad práctica a los resultados generados de esta investigación.

*También es recomendable utilizar estos anticuerpos monoclonales que reconocen a LAM de *M.tuberculosis* sean validados con un número mayor de cepas de micobacterias de múltiples especies, con la finalidad de confirmar la especificidad para este bacilo.*

De esta manera se contribuye a la utilización de los anticuerpos monoclonales al diagnóstico clínico como una de las aplicaciones importantes de la biotecnología en la medicina.

2. PARTE TEORICA

2.1 CARACTERISTICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos o inmunoglobulinas constituyen un sistema de proteínas de defensa que poseen los vertebrados para protegerse de los invasores extraños desarrollando un mecanismo inmunológico de tipo humoral. Los anticuerpos son glicoproteínas producidas por las células plasmáticas derivadas de linfocitos B presentes en órganos especializados como el bazo, bolsa de Fabricio, ganglios linfáticos además del torrente sanguíneo (33).

Los linfocitos B al reaccionar ante un estímulo antigénico por el mecanismo humoral desarrollan clonas de células que producen diferentes anticuerpos caracterizados por sus isotipos y subisotipos. Cada anticuerpo posee un sitio de unión al antígeno dirigidos hacia los determinantes antigénicos o epitopes, el sitio de reconocimiento del anticuerpo hacia el antígeno se localiza en la estructura de las regiones hipervariables de la molécula (33).

Cada molécula de anticuerpo tiene en este sitio de unión una secuencia precisa de aminoácidos que está determinada por la genética del linfocito B. La respuesta de anticuerpos a un antígeno es altamente heterogénea, hay tal vez un millón de diferentes líneas de linfocitos B. Klinman y Press (33) en 1975 estimaron que un ratón BALB/c contiene 200 millones de linfocitos B de los cuales un 5 al 20% ofrecen distintos clonotipos, lo cual da origen a los anticuerpos policlonales contenidos en sueros de los vertebrados, en cambio los anticuerpos obtenidos de una clona artificial como hibridomas y cultivados "in vitro" masivamente serán conocidos como anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales y policlonales tienen propiedades específicas que hacen de ellos ideales para una situación en particular. La naturaleza de esas diferencias específicas deberá ser bien comprendida para una aplicación óptima en inmunoensayos.

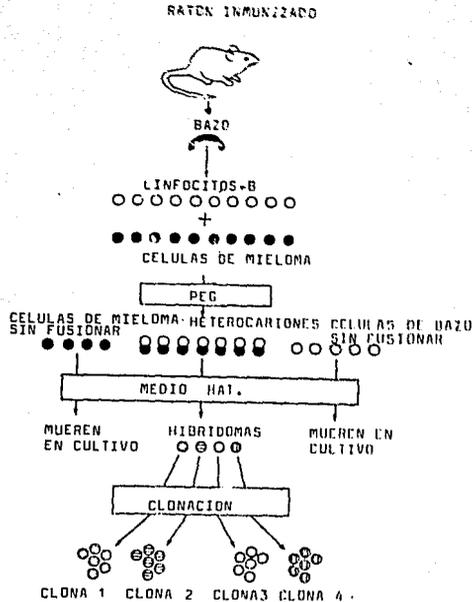
Kohler y Klinan (33) estimaron que ratones BALB/c pueden contener de 1000 a 7000 diferentes linfocitos con capacidad para producir anticuerpos contra un mismo inmunógeno. No es de sorprenderse que algunos de ellos tengan baja y alta afinidad dependiendo del grado de complementación entre el epítotope y el parátotope.

En 1975 Cesar Milstein y Georges Kohler (45) en Inglaterra desarrollaron un método simple y elegante para la producción de anticuerpos que reconocen a un sólo epítotope de un antígeno. Los experimentos para lograr esto consistieron en fusionar "in vitro" células de mieloma de ratón con linfocitos de bazo de ratón inmunizado con un antígeno particular.

La resultante célula híbrida o hibridoma expresa las propiedades del linfocito productor de anticuerpos específicos y el carácter inmortal de las células de mieloma. El proceso de selección de estas células híbridas se realiza por el uso de un medio selectivo que contiene precursores de ácidos nucleicos como son Aminopterina, Timidina e Hipoxantina conocido comúnmente como medio HAT a partir de esto se logran desarrollar líneas celulares inmortales productoras de anticuerpos, estas células híbridas pueden ser mantenidas con los conocimientos establecidos en cultivo de tejidos de mamíferos (54).

La fusión de células de mieloma o plasmacitomas con células de bazo de ratón con polietilenglicol esencialmente es un proceso aleatorio y la frecuencia de hibridomas secretores de anticuerpos refleja la capacidad productora de anticuerpos de las células del bazo.

Es deseable entonces para fines experimentales conocer y cuantificar la respuesta de los anticuerpos policlonales en los roedores inmunizados para seleccionar a el animal que exprese altos niveles de anticuerpos y que probabilísticamente deberán incrementar el rendimiento de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales un esquema de los pasos mas importantes en la producción de anticuerpos monoclonales se presenta en la siguiente página. →



Esquema 1 EVENTOS DE LA FUSION CELULAR PARA LA PRODUCCION DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.(33)

Las células híbridas obtenidas de esta metodología pueden ser clonadas (p.ej. en placa, dilución limitante) y cada clona produce un anticuerpo idéntico (monoclonal) hacia un sólo epítipo, y las diferentes clonas pueden ser mantenidas indefinidamente en cultivo "in vitro". También las clonas pueden ser inyectadas en animales para la producción de líquido de ascitis y de esa forma tener una producción masiva de anticuerpos monoclonales.

líquido de ascitis y de esa forma tener una producción masiva de anticuerpos monoclonales.

Estructuralmente los anticuerpos son moléculas simétricas constituidos por 2 cadenas idénticas de glicoproteínas de una masa molecular relativa (M_r) de 50,000 - 75,000 llamadas cadenas pesadas y 2 cadenas idénticas de proteínas no glicosiladas o cadenas ligeras de M_r 25,000, las cadenas pesadas que están unidas por puentes disulfuro a una cadena pesada (figura 1).

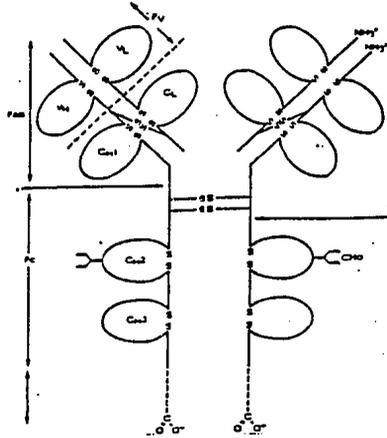


Figura 1 MODELO DE LA INMUNOGLOBULINA IgG DE RATON

Fab = Fracción de unión al antígeno; *Fc* = Fracción cristalizante

Fv = Fracción variable; *VH* = Cadena pesada variable; *VL* = Cadena ligera variable;

CH = Cadena constante pesada

Las inmunoglobulinas pueden ser divididas en 5 clases o isotipos principales: IgM, IgD, IgG, IgE, IgA cada isotipo tiene propiedades distintivas estructurales y biológicas (tabla 1).

anticuerpo contiene moléculas ya sean kappa o lambda las moléculas de anticuerpos individualmente poseen cadenas ligeras kappa o lambda pero nunca ambas` (33).

Adicionalmente, la IgG puede ser subdividida en cuatro subclases o subisotipos G1 hasta G4 en humanos. Por otra parte existen las G₁, G_{2a}, G_{2b} y G₃ en ratón, y G₁, G_{2a}, G_{2b} y G₂ en ratas que son los animales de experimentación de donde comúnmente se obtienen los hibridomas (33).

En ratón y en rata aproximadamente el 95 % de las cadenas ligerás son kappa, ambas cadenas ligeras y pesadas son capaces de tomar parte en todas las funciones biológicas de los anticuerpos. Las cadenas ligeras pueden formar parte importante en la determinación de la especificidad de los anticuerpos, pero todas las funciones efectoras de los anticuerpos (eg. lisis de celular mediada por el complemento) son determinadas sólo por las cadenas pesadas. Las cadenas ligeras y pesadas están constituidas por una serie de unidades homólogas de cercas de 110 aminoácidos, las secuencias de aminoácidos de unidades de homología individual son similares y sugieren que ellas surgen por duplicación genética de un gene primordial común. Cada unidad de homología contiene un enlace disulfuro intracatenario entre los residuos de cisteína situados en cerca de 20 aminoácidos de cada final (33).

Cada unidad de homología está doblada en un dominio la cual es una estructura compacta globular conteniendo en gran proporción una hoja β plegada, los dominios individuales son más resistentes al ataque proteolítico. Los anticuerpos contienen una región extra conocida como la bisagra que es una estructura más abierta y especialmente susceptible a proteólisis (33).

Tabla 1 PROPIEDADES DE LAS INMUNOGLOBULINAS DE RATON

	IgM	IgD	IgG	IgE	IgA
Concentración sérica	0.1-1.0 mg/ml	1-10µg/ml	3-20 mg/ml	0.1-1 µg/ml	1-3 mg/ml
M _r	900 000	180 000	160 000	190 000	170 000-500 000
Cadenas pesadas	µ	δ	γ	ε	α
Cadena pesada M _r					
Secretoria	80 000	65 000	55 000	80 000	70 000
Membranal	84 000	70 - 75 000	65 000	?	
Cadenas ligeras	κ ο λ	κ ο λ	κ ο λ	κ ο λ	κ ο λ
Subclases	1	1	4	1	1
Carbohidratos	9-12%	12-15%	2-3%	12%	7-11%
Grupos prostéticos (forma secretada)	Cadena J	-	-	-	Cadena J Componente secretor
Citotoxicidad mediada por complemento	+	-	G1 débil o - otros +	-	-
Transporte placentario	-	-	+ (todas las subclases)	-	-
Vida media en suero	1 día	menos de un día	G1,G2a,G3 4 días G2b 2 días	> de un día	1 día
Propiedades especiales	Primer Ac en la mayoría de las respuestas	Principalmente en la superficie de linfocitos. En suero en menor cantidad	En suero en mayor cantidad, rara vez unida a linfocitos	En suero está en menor cantidad. unida a mastocitos. Responsable de reacciones alérgicas, histamina y serotonina.	Mayor componente de secreciones (Saliva, bilis, etc.)

Las secuencias de aminoácidos de las unidades de homología N-terminales varían grandemente en la molécula del anticuerpo y es conocida como la región variable (V).

Las unidades de homología N-terminal de las cadenas pesadas y ligeras son designadas V_H y V_L respectivamente, dentro de cada región variable se encuentran tres segmentos hipervariables esto se debe a que los dominios V_H y V_L son doblados de tal manera que presentan las regiones hipervariables y crean el sitio de combinación con el antígeno, la especificidad está determinada por las cadenas pesadas y ligeras. Cada molécula de anticuerpo tiene dos sitios de combinación con el antígeno excepto para IgM polimérica e IgA la cual tiene diez y cuatro sitios respectivamente (33).

2.2 BIOTECNOLOGIA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

La biotecnología de anticuerpos monoclonales, la ingeniería genética y el cultivo de tejidos vegetales han dado origen a la llamada "Biotecnología Moderna" o "Nueva Biotecnología" que junto con otras nuevas tecnologías ha dado lugar a la llamada Segunda Revolución Industrial de la que se dice cambiará muchas formas de vida de la sociedad en el llamado tercer milenio (25,80).

En la actualidad, todavía no es en términos económicos un fenómeno comparable a otras revoluciones industriales como las que crearon el automóvil o la microelectrónica.

Los métodos de producción de anticuerpos monoclonales desarrollados por Kohler y Milstein en 1975 constituyen un gran adelanto tecnológico que permiten la obtención de cantidades infinitas en forma relativamente pura de anticuerpos de un solo isotipo dirigidos contra un solo sitio antigénico lo que permite una mejor especificidad y sensibilidad de los inmunoensayos. La versatilidad de estos anticuerpos como reactivos de diagnóstico se ha mejorado con el advenimiento de la tecnología de hibridomas.

Los anticuerpos monoclonales ofrecen ventajas técnicas en relación a los anticuerpos policlonales porque presentan una mejor continuidad en la calidad y un suministro de una

especificidad más definida, y una nueva oportunidad para el desarrollo de nuevos inmunoensayos(49).

Hoy en día los anticuerpos monoclonales con propiedades especiales pueden ser obtenidos lo que antes del advenimiento de la tecnología de hibridomas era imposible, por ejemplo los anticuerpos monoclonales biespecíficos son producidos después de la fusión de dos líneas de hibridomas productoras de anticuerpos (67,84).

Los anticuerpos monoclonales están entre los productos más importantes derivados del cultivo de células animales a nivel industrial. La elevada demanda hoy en día para anticuerpos monoclonales ha impulsado los esfuerzos para mejorar las economías de producción "in vitro" en gran escala, ejemplo de ello es el caso del requerimiento de suero fetal bovino en el medio de crecimiento ya que representa uno de los mayores costos asociados con el cultivo celular a gran escala (47,63).

El suero es una mezcla compleja de hormonas, factores de crecimiento, nutrientes y trazas de elementos, la composición del suero es indefinida de calidad variable y una frecuente fuente de contaminación microbiana. Con el suero también se introducen proteínas las cuales hacen la purificación del producto más difícil, esto es de particular importancia en anticuerpos monoclonales que serán empleados en la terapéutica (66).

Los anticuerpos monoclonales para terapia tal vez el más empleado es el OKT3 un anticuerpo murino específico que interactúa con una proteína humana en el complejo receptor de células T, que ha sido aprovechado como agente inmunosupresivo al rechazo de injertos. También se cuenta con el desarrollo de otros anticuerpos murinos para el combate de septicemias y ciertos tipos de enfermedades malignas (20,32). Recientemente se han desarrollado anticuerpos monoclonales de origen humano para la cura de este mismo tipo de enfermedades (52,69,78).

Con el desarrollo de este tipo de innovaciones a nivel mundial en anticuerpos monoclonales es indispensable implementar políticas de investigación y desarrollo en esta área de la biotecnología a nivel nacional para tener las disponibilidad de este tipo de

reactivos de diagnóstico así como su aplicación en la inmunoterapia, e impulsar su producción a nivel industrial (25).

A).- APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

- 1.- *Inmunoensayos*
 - *Detección del cáncer*
 - *Seguimiento de una terapia con fármacos*
 - *Pruebas de alergia y del embarazo*
- 2.- *Pruebas de Diagnóstico*
 - *Endocrinología*
 - *Hematología*
 - *Infectología*
- 3.- *Investigación Médica*
 - *Estudios de Reproducción Humana*
 - *Operación del Sistema Nervioso Central*
 - *Inmunopatogénesis de diversos microorganismos*

B).- CAMPO DE APLICACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

- *Industria Alimentaria*
- *Industria Farmacéutica*
- *Agricultura*
- *Investigación Forense*
- *Investigación Ambiental*

C).- INDUSTRIAS RELACIONADAS A LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

- 1.- *Empresas relacionadas con la manufactura de estuches de inmunoensayos*
 - *Industrias de Plásticos*
 - *Industrias de Papel y Cartón*
 - *Industrias Químicas*
 - *Industrias Biotecnológicas (Enzimas)*
- 2.- *Empresas Relacionadas a la Instrumentación*
 - *Industria Electrónica*
 - *Industria de Partes Mecánicas*
 - *Industria del Plástico*

Los inmunólogos y otros investigadores disponen de una herramienta poderosa y versátil que ayuda a comprender el funcionamiento del sistema inmune además de una aplicación práctica en el estudio de los diversos antígenos que afectan la salud humana.

Debido a que los científicos no patentaron sus descubrimientos los derechos comerciales de esta tecnología pasaron a un estatus de mercado abierto, la aplicabilidad de los anticuerpos monoclonales a los inmunoensayos fue inmediata a este descubrimiento, sin embargo, a pesar de estas ventajas la penetración en el mercados como kits o estuches de inmunoensayos fue inicialmente baja, ahora es de millones de dólares anuales (49).

Siendo los kits la aplicación más importante en el diagnóstico "in vitro" e "in vivo", hoy en día más de 100 estuches están basados en el diagnóstico "in vitro" los cuales son usados principalmente en el conocimiento inicial del embarazo, las enfermedades infecciosas, y el seguimiento de la eficacia de drogas terapéuticas y al reconocimiento de compatibilidad de órganos y tejidos para trasplantes y detección de células tumorales (49).

La purificación de productos biotecnológicos de alto valor agregado es otra aplicación común de los anticuerpos monoclonales un ejemplo de ello es el contrato de Damon Biotech para purificar α interferon producido por ingeniería genética en bacterias por la empresa Hoffmann-La Roche (20).

Algunas compañías están patentando anticuerpos monoclonales basados en el diagnóstico por radioimagen y métodos de tratamiento con inmunocongugados (una parte de la molécula consta de un anticuerpo monoclonal unido químicamente a un radioisótopo o a una droga).

En 1984 Centocor lanzó al mercado un anticuerpo monoclonal con el nombre comercial de "Myoscint" para detectar el daño cardíaco en casos de ataques al corazón, este anticuerpo monoclonal tiene reconocimiento a la proteína miosina liberada en la zona del daño, el anticuerpo está unido a un radioisótopo de corta vida como el Indio-111 el cual puede ser detectado con el uso de una cámara de imágenes especiales, y ha demostrado ser de gran importancia en el área de la cardiología. Esta empresa pretende

desarrollar anticuerpos monoclonales en el diagnóstico "in vivo" del cáncer, algunas compañías se han dedicado, casi exclusivamente, al desarrollo de inmunocombinados o inmunotoxinas como es el caso de NeoRex (20).

Un inmunocombinado prometedor ha sido el desarrollado por Eli Lilly en Indianapolis (E.U.A). En este caso el anticuerpo monoclonal se combinó con la droga anticancerosa Vinblastina la cual es específica contra el adenocarcinoma, lo cual ha dado origen a una clase muy especial de anticuerpos llamados inmunotoxinas (20,25).

Los anticuerpos monoclonales son ahora ofrecidos por una variedad de empresas dedicadas al diagnóstico siendo las más importantes en este campo las establecidas en los Estados Unidos de Norteamérica, siendo las más importantes las que se enlistan a continuación.

- *Abbott Laboratories (North Chicago,IL)*
- *Becton Dickinson (Paramus, N.J)*
- *Bioresponse (Haward,Cal)*
- *Centocor (Malvern,Pa)*
- *Damon Biotech (Needham Heights,Mass)*
- *Genetic Systems (Seattle,Wh)*
- *Hybritech (San Diego,Cal)*
- *Johnson & Johnson (Raritan,N.J)*
- *Karyon Technologies (Norwood,Mass)*
- *Monoclonal Antibodies (Mountain View,Mass)*
- *Roche Diagnosis (Nutley,N.J)*
- *Syntex (Palo alto,Cal)*

Desde hace pocos años Hybritech y Gentic Systems fueron adquiridos por Eli Lilly y Bristol-Myers, respectivamente (20).

La biotecnología de anticuerpos monoclonales comparte varios rasgos característicos con otras nuevas biotecnologías porque tiene dependencia con varias disciplinas científicas como se describe en la siguiente tabla.

Tabla 2 CIENCIAS RELACIONADAS CON LA BIOTECNOLOGIA

CIENCIAS BASICAS	METODOS Y PROCESOS
<i>Microbiología</i>	<i>Mutación, selección, clonación, transformación, plásmidos</i>
<i>Virología</i>	<i>Vectores, aislamiento y propagación de virus, transducción</i>
<i>Genética Molecular</i>	<i>Localización de genes, organización de genes, mecanismos de herencia.</i>
<i>Biología Molecular</i>	<i>Biosíntesis de DNA, RNA y proteínas</i>
<i>Immunología</i>	<i>Marcadores celulares,interleucinas, hibridomas.</i>
<i>Enzimología</i>	<i>Enzimas de restricción, enzimas involucradas en la biosíntesis de DNA y RNA, transcriptasa reversa.</i>
<i>Biología Celular</i>	<i>Cultivos celulares, clonación de hibridomas.</i>
<i>Bioquímica</i>	<i>Aislamiento y purificación de genes, caracterización de DNA, RNA y proteínas, síntesis de genes, modificación de DNA, RNA y proteínas</i>

Fuente: Comercio exterior vol.39 núm. 11:1989

Esta nueva biotecnología desde principio de los años ochentas ha empezado a dar sus frutos, sin embargo, ha tardado en manifestarse en el mercado. Los pronósticos de comercialización para los siguientes años presentan variaciones amplias, ello obedece a la naturaleza de las innovaciones biotecnológicas radicales que se han dado, puesto que en muchos casos ya no se trata de participar en los mercados existentes sino de crear nuevos mercados (80).

Las estimaciones del valor global del mercado en el año 2000 oscilan entre 15,000 a 100,000 millones de dólares, aunque para algunos investigadores sólo el mercado de la biotecnología aplicada a los vegetales podría llegar a 100,000 millones de dólares en 1995 (40,67).

Estimaciones más recientes indican un mercado global de 25,000 millones de dólares al finalizar el siglo, incluidos 15,000 millones en productos farmacéuticos, 5,000 millones en agricultura, 3,000 millones en productos químicos y 2,000 millones en alimentos (25 ,67).

En México, las perspectivas de desarrollo de la biotecnología moderna no son alentadoras, la falta de inversión, la gran diversificación de proyectos de investigación de las instituciones universitarias, la escasez de personal calificado y el acentuado individualismo son los principales frenos al desarrollo de la biotecnología en nuestro país (25).

La industria farmacéutica mundial ha sido conforme a las expectativas generales de las nuevas biotecnologías la primera en beneficiarse, se estima que sobre sus ventas de productos de biotecnología, que en 1987 alcanzaron alrededor de 700 millones de dólares, cerca de 300 millones correspondieron a pruebas de diagnóstico, incluidos 200 millones de dólares para equipos de anticuerpos monoclonales y sondas de DNA. Las pruebas de diagnóstico han sido hasta ahora el mayor suceso comercial de las empresas dedicadas a esta área de la biotecnología, el resto de las ventas corresponde a siete fármacos basados en cinco proteínas humanas, una vacuna contra la hepatitis B y dos para la salud animal,

se calcula que aproximadamente 150 nuevos fármacos están en proceso de pruebas clínicas (67).

No obstante los frutos antes señalados, existe cierta decepción en cuanto al rendimiento de los biomedicamentos, la interleucina 2 y los interferones, que no ofrecieron los resultados terapéuticos esperados, la forma de aplicación inyectable y el alto costo de los productos limitan también la expansión del mercado. Sin embargo el conocimiento de respuesta inmune a nivel molecular permitirá el uso de estas y otras proteínas de una manera más adecuada.

En México, la biotecnología de anticuerpos monoclonales se reduce a la práctica de actividades de investigación con enfoque fundamentalmente básico, aunque se encuentran ya en el mercado mexicano varios kits de diagnóstico que usan anticuerpos monoclonales pero son comercializados como productos de importación.

En América Latina y probablemente en todo el tercer mundo Cuba es el único país que ha logrado desarrollar 160 productos biotecnológicos en el mercado entre ellos la estreptoquinasa, la cual sirve para disolver coágulos de arterias y venas se incluyen en este ámbito la interleucina 2 y alfa y gamma interferón que son tres promesas muy grandes en la lucha contra el cáncer. Los anticuerpos monoclonales disponibles en ese país son de aproximadamente 150 y tienen la tecnología mas avanzada en esta parte del continente en la producción de anticuerpos monoclonales humanos (51).

2.3 IMPORTANCIA EN EL DESARROLLO DE TECNICAS DE DIAGNOSTICO

La medicina clínica, la profilaxis, y los estudios epidemiológicos requieren del adecuado diagnóstico clínico. Tradicionalmente muchas enfermedades infecciosas han sido diagnosticadas por inmunoensayos, inmunohistoquímica o técnicas de cultivo, aunque esos ensayos son críticos para el diagnóstico de infecciones la respuesta inmune individual difiere y en muchos casos la detección del anticuerpo o antígeno depende de la cantidad o carga del agente infeccioso presente en un tejido específico, este fenómeno es particularmente relevante en infecciones como los retrovirus humanos (49).

Anticuerpos anti-idiotipo pueden ser usados en trasplantes de órganos y anticuerpos quiméricos interespecies en terapia, además la tecnología de DNA, (recombinante) puede permitir la producción de anticuerpos de un sólo dominio, las proteínas derivadas de anticuerpos como Fab (fracción de unión del anticuerpo) y proteínas híbridas con ambos sitios de unión antigénica y actividad de enzima específica.

La mayoría de los anticuerpos monoclonales empleados en inmunoensayos son generados frecuentemente de ratones y líneas celulares de carcinoma murino, ratas y células de ratas son utilizadas también. Células productoras de anticuerpos de otros animales han sido usadas para fusiones con células de carcinoma murino, aunque la eficiencia de generación de líneas celulares de hibridomas interespecies es baja y sólo unas cuantas de ellas secretan anticuerpos específicos (13).

Una posible solución es una fusión de la célula mortal productora de anticuerpos con una línea celular de heterohibridoma (eg. células de bazo de carnero con células de heterohibridoma de ratón) algunos de los anticuerpos monoclonales heterohibridoma que han sido preparados son de alta afinidad. Dado que los anticuerpos empleados en el desarrollo de inmunoensayos tienen como características una alta afinidad y/o avidéz se deberán tener presentes los siguientes señalamientos: muchos anticuerpos policlonales contienen anticuerpos con un amplio rango de afinidades, con constantes de afinidad o equilibrio de menos de 10^{-6} a más de 10^{-9} M anticuerpos con afinidades menores de 10^{-6}

M no son usualmente detectados por métodos estándares y los anticuerpos de alta afinidad tienden a dominar la especificidad en muchas situaciones prácticas, la alta afinidad de los anticuerpos puede comprender sólo una pequeña fracción del total.

La extrema heterogeneidad de los anticuerpos policlonales tiene consideraciones prácticas muy importantes, ya que la presencia de los anticuerpos con diferentes constantes de afinidad permite variaciones frecuentes en los resultados de los inmunoensayos e incluso variaciones interensayos. En cuanto a la calidad del suero del animal inmunizado este también puede variar de especie a especie, de animal a animal y hasta en el mismo animal cuando es inmunizado varias veces lo cual le resta sensibilidad al inmunoensayo.

Es esperado que los anticuerpos monoclonales de alta afinidad deberán ser más comunes que los de baja afinidad, dadas la características de inmunodominancia que presentan los diferentes epítopes del antígeno empleado aunque la baja afinidad de algunos anticuerpos monoclonales no se puede considerar totalmente una desventaja desde el punto de vista que facilita la separación de los componentes en la cromatografía por inmunoafinidad. La homogeneidad de los anticuerpos monoclonales significa que cada uno deberá tener una afinidad bien establecida, característica que frecuentemente no poseen los anticuerpos policlonales como ya se ha señalado (49).

El progreso de los inmunoensayos y sus aplicaciones al diagnóstico de las enfermedades ha sido debido a:

- 1).- Mejoramiento en la calidad y estandarización de reactivos debidos a desarrollos en las técnicas de hibridomas y de DNA recombinante.*
- 2).- Procedimientos de marcaje más eficientes, lo cual minimiza la pérdida de enzimas y/ o actividad del anticuerpo.*
- 3).- El diseño más sofisticado de sistemas de ensayo (p.eg. quimioluminiscencia, y bioluminiscencia).*

El inmunodiagnóstico en sus formas más variadas continuará siendo lo más útil para propósitos de identificación de agentes patógenos no sólo con los métodos serológicos más refinados sino también con el conocimiento de la respuesta inmune la cual ha avanzado rápidamente, así como el uso de procedimientos sensitivos y complejos, tales como: la inmunodifusión, inmunoelectroforesis, aglutinación, radioinmunoensayo e inmunofluorescencia y otras técnicas que han incrementado la capacidad sensitiva de los inmunoensayos como la luminescencia (49).

Como regla general los ensayos competitivos son usados cuando la especificidad es el requerimiento más importante, aunque ensayos no competitivos son usados cuando alta sensibilidad es requerida. En base a esto una alta especificidad del inmunoensayo es necesaria cuando la prevalencia de la enfermedad es baja de otro modo la mayoría de los resultados positivos serán falsos positivos. En contraste, en el caso de enfermedades con alta prevalencia el mejoramiento en la sensibilidad tiene un impacto mayor (23,49).

2.4 ALTERNATIVAS EN LAS TECNICAS DE DIAGNOSTICO

Los agentes causantes de las enfermedades infecciosas son tradicionalmente identificados por el empleo de:

- I) Bioensayos*
- II) Inmunodiagnóstico*
- III) Técnicas bioquímicas y biofísicas*
- IV) Técnicas microscópicas*

El cultivo (parte de los bioensayos) por lo general, tiene alta sensibilidad pero frecuentemente inadecuado (largos tiempos de replicación de los organismos, el tratamiento con antibióticos del paciente interfiere con el cultivo y algunas veces el agente no puede crecer in vitro) para el rápido diagnóstico y tratamiento. Sin embargo, la identificación directa continúa jugando un papel importante en el diagnóstico de las enfermedades

infecciosas, particularmente la microscopía óptica y la detección de virus por microscopía electrónica (49).

Las técnicas de diagnóstico disponibles en muchos laboratorios se han desarrollado usando antígenos, anticuerpos y técnicas de cultivo. Consecuentemente muchas enfermedades infecciosas, incluyendo diarreas asociadas con infecciones por Rotavirus, *E.coli* enterotoxigénica, *Campylobacter*, *Shigella*, *Clostridium* y *Giardia* son diagnosticadas por el uso de sondas moleculares (DNA, RNA o proteína recombinante).

En comparación de varios inmunoensayos y sondas de DNA para la detección de Rotavirus en especímenes clínicos indican que la sonda de DNA resulta ser superior a otros ensayos (27,49).

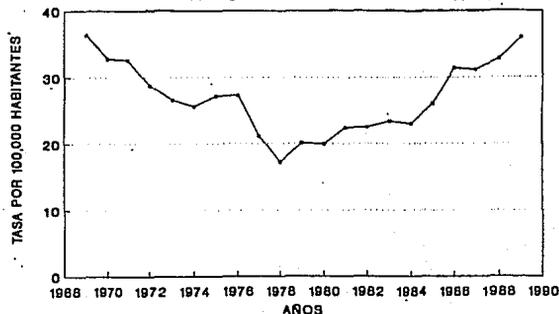
Las técnicas convencionales para la detección de anticuerpos y antígenos en cambio son empleadas en trabajos de rutina. La biología molecular ha venido mejorando el diagnóstico con la detección de microorganismos de una manera altamente sensible y ha resultado ser una herramienta útil en la investigación médica y el diagnóstico clínico, su gran ventaja es la capacidad de mayor unión a los ácidos nucleicos, que la avidéz de un anticuerpo por un antígeno por consiguiente la hibridación molecular es más sensible que algunos inmunoensayos o técnicas inmunohistoquímicas y viceversa para la detección de antígeno o anticuerpo (27). Así las técnicas de Biología Molecular proporcionan sondas sensibles para el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades infecciosas.

Sin embargo, las expectativas del incremento estadístico de personas que desarrollan tuberculosis tiende a ser mayor desde el reconocimiento de la enfermedad del SIDA que es conocida como una pandemia sobre todo en las áreas del mundo donde la tasa de prevalencia y la infección endémica por *Mycobacterium tuberculosis* es elevada (37).

Recientes estudios en Africa Central, el Caribe y en los Estados Unidos en individuos que emigran de las áreas tropicales han demostrado que la tuberculosis se presenta de una manera común con las manifestaciones clínicas de la infección por VIH y la subsecuente inmunosupresión (64).

En general, las infecciones micobacterianas comúnmente vistas en pacientes con SIDA en Estados Unidos son las debidas a *Mycobacterium avium* y aquéllas debidas a *Mycobacterium tuberculosis* fueron encontradas entre pacientes de áreas mundiales de reconocida endemicidad y entre personas con alto riesgo de tuberculosis, tales como drogadictos (26,81).

Ejemplo de ello son los estudios documentados por Handwenger (81), en donde la frecuencia de la tuberculosis es del 15.1% en pacientes con SIDA con una historia de uso de drogas parenterales y en un 4.4% de los otro pacientes con SIDA. Entre 1978 y 1985 la tasa anual de tuberculosis se duplico en la ciudad de Nueva York y mucho de este incremento fue atribuible a casos de drogadictos con SIDA (37). (gráfica 1)



Gráfica 1 INCIDENCIA DE TUBERCULOSIS DE 1969-1989 EN LA CIUDAD DE NUEVA YORK (64)

Otra evidencia de la asociación de tuberculosis e infecciones por VIH realizado en un estudio de cohorte de personas infectadas mostró que el riesgo de desarrollar tuberculosis activa es mayor, al compararse con un grupo de individuos seronegativos a este virus. Se cree que el riesgo anual de desarrollar tuberculosis activa puede ser tan alta como el 10% en una persona infectada con VIH (64).

El diagnóstico de la tuberculosis puede ser más difícil de establecer en pacientes infectados con VIH. Este problema se complica por la falta de laboratorios especializados a esta enfermedad en los países en vías de desarrollo. Entre los pacientes inmunosuprimidos por VIH con tuberculosis pulmonar, la radiografía de pulmón es frecuentemente atípica y la baciloscopia de esputo por ácido resistencia puede ser menos sensible y específica para el diagnóstico, más aún, si la inmunosupresión por VIH favorece a un incremento de enfermedades por micobacterias atípicas como sucede en Norteamérica.

En contraste, en países en desarrollo el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar se apoya exclusivamente en la radiografía de tórax y baciloscopia de esputo; el cultivo micobacteriano esta limitado sólo para los centro de salud del tercer nivel. La búsqueda de alternativas diagnósticas en países en desarrollo puede ser superado por la aplicación de sondas DNA especie-específicas o anticuerpos monoclonales que detecten *M.tuberculosis* en muestras no cultivables.

Ante el hecho de que la tuberculosis es endémica en México toda la población tiene el riesgo de padecerla. Un mexicano sano pertenece a la clasificación II de la tuberculosis en la Asociación Americana de Tórax (ATS) este grupo se caracteriza por presentar una reacción positiva al derivado protéico purificado (PPD) que es un indicador del contacto previo con *Mycobacterium tuberculosis*, sin evidencia clínica, radiológica, ni bacteriológica de la enfermedad (77).

La primoinfección creada con la administración de la vacuna de Calmette Guérin (BCG), la cual está integrada al sistema nacional de vacunación y generalmente aplicada desde la infancia tiene como fin la creación de inmunidad específica de tipo celular que se hace aparente después de 4-6 semanas por medio de la reacción positiva al PPD (77).

En países desarrollados, el contacto con *M.tuberculosis* no es tan frecuente en la población en general y la vacuna BCG no se considera necesaria. Una reacción de PPD positiva tiene un significado diferente al de los países en vías de desarrollo. La sensibilidad del PPD es de un 75% existiendo hasta un 25% de pruebas falsas negativas, este procedimiento tiene sus limitantes no es efectiva en personas con una elevada desnutrición, anergia, inmunosuprimidos y pacientes con SIDA (76).

En México, los pacientes con SIDA que desarrollan tuberculosis, quizá es debido a la reactivación de la infección primaria ya que estos individuos favorecen su desarrollo (10). *M.tuberculosis* se encuentra dentro de las cinco infecciones más frecuentes en estos pacientes como se demostró tanto en estudios nacionales como extranjeros (Tabla 2).

Tabla 3 ETIOLOGIA INFECCIOSA DE ORGANISMOS OPORTUNISTAS EN INSTITUCIONES MEXICANAS Y DEL EXTRANJERO

<i>Organismos oportunistas</i>	HGM	INNSZ	NY
<i>Pneumocystis carinii</i>	21%	27%	70%
<i>Toxoplasma sp.</i>	28%	8%	12.5%
<i>M.tuberculosis</i>	21%	24%	10%
<i>Micobacterias atípicas</i>	3%	7%	12.5%
<i>Aspergillus sp.</i>	0%	10%	---
<i>Nocardia sp.</i>	0%	3%	---
<i>Histoplasma sp.</i>	0%	10%	---
<i>Criptococcus sp.</i>	0%	7%	7.5%
<i>Citomegalovirus</i>	52%	79%	5%

HGM = Hospital General de México; INNSZ = Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán; NY = Nueva York.

La respuesta inmune celular específica que crea la primoinfección tuberculosa, debe de ser mantenida en forma ideal a través del tiempo para evitar la posibilidad de reactivación endógena del M.tuberculosis dada sus características potenciales de latencia por períodos que pueden ser muy prolongados

Una de las formas más frecuentes de fiebre de origen desconocido es la tuberculosis meníngea la cual representa alas formas extrapulmonares de esta enfermedad y la morbilidad y mortalidad en niños de los países en desarrollo es seria y en donde un temprano diagnóstico y tratamiento son esenciales para un próspero desenlace.

La tuberculosis de huesos y articulaciones es otra representante de las formas extrapulmonares y es una de las enfermedades más diseminadas en el mundo con las consecuencias de invalidez en las personas que la padecen, en este sentido las lesiones de la espina son la causa más frecuente de las deformidades con complicaciones serias.

En México un ejemplo de la distribución de la mortalidad por tuberculosis en todas sus formas se señalan más adelante de acuerdo a las estadísticas reportadas por la Secretaria de Salud (Tabla 4, Gráfica 2).

En Inglaterra, esta enfermedad tiende a declinar, sin embargo, la tuberculosis extrapulmonar en los grupos de inmigrantes de países como Pakistán, India, y Bangladesh se mantiene con una alta prevalencia, la pericarditis tuberculosa se le considera una forma rara de tuberculosis, el material fibrocaseoso y sanguíneo dentro del espacio pericardial interfiere con el llenado ventricular y produce los síntomas clásicos de la enfermedad. En Inglaterra de 3002 casos notificados de tuberculosis solo el 0.5% correspondieron a esta forma extrapulmonar (31).

La tuberculosis miliar resulta de una diseminación hematógena de un foco establecido produciendo numerosas lesiones de aproximadamente del mismo tiempo de evolución y tamaño, la cual usualmente progresa a necrosis y caseinización en múltiples órganos. La diseminación miliar es frecuentemente una complicación temprana de la tuberculosis primaria en niños (2).

Tabla 4 CASOS REPORTADOS Y MORTALIDAD POR TUBERCULOSIS EN TODAS SUS FORMAS EN MEXICO DE 1980 a 1988.(77)

AÑOS	MORTALIDAD 1	NOTIFICACION SEMANAL 2			INFOR. ANUALES OPER. 3			CIFRA ESTIMADA REAL 4		
		NUMERO	TASA	RAZON 5	NUMERO	TASA	RAZON 5	NUMERO	TASA	RAZON 5
1980	10.0	11165	16.0	1.6	27696	39.8	4.0	42666	61.2	6.1
1981	9.3	12651	17.7	1.9	24452	34.3	3.7	43174	59.8	6.4
1982	8.9	8265	11.3	1.3	21521	29.5	3.3	43623	59.8	6.7
1983	9.4	11506	15.4	1.6	19629	26.3	2.8	44626	58.4	6.2
1984	9.1	14531	19.0	2.1	19969	26.2	2.9	44578	57.7	6.3
1985	8.6	15017	19.3	2.2	18698	24.0	2.8	45000	57.0	6.6
1986	8.4	13180	16.6	2.0	18365	23.1	2.7	45391	56.4	6.7
1987	8.2	14631	18.0	2.2	19867	24.5	3.0	45800	56.0	6.8
1988	8.0	15371	18.6	2.3	19428	23.5	2.9	45976	55.0	6.9

Fuente: Dirección General de Estadística SSA.

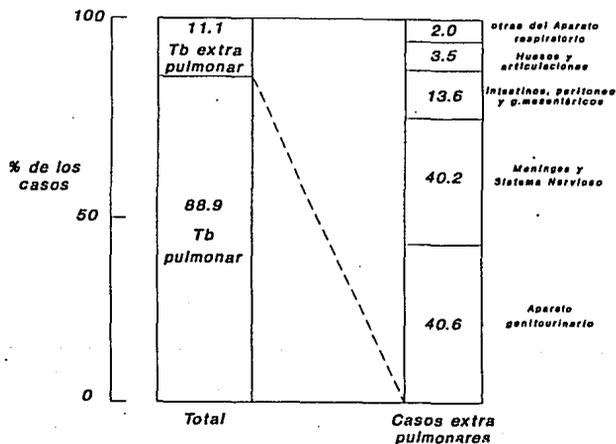
1) Las tasas de 1987 y 1988 fueron calculadas con base a la tendencia 1982-1986.

2) Dirección General de Epidemiología SSA. Sistema de notificación semanal de enfermedades.

3) Suma de los casos notificados por las oficinas centrales de Medicina Preventiva de la SSA. IMSS e ISSSTE.

4) Cifra de casos nuevos reales estimadas.

5) Número de casos nuevos por cada defunción.



Gráfica 2 DISTRIBUCIÓN DE MUERTES POR TUBERCULOSIS EN MEXICO DURANTE 1985.(77)

2.6 METODOS DE DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS

Hace más de un siglo Roberto Koch identificó al agente etiológico de la tuberculosis por cultivo y tinción de especímenes clínicos. Koch había comenzado sus experimentos de laboratorio inoculando el primer cobayo en agosto de 1881 (46).

En los 8 meses siguientes fue capaz de demostrar la naturaleza infecciosa del bacilo de la tuberculosis estudiando la histología de la tuberculosis humana y de animales. Sus descubrimientos fueron presentados el 24 de marzo de 1882 en un artículo que describe el papel etiológico de la tuberculosis a la sociedad fisiológica de Berlín, basando sus estudios en las investigaciones de Villcmein, Cohnheim y otros que demostraron la transmisibilidad de la tuberculosis (34).

Hoy día el diagnóstico de la tuberculosis es rutinariamente establecido empleando tinciones y técnicas de cultivo que no difieren sustancialmente de aquellas usadas por Koch, por ello se han dirigido investigaciones biomédicas hacia otro tipo de métodos de diagnóstico dada la diversidad desarrollada a estos se clasifican de una manera sencilla (44).

- A) CLASICOS
- B) NO INMUNOLOGICOS
- C) INMUNOLOGICOS

2.7 METODOS CLASICOS

2.7.1 TUBERCULOSIS PULMONAR

El diagnóstico de la tuberculosis es realizado rutinariamente por la observación de bacilos ácido resistentes por microscopía. El cultivo de micobacterias en medio de Lowenstein Jensen o algún otro medio sólido para primo aislamiento las micobacterias son identificadas por sus características, tales como: velocidad de crecimiento, morfología colonial, pigmentación, y perfiles bioquímicos (9).

El diagnóstico del laboratorio para tuberculosis pulmonar esta basado en la baciloscopía tradicional de Ziehl-Neelsen que se fundamenta en la tinción de acidorresistentes y se observa la coloración por fucsina de la pared celular hacia la estructura de ácidos micólicos de las micobacterias. Esta técnica aunque es rápida y económica no es de alta de sensibilidad, en especímenes de esputo por ejemplo, sólo puede ser usado para detectar el bacilo en concentraciones de 10,000 organismos por mililitro o más (19).

Aunque el esputo es fácilmente disponible en pacientes con la enfermedad avanzada es difícil obtener los especímenes en pacientes con la enfermedad menos extensa, y de niños los cuales característicamente no producen esputo. La baciloscopía por Ziehl-Neelsen no es específica porque no puede distinguir entre especies de micobacterias. En pacientes inmunocomprometidos o con SIDA este problema aumenta por las infecciones oportunistas con las micobacterias atípicas como es caso del complejo *M. avium-intracelulare*, o con otras micobacterias diferentes a *M. tuberculosis* (3,76).

El cultivo de *M. tuberculosis* en el laboratorio es sensible de 10 a 100 organismos viables por muestra, pero debido a los largos tiempos de cultivo (6 a 8 semanas) necesarios para el crecimiento óptimo de este microorganismo frecuentemente las decisiones

clínicas y terapéuticas deberán ser hechas antes que el diagnóstico de laboratorio esté disponible lo cual implica una decisión de mucho riesgo (19).

Existen algunas limitaciones en los métodos clásicos de diagnóstico de *M.tuberculosis* y es cuando este patógeno se encuentra presente en un número relativamente pequeño y frecuentemente el cultivo es negativo.

2.7.2 METODOS TRADICIONALES A LAS FORMAS EXTRAPULMONARES

Al presente, los métodos clásicos para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar son: la baciloscopia por tinción de ácido resistentes y microscopía con el subsecuente cultivo de *M.tuberculosis*. La dificultad de identificar a *M.tuberculosis* por baciloscopia por ejemplo, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) es muy difícil.

El cultivo de la micobacteria en las formas extrapulmonares cuando el resultado es favorable se alcanza en semanas 6 semanas en promedio y en LCR las características son cambios citológicos y bioquímicos conocidos mismos que ayudan al descubrimiento de la lesión tuberculosa, sin embargo estos parámetros son variables o bien se encuentran ausentes (4,14).

El diagnóstico de la meningitis tuberculosa es realizado usualmente en base a una historia de exposición como son: el cuadro clínico, las características del LCR, prueba positiva a la tuberculina, la baciloscopia y el cultivo de *M.tuberculosis*, sin embargo, de acuerdo a investigaciones realizadas los cultivos son positivos en el intervalo comprendido del 55 al 75 % de los pacientes (43,48).

En un estudio realizado por Molavi y Lefrock en 1985 (14) identificaron este patógeno por baciloscopia en baja proporción (10-40%) y por cultivo (45-90%)(13). En otro estudio Kennedy y Fallon en 1979 (43) establecieron que los especímenes de LCR fueron positivos en un 37% por baciloscopia directa y en un 52% en cultivo.

Nuevos ensayos para el rápido diagnóstico de meningitis tuberculosa han sido recientemente propuestos, todos ellos están basados en la examinación del LCR. Ellos son considerados en el sentido más estricto como métodos indirectos usualmente cuantificando un producto de la respuesta del huésped a esta infección y los métodos directos que miden un producto metabólico del agente infectante. Los métodos directos hasta ahora reportados tienen la especificidad deseada pero esta debe de ser determinada y cuantificada cuidadosamente por validaciones clínicas en muestras de los pacientes infectados.

La especificidad puede ser asegurada cuando un gran número de controles positivos y negativos son incluidos; y los controles negativos deberán comprender no sólo de personas sin evidencia de meningitis sino también de muestras clínicas de personas con formas de meningitis por otros microorganismos que semejan una tuberculosis lo cual llevaría a definir de una manera correcta la sensibilidad y la especificidad de la nueva metodología de diagnóstico propuesta (15).

De acuerdo a esto cualquier propuesta de algún método de ensayo para el rápido diagnóstico de meningitis tuberculosa deberá ser analizado y comparado con los resultados reportados para baciloscopia y cultivo. El riesgo potencial de resultados falsos positivos deberá ser minimizado para evitar una terapia inadecuada, por ejemplo, resultados falsos positivos por la aplicación de estos métodos se han manifestado en los casos de meningitis piogénica y en menor proporción en casos de meningitis aséptica (48). Los nuevos métodos de diagnóstico propuestos hasta ahora se describen a continuación.

2.7.3 METODOS NO INMUNOLOGICOS

Desde 1987 las sondas de ácidos nucleicos para la identificación del complejo de *M.tuberculosis*, (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum* y *M.microti*) *M.avium* y *M.intracelulare* están disponibles por Gene Probe Inc. San Diego California. La sensibilidad de estas sondas es similar a la tinción de Ziehl-Neelsen y su uso para la detección de *M.tuberculosis* en especímenes clínicos es por lo tanto, cuestionable (19,70).

Así la falta de sensibilidad de la sonda de DNA fue motivo del desarrollo de la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Esta técnica esta bien desarrollada y ha sido extensamente usada para el diagnóstico de numerosas enfermedades infecciosas incluyendo las de etiología bacteriana. Los estudios iniciales desarrollados para *M.tuberculosis* fueron de Brisson-Noel y cols.(5) amplificaron un fragmento de DNA de 383 pb el cual codifica en parte para el antígeno micobacteriano de 65 Kb. Eisenach y cols.(21) amplificaron un fragmento de 132 pb el cual se encuentra repetido algunas veces en el cromosoma. Este ensayo también ha sido capaz de distinguir miembros del complejo de *M.tuberculosis*.

Patel y cols.(61) empleando bajas temperaturas de "enrollamiento" en su ensayo encontraron una marcada amplificación inespecífica de material genético de micobacterias no tuberculosas por un producto de PCR. En un ensayo alterno Shankar y cols.(14) amplificaron un fragmento de 240 pb. Todos estos estudios para la detección específica del complejo *M.tuberculosis* deberán ser orientados para su validación en situaciones específicas de tuberculosis; por ejemplo hepatitis granulomatosas, meningitis, tuberculosis cutánea etc.

El procesado del espécimen es simple y rápido, en el 60% de los casos los resultados son obtenidos por electroforesis en gel de agarosa dentro de las 8 horas de obtenida la muestra, dos días pueden ser requeridos con la hibridación con la sonda específica.

En otro estudio se identificaron elementos genéticos en el DNA de *M.tuberculosis* que se encontraban presentes en múltiples copias en el genoma de este microorganismo y mostraba un patrón de bandas polimórficas por electroforesis. En diferentes aislamientos, el IS986 se encontró sólo en especies que pertenecen al complejo de *M.tuberculosis*, sin embargo, se encontró con menos frecuencia en *M.bovis* BCG y concluyeron que la búsqueda de este elemento de inserción puede ser útil para el diagnóstico y estudios de epidemiología de la tuberculosis (35).

Otros métodos no inmunológicos diferentes a los de la Biología Molecular han sido desarrollados, como un método para la saponificación de micobacterias usando metanol e hidróxido de sodio o un tratamiento con BF_3 en metanol y su extracción con una mezcla

de cloroformo-hexano. Los productos de hidrólisis se analizan por cromatografía gas-líquido (CGL). Un esquema para su identificación fue desarrollado en base a su perfil de ácidos grasos para cada especie de micobacteria. Este sistema ha sido usado en el laboratorio de micobacteriología de la Clínica Mayo desde 1982 (44) el cual es altamente específico y reproducible y rápido (<2h).

Una modificación del método mencionado esta disponible comercialmente como un sistema de identificación microbiano el cual consiste de un cromatógrafo de gases (HP5890A; Hewlett-Packard; Con. Palo Alto Calif.) y una computadora (Serie HP 310; HP98561A). Esta última utiliza un software que contiene una librería de lípidos de pared celular de las especies de micobacterias de importancia clínica, la librería esta compuesta de una colección de especies bien caracterizadas incluyendo las del American Type Culture Collection y de numerosos aislados clínicos para 26 especies de micobacterias (4).

Otro adelanto a el diagnóstico de enfermedades micobacterianas es la detección del ácido tuberculoestéarico en especímenes clínicos usando espectrometría de masas. Este sistema aun no esta disponible para su uso en laboratorios de rutina (45). Una técnica de análisis de ácidos micólicos ha sido desarrollada recientemente empleando cromatografía de líquidos en alta presión en donde se prepara un derivado de ácidos micólicos como ésteres de p-bromofenacilo y se compara con estándares de especies micobacterianas conocidas (7).

Por esas razones varios métodos han sido usados como ayuda en el diagnóstico, incluyendo el de Levinson, y cols.(13,68) con los ensayos de partición de triptófano y bromo, la detección de 3-(2'-cetohehexil)indolina y de ácido tuberculoestéarico y la medida de actividad de adenosin deaminasa .

Estas técnicas son complejas y requieren de equipo especializado el cual no está disponible en cualquier laboratorio de rutina y su confiabilidad no ha sido evaluada y no cuentan con mucha aceptación.

El uso de la técnica radiométrica (BACTEC.USA) es un método para detectar el crecimiento temprano de las micobacterias en el cultivo el cual emplea un substrato radiomarcado con C^{14} que es específico a la micobacteria (62).

*Este método promueve el rápido crecimiento de microorganismos con un promedio de 9 días; en la identificación específica de *M.tuberculosis* requiere de 5 días y la susceptibilidad de resistencia a drogas 6 días siendo un gran adelanto, ya que permite disminuir el tiempo de la identificación del bacilo tuberculoso, pero aun así es considerado lento en diagnóstico de la tuberculosis meníngea (3,14,44).*

Con estas características favorables, los nuevos métodos de diagnóstico proponen además que su procedimiento sea rápido y fácilmente aplicado en laboratorios de rutina, el desarrollo sin instrumentos costosos, ni isótopos radiactivos, lo cual es aun una limitante en los métodos de diagnóstico basados en la Biología Molecular y en el sistema BACTEC.

2.7.4 METODOS INMUNOLOGICOS

La identificación serológica de la infección es ampliamente usada en medicina y el problema del diagnóstico bacteriológico permitió una aplicación temprana de tales técnicas en tuberculosis. El primer reporte del serodiagnóstico de tuberculosis fue debido a Arloing el cual fue publicado en 1898 (15) sólo después de 16 años del descubrimiento del bacilo de la tuberculosis por Koch.

Arloing desarrolló una prueba de aglutinación y reportó que especímenes de suero, del 57% de los pacientes con tuberculosis pulmonar fueron positivos, en este trabajo son muy pocos los detalles descritos y el número de los especímenes de suero no se reportaron. Durante las siguientes 8 décadas, muchas técnicas serológicas se describieron para el serodiagnóstico de las enfermedades micobacterianas pero sin utilización rutinaria (15).

En 1972 Engvall y Perlmann (15) describieron una técnica altamente reproductiva y sensible de un inmunoensayo enzimático (ELISA). Esta técnica no requiere instrumentación sofisticada, los reactivos que emplea no son caros y ha sido ampliamente usada en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Los inmunoensayos enzimáticos son llevados a cabo para conocer la actividad del anticuerpo como la concentración de antígeno, la cuantificación o determinación de la actividad de esos 2 inmunorreactantes es muy diferente, el antígeno esta generalmente bien definido y en concentraciones de nanogramos por mililitro pueden ser detectados (15).

El empleo de técnicas para el inmunodiagnóstico ha permitido también el desarrollo de técnicas simples, confiables y accesibles a los laboratorios de análisis clínicos por ejemplo, ELISA. Sin embargo, no se ha dispuesto de un reactivo inmunológico adecuado comercial que permita una alta sensibilidad o especificidad en el diagnóstico de la tuberculosis (74,79,83).

La sensibilidad de ELISA reportada es de 75 % cuando es usada en estudios de poblaciones de alta prevalencia de tuberculosis. En general, la frecuencia de tuberculosis es mayor en países en desarrollo al compararse con los países industrializados. Esta alta sensibilidad por ELISA debería ser adoptada como un diagnóstico presuntivo en países en desarrollo. Este ensayo de ELISA es superior a baciloscopia de muestras de esputo que es lo utilizado actualmente (3,4).

El método de ELISA fue empleado para detectar antígenos micobacterianos en tejidos animales. ELISA fue empleado por vez primera para detectar el antígeno en los fluidos corporales en la tuberculosis humana. La tendencia durante los últimos años ha sido el desarrollar métodos que puedan hacer fácilmente el diagnóstico clínico en períodos cortos de tiempo. No se han reportado estudios en pacientes con sospecha de tuberculosis y baciloscopia negativa que es probablemente la población en que se tenga mayor utilidad los inmunoensayos (73,79).

El método ideal para un diagnóstico rápido y específico de las enfermedades infecciosas incluyendo tuberculosis probablemente sea la detección directa del antígeno en especímenes clínicos. Actualmente, estos métodos rápidos han sido aplicados sólo a la detección de antígenos en LCR de pacientes con meningitis tuberculosa y en esputo de un número limitado de pacientes con tuberculosis pulmonar, es necesario investigar sobre posibles aplicaciones y detectar antígenos en otros líquidos corporales tales como: el pleural, sinovial, peritoneal y el sanguíneo (14,16).

La detección de antígenos micobacterianos en sangre es importante, en pacientes mal nutridos y con SIDA es en donde se ha observado un alto grado de micobacteremia. La demostración de complejos inmunes circulantes en pacientes con tuberculosis pulmonar sugiere que hay antígenos libres micobacterianos que pueden estar presentes en la sangre de pacientes con la infección menos severa, por lo tanto, el ensayo también deberá ser aplicado a muestras de sangre de estos pacientes (14,76).

El serodiagnóstico en las infecciones micobacterianas ha sido estudiado por largo tiempo y su reproducibilidad y confiabilidad han sido reportados. Los principales obstáculos encontrados en el serodiagnóstico de las infecciones micobacterianas es la baja especificidad y la no estandarización de las técnicas para un uso rutinario (15).

Una variedad de antígenos incluyendo antígenos micobacterianos crudos, tuberculina y antígenos micobacterianos purificados han sido empleados en la detección de anticuerpos contra micobacterias, la sensibilidad y la especificidad de las pruebas serológicas depende del tipo de antígeno usado, una alta especificidad es alcanzada con el antígeno purificado (76,86).

Recientemente, algunos métodos inmunológicos han sido desarrollados para detectar antígeno libre en LCR de pacientes con tuberculosis meníngea, como primeros antecedentes al diagnóstico con los inmunoensayos para esta enfermedad se encuentran las investigaciones de Sada y cols.(75) quienes desarrollaron un inmunoensayo con BCG comercial y anticuerpos anti-BCG. La especificidad de la prueba fue del 95% y la sensibilidad de 81.25%.

Bal y cols. (14) establecieron una inhibición competitiva usando bacilos de *M.tuberculosis* irradiados con un absorbente de fase sólida para la medir antígeno micobacteriano en LCR el cual se encontró en 7 pacientes cuyo diagnóstico de meningitis tuberculosa fue confirmado en 6 y uno no confirmado.

No se encontró en 32 muestras de LCR de pacientes control con las enfermedades neurológicas no tuberculosas, el ensayo para un paciente fue positivo pero después se encontró un absceso cerebral y se valoró como falso positivo.

En el serodiagnóstico de tuberculosis por ELISA la sensibilidad ha sido muy similar con todos los antígenos empleados, pero difiere en áreas con alta y baja prevalencia de tuberculosis, de acuerdo a esto, se ha establecido una sensibilidad de 76 a 94 % mientras que la especificidad de ELISA depende del antígeno usado (14,15) (Tabla 5 y 6)

Tabla 5 RESULTADOS DE SEROLOGIA EN TUBERCULOSIS USANDO EL METODO DE ELISA (16,76)

<i>Antígeno</i>	<i>Sensibilidad (%)</i>	<i>Especificidad (%)</i>
<i>BCG</i>	<i>76</i>	<i>97</i>
<i>Crudo</i>	<i>55-94</i>	<i>84-97</i>
<i>Antígeno 5</i>	<i>48-84</i>	<i>91-100</i>
<i>Citoplasmático</i>	<i>94</i>	<i>96</i>
<i>Lipoarabinomana</i>	<i>72-80</i>	<i>92</i>

Tabla 6 **DETECCION DE ANTIGENOS DE *M.tuberculosis* EN DIFERENTES ESPECIMENES CLINICOS (16,76).**

<i>Especímen</i>	<i>Método</i>	<i>Sensibilidad (%)</i>	<i>Especificidad (%)</i>
<i>LCR</i>	<i>ELISA</i>	70	98.7
	<i>Látex</i>	96	99.3
<i>Espuito</i>	<i>ELISA</i>	60	80.0
<i>Suero</i>	<i>RIA</i>	77	ND**
	<i>ELISA</i>	45	ND

LCR = Líquido cefalorraquídeo; ND = No determinado

Hernández y cols.(14) emplearon una ELISA capaz de detectar IgG e IgM al estudiar 20 muestras de LCR de pacientes con meningitis tuberculosa bacteriológicamente confirmada y 70 muestras control de pacientes con otras formas de meningitis y sin evidencia de meningitis. El valor de corte del ensayo fue 0.20 de todas las muestras de LCR de pacientes con meningitis tuberculosa fueron positivos y ninguna de las muestras control resultaron falsos positivos.

Coovadia y cols.(15) colectaron muestras de LCR de 37 niños con meningitis tuberculosa, 49 niños con otras formas de meningitis y 14 niños con tuberculosis pulmonar y sin evidencia de meningitis.

Daniel y cols.(15) detectaron IgG por ELISA empleando antígeno 5 de *M. tuberculosis* entre 37 muestras de LCR con meningitis tuberculosa 7 fueron positivas en la dilución 1:40 y 4 en la dilución 1:80, entre los sujetos control 60 de 63 fueron negativos (1:80) con un falso positivo a esa misma dilución que demostró ser específico para la tuberculosis meníngea.

La técnica de aglutinación en látex ya está en uso en muchos laboratorios y tiene amplia aceptación para la detección de antígenos de bacterias causantes de meningitis piógena. Mismo que ha sido propuesto de utilidad en el diagnóstico de *M.tuberculosis* en líquido cefalorraquídeo.

Hace pocos años Krambovitis y cols.(48) desarrollaron una prueba simple de aglutinación con partículas de látex para la rápida detección de *M.tuberculosis* a un antígeno de membrana plasmática en las muestras de LCR previamente calentado a 56°C por 1 h los anticuerpos específicos son adicionados y la reacción de aglutinación se manifiesta en los siguientes 3 minutos.

En este estudio el antígeno micobacteriano fue detectado en las muestras de 18 pacientes con tuberculosis meníngea, el diagnóstico fue confirmado en 15 de 18 casos por la presencia de bacilos acidorresistentes en frotis de LCR centrifugado y uno fue confirmado por cultivo de muestra de necropsia, en los restantes 2 pacientes el diagnóstico fue realizado por sospecha basado en resultados citoquímicos compatibles con meningitis en LCR y apoyados por la evidencia clínica epidemiológica.

En 139 de muestras de control de LCR sólo un niño con *H.influenzae* tipo b con absceso subdural manifiesto un resultado falso positivo, la especificidad de la prueba fue del 99.3% y la sensibilidad de 96 % con resultado falso negativo de las 18 muestras. La gran sensibilidad con la prueba de aglutinación en látex fue debida al gran número de LCR de pacientes con meningitis tuberculosa confirmada.

En este estudio el antígeno de tuberculosis fue detectado en el LCR de los pacientes en la primera y segunda etapa de la enfermedad. Esta observación es importante puesto que significa que el diagnóstico de tuberculosis meníngea puede ser establecido en etapas tempranas de la enfermedad permitiendo a los médicos la administración de una rápida terapia, la muestra inicial de 12 pacientes fue negativa aunque 2 subsecuentes muestras dieron resultados positivos (48).

Los estudios con anticuerpos monoclonales a antígenos micobacterianos se han concentrado en la demostración de antígenos especie-específicos y su aplicación en el serodiagnóstico de tuberculosis y lepra, pero existen otros aspectos en la relación huésped-parásito en las enfermedades micobacterianas que pueden beneficiarse del uso de los anticuerpos monoclonales por sus características específicas (30,39).

Los primeros experimentos que emplearon anticuerpos monoclonales a *M.tuberculosis* se reportaron en 1981 por Coates y cols.(12) con el fin de reconocer la diversidad antigénica de este patógeno y de *M.bovis*. Damiani y cols. han logrado producir anticuerpos monoclonales a diferentes estructuras proteicas de *M.tuberculosis* como son los antígenos de 28, 35 y 65 kilodaltones.

Hewitt y cols.(36) emplearon anticuerpos monoclonales en el diagnóstico sérico para *M.tuberculosis* en base a una inhibición competitiva del suero humano por anticuerpos monoclonales murinos marcados con el isótopo radiactivo de 125 que se unen a una fase sólida que contiene un prensado de *M.tuberculosis*.

El suero de pacientes pero no así el de sujetos sanos compitieron de una manera efectiva contra los anticuerpos monoclonales marcados, esta técnica elimina la necesidad de purificar antígenos.

Sin embargo los anticuerpos monoclonales resultaron ser más positivos al ensayo entre ellos la mejor combinación fue con 2 anticuerpos monoclonales con resultados positivos en el 71% de los 41 pacientes estudiados los cuales mostraron tuberculosis pulmonar diagnosticada con baciloscopia positiva.

Kalish y cols.(14) estudiaron anticuerpos a PPD en LCR y anticuerpos IgG fueron establecidos en tres pacientes con meningitis tuberculosa.

Posteriormente los trabajos de Gillis y cols.(30) describen el uso potencial de anticuerpos monoclonales para el reconocimiento de *M.leprae* por ELISA e inmunofluorescencia y encontraron 2 anticuerpos monoclonales que reconocen sólo a *M.leprae* y nueve que mostraron un patrón único de reactividad para este bacilo por ELISA.

Los protocolos descritos en la producción de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales han empleado antígenos de *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.leprae* o *M.lepremurinum* (39,60) aunque el bacilo tuberculoso y extractos antigénicos libres de células se han usado para inmunizar ratones en protocolos dirigidos a la producción de los anticuerpos monoclonales contra *M.tuberculosis*, así como el empleo de este tipo de anticuerpos en el reconocimiento de antígenos micobacterianos obtenidos por ingeniería genética (71).

La micobacteria viva fue prensada y destruida usando una prensa X en razón de minimizar la desnaturalización de proteínas intracelulares, similarmente extractos ultrasónicos de micobacteria viva han sido usados en la producción de anticuerpos monoclonales a *M.bovis*, antígenos de *M.leprae* y *M.lepremurinum* fueron derivados de irradiar micobacteria con Co^{60} , es importante señalar que los extractos celulares sonicados de *M.leprae* se manifestaron en anticuerpos hacia antígenos especie específicos (39).

Un taller internacional realizado en 1985 (39) por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como parte de un programa para el desarrollo de vacunas y dedicado a caracterizar la especificidad de los patrones de reacción de anticuerpos monoclonales murinos hacia diversas micobacterias, reunieron los resultados de 31 anticuerpos monoclonales (28 de líquidos de ascitis y 3 de sobrenadante de cultivo celular) generados en cuatro diferentes laboratorios de investigación en los cuales emplearon antígenos micobacterianos (*M.tuberculosis* H37Rv, H37Ra, *M.bovis* BCG y *M.leprae*) para la inmunización de ratones.

Estos anticuerpos fueron clasificados, alicuotados y distribuidos a doce laboratorios para su análisis empleando una gran variedad de métodos de escrutinio en el diagnóstico de tuberculosis y lepra. Tal es el caso del radioinmunoensayo indirecto (RIA) con anticuerpos monoclonales procedentes del sobrenadantes de cultivo celular hacia los antígenos micobacterianos y la reacción antígeno-anticuerpo fue detectada empleando inmunoglobulinas de conejo marcadas con I^{125} hacia los anticuerpos monoclonales de ratón.

En los controles el antígeno fue reemplazado con suero normal de ratón (control de 100%) y albúmina sérica bovina (control de 0%). La aplicación de RIA requiere toda la noche de incubación con el conjugado del radioisótopo (39).

ELISA fue utilizada durante la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos a *M.leprae* y *M.bovis* con un protocolo experimental similar al de RIA pero diferenciándose en el uso de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con peroxidasa y adicionando o-fenilendiamina / H_2O_2 o ácido 5 aminosalicílico / H_2O_2 fueron empleados. La inmunofluorescencia indirecta fue utilizada en estudios con *M.leprae* y *M.lepraemurinum*, donde suspensiones 10^7 10^8 bacilos por mililitro fueron sonicados y

secados en laminillas de vidrio. Después de fijar la muestra en acetona algunas gotas del sobrenadante del cultivo fueron adicionadas a las laminillas e incubadas en cámara húmeda.

Los anticuerpos monoclonales unidos a el antígeno fueron detectados por la adición de inmunoglobulinas de cabra anti-ratón conjugadas con fluoresceína y las laminillas fueron examinadas microscópicamente por inmunofluorescencia bajo luz ultravioleta (39).

La gran mayoría de los anticuerpos producidos contra micobacterias parecen estar dirigidos hacia antígenos intracelulares. El bacilo en su estado natural que recubrían placas de ELISA fue identificado por anticuerpos de clonas que secretan anticuerpos a componentes superficiales de micobacterias.

El enlace de diferentes anticuerpos monoclonales a micobacterias fue determinado por titular el anticuerpo contra extractos estandarizados de antígenos micobacterianos, un programa de computadora fue usado para realizar las curvas y calcular el valor máximo de enlace (MB%) y determinar los títulos a los cuales el 50% del enlace ocurre (ABT 50). El valor máximo de MB% fue relativo al control de enlace del 100% el cual comprende pozos cubiertos con suero normal de ratón en lugar de antígeno micobacteriano, así la comparación de títulos de ABT 50 de un anticuerpo monoclonal cuando es titulado contra una micobacteria diferente, de esta forma fue posible comparar la homología de epítopes reconocidos por un anticuerpo cuantitativamente (39).

Aunque los valores de MB% pretenden ser representativos para concentraciones relativas de antígeno en los extractos solubles ensayados, esos valores también pueden ser influenciados por el isotipo de anticuerpo y la especificidad del anticuerpo marcado por lo cual las variaciones dentro de una misma clase de anticuerpo depende de la calidad del anti-anticuerpo (39).

Los estudios con estos anticuerpos monoclonales también mostraron la existencia de algunos determinantes antigénicos casi especie específicos y sus diferentes pesos moleculares. La parcial purificación de esos antígenos mediante cromatografías de afinidad basadas en anticuerpos monoclonales fue realizada para *M.leprae* pero poco fue reportado para *M.tuberculosis* y *M.bovis* (41).

Los datos obtenidos sobre la posibilidad de serotipificar con anticuerpos monoclonales las diversas especies y cepas de micobacterias parece restringido dada la presencia de reactividades cruzadas, la mejor manera de establecer la diferenciación micobacteriana es el empleo de una batería de anticuerpos monoclonales pero se requieren más avances y el desarrollo de líneas de investigación de este tipo lo cual sería de utilidad para una posible aplicación de estos anticuerpo en el diagnóstico de laboratorio (39).

Es conveniente señalar que no existe hasta ahora un método ideal para el diagnóstico de la tuberculosis el cual debe contar con las siguientes características: alta sensibilidad y especificidad, bajo costo, fácil y rápida realización.

2.7.5 ANTIGENOS MICOBACTERIANOS.

Muchos agentes infecciosos han sido definidos por sus antígenos y contra los cuales existe la producción de anticuerpos, y las reacciones antígeno-anticuerpo pueden ser medidas en un período corto de tiempo. Algunos ensayos inmunológicos de la detección directos de diferentes agentes infecciosos en diferentes líquidos corporales han sido totalmente caracterizados.

La superficie externa de micobacteria consiste predominantemente de lípidos y carbohidratos algunos de los cuales son reconocidos por anticuerpos, el posible papel de los lípidos de cápsula que es la envoltura externa que interacciona con el huésped y es la que permite la sobrevivencia de la micobacteria y la capacidad de proteger contra bacilos virulentos, esto se puede relacionar con la patogénesis e inmunogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis (4).

Así los lípidos, altamente inmunorreactivos, los glicoconjugados de las paredes celulares micobacterianas libres en el citoplasma bacteriano y membrana, aparentemente contienen péptidos o proteínas con fuerte actividad como tuberculina y los esfuerzos en definir, por lo menos el denominador común en la actividad adyuvante del muramíl dipéptido inicialmente involucrado las en las reacciones inmunológicas inespecíficas y presente en las paredes celulares de las micobacterias.

El crecimiento en el medio líquido permite la conformación en serpentina del bacilo de la tuberculosis y es denominado factor de cordón y es responsable en cierta forma de su virulencia, químicamente es trealosa 6,6' dimicolato. Los sulfátidos han sido correlacionados en un orden relativo de virulencia para un número de cepas de tipo silvestre del bacilo de la tuberculosis los cuales se encuentran claramente orientados en la pared celular (4,86).

Daniel y Todd (17) establecieron una distribución de los antígenos micobacterianos principales, notoriamente el antígeno 5 estuvo limitado a filtrados de cultivo de *M.tuberculosis*, y *M.bovis* en las 14 especies estudiadas, los antígenos 6, 7 y 8 estuvieron presentes en los filtrados de la mayoría de estas especies, y una evidencia fue que los antígenos 6 y 7 estaban presentes en las moléculas que contienen antígenos ampliamente distribuidos, entre ellos los antígenos 1 y 2 que se encuentran como

componentes principales de las micobacterias y probablemente con otros géneros micobacterianos.

Algunas proteínas citoplasmáticas micobacterianas antigénicas son de especie, es decir, son más específicas, tales como: el antígeno 5 este nombre se debe al sistema de referencia para nombrar a los antígenos micobacterianos. Por estudios de inmunolectroforesis conocido también como sistema de referencia de Estados Unidos-Japón y que se encuentra limitado a *M.tuberculosis* y *M.bovis* entre 14 diferentes especies de micobacterias estudiadas (17).

En forma histórica la electroforesis en geles de poli(acrilamida) permitió el mejor estudio de los antígenos micobacterianos, así se lograron identificar más de 30 antígenos proteicos diferentes de *M.tuberculosis*. Posteriormente el desarrollo de la inmunolectrotransferencia (Western blot o inmunoblot) permitió el estudio de estos antígenos identificándolos con anticuerpos específicos. Al mismo tiempo existió un amplio desarrollo en la producción de anticuerpos monoclonales.

En lo referente a los polisacáridos arabinogalactana se encuentra covalentemente unida a péptidoglicanos y ácidos micólicos de alto peso molecular que constituyen aproximadamente el 35% de la masa celular de muchas micobacterias. Aunque los polisacáridos han sido objeto de intensa investigación por algunas generaciones de investigadores, Misaki y cols.(57,58) claramente muestran que el polímero estaba compuesto de D-arabinosa y D-galactosa. Los residuos arabinosil son predominantemente 5-arabinofuranosa y los de galactosa pueden ser ya sea 4-galactopiranososa o 5-galactofuranosa. El segundo polisacárido comúnmente encontrado en la pared celular de *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Nocardia* es arabinomanana.

R.J Anderson (7) ha señalado que dentro de la pared celular de *M.tuberculosis*, lipoarabinomanana (LAM) se encuentra asociado con todos los elementos patogénicos de esta enfermedad incluyendo los factores que son responsables de la necrosis caseosa y otros elementos de hipersensibilidad, antígenos responsables de la inmunidad humoral, agentes de toxicidad y muchos antígenos involucrados en la inmunidad protectora por ejemplo la respuesta vigorosa de los anticuerpos en pacientes con tuberculosis y en todas las formas de micobacteriosis son dirigidas inicialmente a enlaces α -arabinofuranosil (Araf) que son unidades de peptidoglicano unidas a complejos de arabinogalactanas y la lipoarabinomanana de pared celular que se extienden en menor cantidad en el manopiranosil terminal (Manp) a unidades del fosfatidil inositol, manósidos de la membrana citoplasmática (56).(Figura 3)

El trabajo de Misaki y col.(17,56) permitió el aislamiento de polisacáridos libres de proteínas, los 4 polisacáridos principales purificados fueron arabinogalactanas,

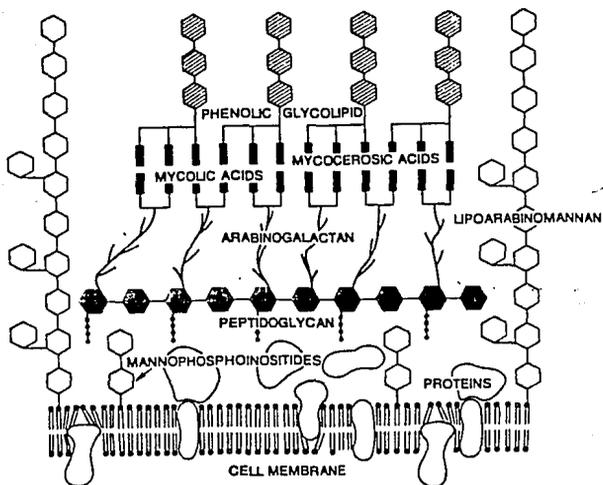


Figura 4 ESTRUCTURA DE PARED CELULAR DE *Mycobacterium leprae*(7)

Las arabinogalactanas y arabinomananas estudiadas por Aziima fueron capaces de elucidar reacciones de hipersensibilidad cutánea inmediata, reacciones serológicas y anafilaxia cutánea pasiva, pero incapaces de elucidar reacciones de hipersensibilidad tardía (56).

LAM fue originalmente descrito como un polisacárido libre en citoplasma micobacteriano (arabinomanana) el cual se purificó por hidrólisis alcalina. Recientemente se ha descrito que la molécula nativa, sin embargo, posee un segmento de lípidos adicionales a los residuos de inositol fosfato estos serían los grupos asilados del lactato y succinato (38).

El antígeno de lipoarabinomanana aislado de *M.leprae* y *M.tuberculosis* es altamente inmunogénico y se ha caracterizado parcialmente (38). Lipoarabinomanana no es un antígeno exclusivo de *M.tuberculosis* por lo que tiene reacciones cruzadas con otras micobacterias, tales como: *M.leprae*, y es posible que este antígeno tenga reacciones cruzadas con hongos microscópicos (50,87) .

Existe un alto grado de similitud química o identidad entre polisacáridos aislados de varias micobacterias *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.kansasii*, *M.smegmatis* y *M.phlei*, de hecho microorganismos como *Corynebacteria* y *Nocardia* son ejemplos también de similitud estructural con la micobacteria. La identidad antigénica esta correlacionada con la similitud química que se ha demostrado para arabinogalactanas derivada de esos organismos.

En contraste se han propuesto estructuras como manosa-arabinosa similares en otros microorganismos tales como hongos y levaduras. En el caso de *Nocardia* y *Corynebacteria* se han encontrado estructuras de pared celular constituidas de arabinosamano (1,50,59,21).

Recientemente se ha reportado la presencia de determinantes específicos a LAM de *M.tuberculosis*, lo que apoya de manera muy importante que la similitud en su estructura con otros microorganismos no implica ser inmunológicamente idénticos.

Recientes estudios de Chan y cols.(11) han señalado a lipoarabinomanana como un posible factor de virulencia el cual permite la persistencia de *M.tuberculosis* dentro de macrófagos al descubrirse los mecanismos de evasión hacia las funciones microbicidas efectoras en fagocitos mononucleares. Así como estudios relacionados a mecanismos de inmunosupresión han sido descritos por Ellner y cols.(22).

Por sus peculiaridades antigénicas LAM puede ser un antígeno para uso en el diagnóstico serológico de la tuberculosis y el desarrollo de un ensayo clínico dependería de la producción de este antígeno y del interés de una producción comercial (73,76).

*Un gran avance en los ensayos serológicos para hacerlos más específicos y capaces de diferenciar especies de micobacterias están basados en anticuerpos monoclonales y sus resultados servirán para guiar una terapia más racional. Los anticuerpos monoclonales como los descritos por Minden y cols.(55) por ejemplo reaccionan contra una proteína sólo presentes en *M.tuberculosis* y *M.bovis* BCG pero no en otra especie de micobacteria.*

De igual manera se consideran los estudios reportados por Sada y Brennan (72,73) empleando antígeno de lipoarabinomanana los resultados obtenidos son considerados muy promisorios por su sensibilidad y especificidad.

*Ante todo lo expuesto cabe señalar que hasta el momento no existe en disponibilidad comercial algún método de inmunodiagnóstico de fácil uso o aplicación con alta sensibilidad y especificidad que pueda ser empleado en el reconocimiento de *M.tuberculosis* en especímenes clínicos en las diferentes instituciones hospitalarias de México.*

3. HIPOTESIS

La infección por M.tuberculosis en el humano es muy compleja debido en parte a los múltiples constituyentes estructurales de este microorganismo Sin embargo el antígeno de lipoarabinomanana es uno de sus principales componentes a nivel pared celular y es secretado al medio. Lo que implica que LAM debe tener una función muy importante en la infección con el hospedero.

4.OBJETIVOS

- 1.- *Efectuar la purificación de Lipoarabinomanana a partir de la cepa infectante humana de M.tuberculosis H37Rv, que será empleada como antígeno en el esquema de inmunización de ratones BALB/c.*
- 2.- *Producir hibridomas y clonas secretoras de anticuerpos específicos a Lipoarabinomanana obtenidos mediante la fusión de las células del bazo, extraído del animal inmunizado, con células de mieloma.*
- 3.- *Caracterización de los anticuerpos monoclonales que reconocen en forma específica Lipoarabinomanana en su forma natural y/o desnaturalizada.*
- 4.- *Clasificación de los anticuerpos monoclonales contra LAM en base a su isotipo, título de anticuerpos por ELISA, inmunofluorescencia y su concentración en cultivo celular y líquido de ascitis.*

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 PURIFICACION DEL ANTIGENO

El procedimiento para el aislamiento y purificación del antígeno de lipoarabinomannana se basó en las investigaciones realizadas por Hunter y Brennan (38).

M.tuberculosis de la cepa H37Rv se creció en medio Proskauer-Beck modificado por Youmans, durante 6 semanas o más para un crecimiento abundante. Esta micobacteria se cosechó y se eliminó el medio de cultivo por membrana de filtración millipore de 0.45 μ m. Otra forma de recuperar a la micobacteria fue centrifugando el medio de cultivo a 2000 rpm por 15 min y colectando el botón formado. Se pesó a la micobacteria y se toma como base húmeda y punto de inicio de la purificación.

Se adicionó una solución de azida de sodio y timerosal al 0.1% y se mantuvo a 37°C por 24 h, seguidamente se hizo una deslipidación de este bacilo mediante un reflujo con 300 ml de una solución de cloroformo-metanol (2:1) por 3 h, se realizó una filtración en vacío con papel Whatman No.1 y se lavó la masa bacteriana con unos cuantos mililitros de acetona pura. Se dejó secar al vacío por 10 min y se cuantificó su peso seco mismo utilizado de base en cálculo del rendimiento.

Posteriormente las micobacterias se hidrataron en 50 ml de agua desionizada y se procedió al rompimiento de este microorganismo empleando la prensa X (a una presión de 12 a 15 ton/cm², se ejecutó esta operación de 8 a 10 veces, el líquido sobrenadante y el sedimento del prensado se sonicaron empleando la máxima potencia del aparato por 30 minutos cuidando de descansar por espacio de un minuto por cada minuto de trabajo, seguidamente se cuantificaron los carbohidratos totales y se adicionó etanol de 96°GL hasta alcanzar una concentración del 50% vol/vol con respecto al volumen de agua adicionada y se reflujo por 2 h.

El extracto etanólico se evaporó y el acuoso se liofilizó y se evaluó el rendimiento de este material seco reconstituyéndose en una solución de Tris 0.02M con pH de 7.4 que contenía 1mM de MgCl₂ y 0.02% de azida de sodio (NaN₃) y se realizó una digestión enzimática por 18 h a 37°C con 100 unidades de desoxirribonucleasa I de igual cantidad de ribonucleasa IA al término de esta digestión se adicionaron 10 ml de una solución fenólica al 88% y se calentó a 75°C por 15 min se enfrió a continuación a 5°C en baño de hielo para centrifugarse a 14 000 rpm por 15 min.

La fase fenólica fue nuevamente extraída con un volumen igual de agua y las fases acuosas combinadas fueron lavadas con 6 volúmenes de una mezcla de solventes cloroformo-metanol 2:1 la fase acuosa fue dializada contra agua desionizada, se recuperó

la fase acuosa contenida en la membrana de dialisis y se liofilizó para evaluar el rendimiento y se cuantificaron carbohidratos totales, la interfase formada después de la centrifugación se descartó.

El material de liofilización se disolvió en 5 ml de solución reguladora de Tris-HCl 0.01 M y pH de 7.4 que contenía triton X-100 al 1% y se aplicó a una columna cromatográfica con 70 ml de gel de DEAE Sephacel (80 cm de largo por 1.5 cm de diámetro interno). Se equilibró y se eluyó con 100 ml de la misma solución reguladora se colectaron fracciones de 2 ml y se cuantificaron los carbohidratos totales por el método de fenol sulfúrico (ver apéndice) y se determinó su absorbancia a 495 nm y se graficaron los resultados.

Seguidamente se aplicó a la columna una solución reguladora de Tris-HCl 0.01M y NaCl 1 M como gradiente lineal se colocó 100 ml de cada una en el mezclador de gradientes, los eluatos fueron colectados en fracciones de 2 ml, se determinó absorbancia a 492 nm, cuantificándose los carbohidratos totales.

Los 2 picos principales graficados de las fracciones detectadas por cromatografía de intercambio iónico (fracciones A y B) fue dializada la fracción B contra agua desionizada y el triton X-100 fue removido por extracción con 6 volúmenes de cloroformo-metanol 2:1, se liofilizó esta fase acuosa. Este liofilizado rico en lipoarabinomana fue aplicado a una columna de Bio-gel A-5M o un equivalente de exclusión molecular.

Las absorbancias de las fracciones principales colectadas comprenden un pico altamente retenido y el triton se removió por extracción con solventes (cloroformo-metanol 2:1). La fase acuosa se precipitó en etanol acuoso, y se evaluó el rendimiento final. (Diagrama 1 y 2.)

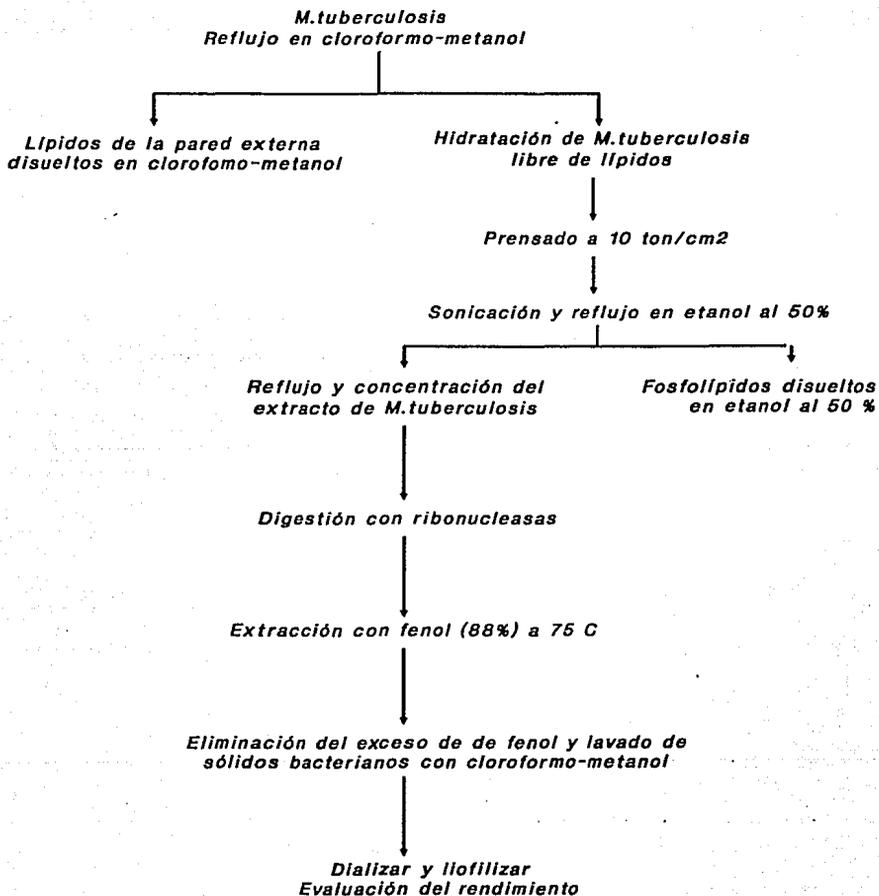


Diagrama 1 PURIFICACION DE LIPOARABINOMANANA DE M.tuberculosis.

5.2 PROTOCOLO DE INMUNIZACION

..Se emplearon 5 ratones hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de edad los cuales fueron sangrados por punción suborbital antes de ser inmunizados para determinarles los anticuerpos basales por el método de ELISA (13).

Posteriormente se les inoculó a cada uno por vía intraperitoneal 100 μ l de una emulsión que contenía 10 μ g del antígeno de lipoarabinomannana en 50 μ l de solución salina estéril y 50 μ l de adyuvante completo de Freund, estos animales se mantuvieron en reposo y aislamiento por 7 días, cumplido este tiempo se sangraron de la misma manera y se obtuvo aproximadamente 1 ml de sangre o 400 μ l de suero y se determinó la respuesta de anticuerpos por ELISA.

Para la siguiente semana se les inyectó por vía intravenosa 5 μ g del antígeno en 100 μ l de solución salina estéril y a los 7 días se les determinó nuevamente la respuesta de anticuerpos por ELISA, esta forma de inmunización se repitió una vez más y los resultados del inmunoensayo se graficaron para la respuesta inmune de cada animal.

Concluido el esquema de inmunización se eligió al animal que respondió mejor al antígeno y se seleccionó de esta manera al candidato para la donación del bazo en la fusión celular (Esquema 2).

RATONES BALB/c HEMBRAS DE 6 A 8 SEMANAS DE EDAD

↓
INMUNIZACION VIA I.P. (10 μ g DE LAM/50 μ L DE ADY.
DE FREUND + 50 μ L DE SOLUCION SALINA

↓
UNA SEMANA DESPUES REPETIR LA INMUNIZACION
CON LAM (5 μ G DE LAM/100 μ L DE SSI) VIA I.V.

↓
REPETIR INMUNIZACION VIA I.V.

↓
TRES DIAS ANTES DE SACRIFICAR AL RATON
INMUNIZAR POR VIA I.V. CON 5 μ g/100 μ l DE SSI

↓
FUSION CELULAR

Esquema 2 INMUNIZACION A RATONES BALB/C CON LAM DE *M. tuberculosis*.

5.3 FUSION CELULAR

5.3.1 CRECIMIENTO DE LAS CELULAS DE MIELOMA

Las células de mieloma se trabajaron en la campana de flujo laminar durante todo los pasos de la manipulación incluidos los del protocolo de fusión celular así como el empleo de material y reactivos estériles que tengan contacto directo con el material celular.

Las células de mieloma de ratón de la línea P3X63 Ag8.653 se descongelaron de su almacenamiento de nitrógeno líquido lo más rápido posible en baño metabólico a 37°C se colocaron rápidamente en tubos cónicos de 15 ml de capacidad con 10 ml de medio mínimo esencial suplementado con suero fetal bovino (MME-SFB) al 10%. Se centrifugaron por 10 min a 1000 rpm a 25°C y se decantó el sobrenadante, el paquete celular se resuspendió en 5 ml del mismo medio de cultivo y se adicionó en botellas de cultivo de 80 cm² con 20 ml medio de cultivo se incuban a 37°C con 5% de CO₂ y 80% de humedad, se observaron al microscopio con frecuencia.

Cuando tenían un aumento de masa celular (fase log) óptimo se distribuyeron en 2 botellas de 175 cm² con 100 ml de medio MME-SFB 10% y se mantuvieron en cultivo por algunos días hasta que presentaron confluencia, se distribuyeron en 4 botellas de la misma área superficial y cuando nuevamente presentaron confluencia se colectaron por centrifugación para tenerlas listas para fusión celular este crecimiento se logra en un periodo de 7 a 10 días.

5.3.2 PRODUCCION DE HIBRIDOMAS

La técnica de fusión celular permite la obtención de las células híbridas o hibridomas productores de anticuerpos monoclonales empleando para ello las células del bazo de ratón hiperinmunizado y células de mieloma de ratón, la aplicación de esta técnica esta basada en los trabajos reportados por Fazekas de St.Groth y Scheidegger (24).

Una vez cultivadas en cantidad suficiente (1×10^7 células aproximadamente) las células de mieloma de ratón, se procedió a sacrificar al animal que mejor respuesta inmune presentó. Este animal se colocó en una cámara que contenía éter y cuando llegó a una anestesia profunda se extrajo con cuidado de la cámara de éter, se sangró a blanco por punción suborbital y se dislocó, se cubrió la región peritoneal con etanol al 70% y glutaraldehído al 2% manteniéndose así por 10 minutos.

Se le extrajo el bazo al animal con ayuda de pinzas y tijeras de disección. Este órgano se colocó en una caja de petri estéril sobre una malla (5 X 5cm), se adicionó medio

salino estéril y se maceró cuidadosamente con una cuchara estéril. La suspensión celular se depositó en un tubo cónico estéril de 15 ml de capacidad y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos, para separar las partículas gruesas.

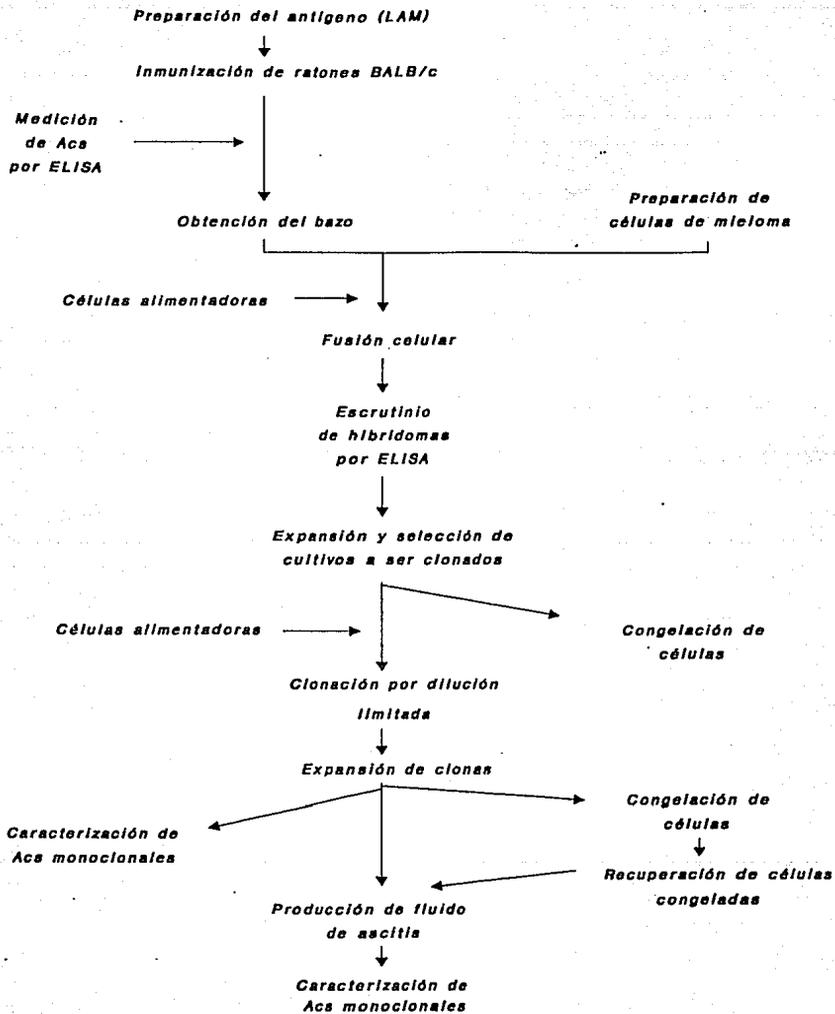
Al mismo tiempo se cosecharon las células de mieloma de ratón de las botellas de cultivo (4 cajas de 175 cm²), en tubos cónicos estériles de 50 ml, se centrifugaron por 10 minutos a 1000 rpm a 25°C al mismo tiempo que se centrifugaron las células de bazo por separado.

Seguidamente, los tubos se decantaron para eliminar el sobrenadante y el botón de células de cada tubo se resuspendió en 20 ml de medio salino y se juntaron todas las células incluyendo las de bazo en un sólo tubo, se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min a 25°C finalizando esto, se decantó el sobrenadante y se adicionó el agente fusógeno: polietilenglicol 4000 mezclado estérilmente con dimetilsulfóxido, 1 ml de esta mezcla se depositó sobre el botón celular en los primeros 60 seg y en los próximos 90 seg se agitó suavemente en baño metabólico a 37°C. En los siguientes 30 seg se adicionó 1 ml de medio salino, en los próximos 30 seg se adicionaron 3 ml, durante los 2 min siguientes se adicionaron 20 ml y en los próximos 5 min se llevó hasta 50 ml de volumen final.

Las células se dejaron 10 min a temperatura ambiente en el tubo cónico, después se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min a 25°C, se decantó y resuspendió el paquete celular en 50 ml de medio MME-SFB 10% centrifugándose bajo las condiciones antes señaladas, se decantó y resuspendió en 50 ml de medio MME-SFB al 10% suplementado con Hipoxantina, Aminopterina, Timidina (medio MME-HAT) a 37°C se depositaron 50 µl de esta suspensión en placas de 96 pozos las cuales contenían macrófagos de peritoneo de ratón (feeder cells).

Se mantuvieron los hibridomas en incubación a 37°C con 5% de CO₂ con humedad del 80% durante 5 días. En el día 8o. se realizó un cambio con 50 µl de medio MME-HT (Hipoxantina-Timidina) se dejaron cultivando 5 días más y se hace efectuó cambio de medio MME-SFB 10%. El medio cambiado es útil para el escrutinio por ELISA y selección de las clonas productoras de anticuerpos.

Una vez localizadas las clonas productoras de anticuerpos estas son transferidas a placas de 24 pozos las cuales tuvieron 1 ml de medio de cultivo MME-SFB 10% contenían 1000 macrófagos por ml aproximadamente, al cabo de 5-7 días se realizó un escrutinio por ELISA para localizar a las células productoras de anticuerpos, los pozos que muestran respuesta positiva a este inmunoensayo y que tuvieron más confluencia fueron transferidas a placas de 6 pozos adicionando 5 ml de medio de cultivo MME-SFB 10%. (Esquema 3)



Esquema 3 METODOLOGIA GENERAL PARA LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (13).

5.4 SELECCION DE HIBRIDOMAS (CLONACION POR DILUCION LIMITADA)

Las células híbridas en crecimiento *in vitro* fueron expandidas a botellas de 25cm² hasta que mostraron confluencia y sirvieron para obtener clonas productoras de los anticuerpos monoclonales propiamente dichos, para ello se aplicó la técnica de dilución limitada la cual ésta basada en el método estadístico de Poisson (33,54).

De las células en crecimiento en botellas, se tomó una muestra de 0.1 ml de la suspensión para hacer conteo de las células y estimar su viabilidad por el método de exclusión por azul de tripano (13).

De acuerdo a esto se diluyeron 1:10 ó 1:20 si tiene masa celular abundante se mezcla una parte de la suspensión celular y una parte de solución de azul de tripano (0.4%) las células se cuentan en cámara de Neubauer bajo microscopio y se observan las células viables sin teñir y células muertas teñidas en cada uno de los 4 cuadrantes de la cámara, es importante realizar este conteo en medio salino únicamente ya que el uso de medio con suero tinte proteínas séricas produciendo resultados indeseables.

Se hacen los cálculos con las células contadas para obtener en una dilución 4 células por ml (0.2 células por 50 μ l) y con un volumen final de 5 ml de medio MME-HAT, que es lo requerido por la microplaca de 96 pozos, las cuales previamente han sido adicionadas con células alimentadoras (macrófagos de peritoneo o timocitos de ratón).

Los hibridomas clonados por dilución limitada se mantuvieron por 7 días en cultivo y se detectó la producción de anticuerpos monoclonales por ELISA y se les suplementó medio fresco MME-HT y se cultivaron por 5 días más. Posteriormente, a los pozos con clonas productoras de anticuerpos monoclonales se transfirieron a placas de 24 pozos con células alimentadoras y se les suministró 1 ml de medio de cultivo se incubaron y se observó con frecuencia el crecimiento de estas células y cuando mostraron confluencia en su crecimiento se expandieron en placas de 6 pozos (10 ml).

Se crecieron las clonas en botellas de 80 cm² con medio de cultivo y al obtener confluencia se optó por congelar en nitrógeno líquido parte de las clonas y por otra parte se continuó la expansión celular hasta una mayor cantidad de ellas, o bien se utilizaron las clonas para obtención de los anticuerpos monoclonales *in vivo* en la producción de líquido de ascitis.

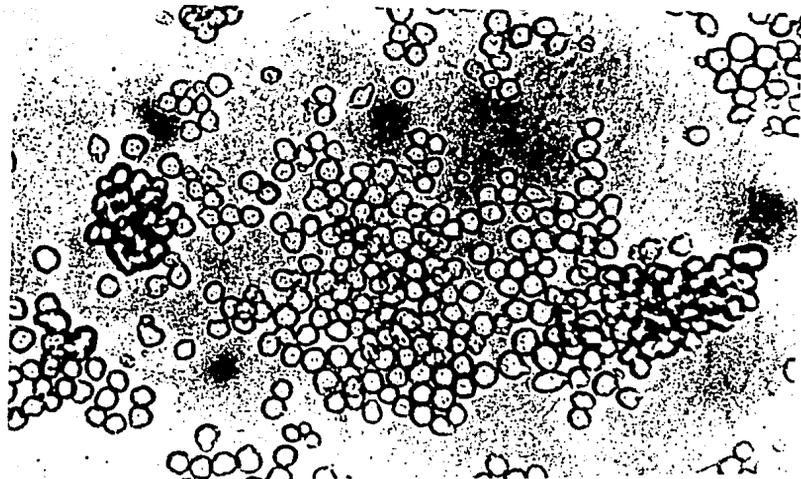


Figura 5 CULTIVO DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LAM DE *M.tuberculosis*.

5.5 OBTENCION DEL LIQUIDO DE ASCITIS

La producción de ascitis en ratones es el método comúnmente usado para la producción de anticuerpos monoclonales ya que se obtienen con mayor rendimiento que del cultivo *in vitro* de las clonas, del cual se ha reportado que sólo se obtienen del cultivo de 1 a 10% de los anticuerpos, en comparación con los niveles normalmente encontrados en el líquido de ascitis (54,65).

En la producción de líquido de ascitis se emplearon 3 ratones BALB/c machos de 10 semanas de edad los cuales fueron primeramente sensibilizados con pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) con una dosis de 0.5 ml por vía intraperitoneal dos semanas antes de la inoculación de las clonas, las cuales fueron seleccionadas en base al mejor crecimiento que presentaron *in vitro*. Posteriormente, estos mismos animales fueron inmunosuprimidos parcialmente con ciclofosfamida (54) a una dosis de 0.5 mg en solución salina isotónica por 20 g de peso del animal por vía intravenosa 24 horas antes de la inoculación de los hibridomas intraperitonealmente.

El líquido de ascitis se obtuvo de 3 ratones BALB/c sensibilizados con pristano y inmunosuprimidos parcialmente con ciclofosfamida cada uno de los ratones utilizados fue inoculado intraperitonealmente con células obtenidas de la clonación por dilución limitante de cultivo *in vitro* y contadas por el método de exclusión de azul de tripano.

Tabla 7 HIBRIDOMAS EMPLEADOS EN LA PRODUCCION DE FLUIDO DE ASCITIS

RATON	CLONAS	No. DE CELULAS
1	LAM 4:A:10	60 000
2	LAM 7:E:9	40 000
3	LAM 8:F:12	20 000
4	LAM 11:4	560 000
5	LAM 11:5	573 000
6	LAM 11:6	780 000

Las tres primeras fueron hibridomas de cultivo celular sin clonación por dilución limitante, en cambio las tres últimas fueron clonas.

Los animales fueron mantenidos en observación por 6 semanas en donde se apreció una expansión del vientre y se procedió al cabo de este tiempo a anestésiar a cada uno de los animales en la cámara de éter, una vez estando en anestesia profunda los animales fueron sangrados a blanco con lo cual se causó su muerte, y de la cavidad peritoneal se extrajo con pipeta Pasteur el líquido presente en ella, lo que significó en promedio un volumen de 1 ml del este líquido de ascitis por animal, este líquido se dejó reposar por media hora en baño de hielo para sedimentar material celular, el sobrenadante se colectó en tubos eppendorf, se alicuotó y se almacenó a -20°C para los ensayos de caracterización, cabe señalar que únicamente se trabajaron en la caracterización los anticuerpos monoclonales procedentes de las clonas.

5.6 CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

5.6.1. ISOTIPIFICACION

Los anticuerpos monoclonales obtenidos del líquido de ascitis, de las clonas por dilución limitada, fueron isotipificados por el método de ELISA mediada por anticuerpo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Sigma E.U.A) este método se describe brevemente.

Se depositaron 0.1 ml de antígeno diluido (5 µg/ml) por pozo en placa de ELISA se incubaron toda la noche a 4°C o por 1 hr a 37°C. Se eliminó el sobrenadante de la sensibilización y se lavó cada uno de los pozos con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) tres veces. Seguidamente se bloqueó cada pozo con solución de albúmina sérica bovina al 1% por media hora a 37°C.

Por otra parte, se diluyó el anticuerpo monoclonal del líquido de ascitis a una dilución 1:100 después de terminado el bloqueo de los pozos se lavó una vez la placa de ELISA con PBS y se depositaron 0.1ml de esta dilución en cada pozo sensibilizado, se incubó por 2 hrs a temperatura ambiente y al finalizar este paso se se lavó la placa de ELISA tres veces con PBS-tween 20 al 0.1%. Se preparó aparte la dilución con el reactivo isotipo específico (IgG de conejo anti-IgG de ratón en todos los isotipos, IgA, IgM, IgE) a una dilución 1:1000 y se adicionaron 0.1 ml de estos reactivos por pozo para ser ensayado por duplicado.

Se incubó la placa de ELISA a temperatura ambiente por 30 minutos, se lavó con PBS tres veces. Seguidamente se diluyó el anticuerpo anti-IgG anti-conejo de cabra (DAKO Immunochemicals E.U.A) marcado con peroxidasa de rábano a una dilución de 1:5000 en PBS se necesitaron 1.2 ml de la dilución.

Se adicionaron 0.1 ml por pozo del anticuerpo marcado con la enzima de peroxidasa de rábano y se incubó la placa a temperatura ambiente por 15 minutos el sustrato

empleado fue la ortofenilendiamina disuelta en una solución de citratos (pH 5) conteniendo 4 μ l de peróxido de hidrógeno de 30 volúmenes, se reveló la reacción de 5 a 15 y se detuvo con 50 μ l por pozo de una solución de ácido sulfúrico 1N.

5.6.2 INMUNOFLUORESCENCIA

Una vez establecido el isotipo de los anticuerpos monoclonales a lipoarabinomanana se procedió a ensayar su respuesta hacia microorganismos o agentes patógenos como: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, hacia componentes estructurales semejantes a lipoarabinomanana.

Como primer paso en el ensayo de caracterización se desarrolló y estandarizó una técnica de inmunofluorescencia la cual consistió inicialmente en un crecimiento masivo de micobacterias en medio sólido Lowenstein Jensen y en caso de los hongos y levaduras en medio de Saboraud.

Una vez obtenido un crecimiento masivo de microorganismos se inactivaron por adición, al medio sólido de crecimiento, de una solución de azida de sodio y merthiolate al 0.1% dejándose en incubación durante una semana, al final de este tiempo se desprendieron mecánicamente estos microorganismos para tenerlos en suspensión.

Se tomó una pequeña muestra de cada microorganismo y, por separado, se depositaron en portaobjetos, se extendieron y se fijaron con calor (2 hr a 56°C) y metanol (5 minutos a temperatura ambiente). Posteriormente se bloqueó con una solución de albúmina al 1% por media hora a 37°C en cámara húmeda, después se lavó con PBS tres veces. Se adicionó el líquido de ascitis a una dilución 1:2 (50 μ l) y se mantuvo en cámara húmeda por media hora a 37°C, se lavó tres veces con PBS-Tween 0.05%.

La preparación del anticuerpo de conejo anti-ratón marcado con fluoresceína (Dako immunochemicals E.U.A) se hizo a una dilución 1:50 en PBS y se dejó, al igual que el paso anterior, por media hora en cámara húmeda a 37°C. Se lavó tres veces con PBS-Tween al 0.05%. La preparación microscópica se cubrió con solución de PBS:glicerol 1:9 a pH 8, se colocó un cubreobjetos y con aceite de inmersión se observó en microscopio de epifluorescencia con lámpara de arco mercurio de longitud de onda de 365 nm y se interpretaron los resultados.

5.6.3 ENSAYO DE INMUNODOT

Este ensayo empleó sobrenadantes de sonicados de los microorganismos antes señalados, para ello se emplearon muestras de microorganismos inactivados por azida de sodio y merthiolate al 0.1% y se depositaron en tubos que contenían 10 ml de PBS, se mantuvieron en baño de hielo y se sonicaron con la mayor potencia posible del aparato durante 10 minutos, posteriormente las muestras de sonificado se centrifugaron por 10 minutos a 4000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se determinó concentración de carbohidratos totales por el método de fenol sulfúrico.

Para este ensayo se emplearon también muestras de sonificado de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y lipoarabinomanana de *M.tuberculosis* como controles positivos. De acuerdo a esto se sensibilizó la membrana de nitrocelulosa con los carbohidratos a una concentración de 5 µg, se bloqueó la membrana con albúmina al 3% preparada en solución amortiguadora de tris base pH 7.4 (TBS) por media hora.

Se lavó una vez con TBS y se depositó el anticuerpo monoclonal de líquido de ascitis a una dilución de 1:50 en TBS con albúmina al 1% en contacto con la membrana, esto se logró colocando la membrana y el anticuerpo monoclonal en una bolsa de plástico sellada con calor en sus extremos y dejándose en agitación toda la noche a temperatura ambiente.

Después se lavó una vez con agua desionizada rápidamente y tres veces con TBS por 10 min cada vez, se agregó el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con biotina (Dako Immunochemicals E.U.A) a una dilución 1:1000 por 90 minutos en agitación con TBS albúmina al 1% a temperatura ambiente.

Se lavó rápidamente con agua desionizada y luego se lavó 4 veces con TBS por 10 min cada lavado, se agregó avidina-peroxidasa (Dako Immunochemicals E.U.A) y diluida en TBS 1:1000, se dejó agitando a temperatura ambiente por 30 minutos. Se lavó con TBS-tween al 2% tres veces, 10 min cada lavado.

El revelado consistió en adicionar el substrato de DAB (3,3'-Diaminobencidina) con 3mg de esta sustancia en 10 ml de PBS 10 mM con 0.010 M de EDTA, después se agregaron 5 µl de H₂O₂ de 30 volúmenes, se sumergió la membrana en la solución revelándose manchas en las reacciones positivas. La reacción se detuvo con agua de la llave la membrana se dejó secar sobre un papel filtro y se interpretaron los resultados de acuerdo a las diferentes manchas que manifiestan la reacción antígeno anticuerpo.

5.6.4 INMUNOENSAYOENZIMATICO (ELISA)

Se sensibilizó durante toda la noche a temperatura ambiente una placa de ELISA con la solución de carbohidratos totales a una concentración de 5 µg/ml, de cada uno de los microorganismos sonicados para el ensayo de inmunodot, en solución amortiguadora de carbonatos depositando 100 µl en cada pozo.

Se lavó la placa una vez con PBS y se bloqueó cada pozo con 150 µl de solución de albúmina al 1% durante 1 hr a 37°C después se lavó una vez con PBS. Seguidamente se depositó el anticuerpo monoclonal LAM 11:6 en diluciones 1:250 y 1:500 en PBS (100µl/pozo) se incubó a 37°C durante 1 hr.

Se lavó la placa por tres ocasiones con PBS-tween, se depositaron 100 μ l de anti-Ig totales de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Dako Immunochemicals. E.U.A) a una dilución de 1:500 y se incubó por 1 hr a 37°C después se lavó tres veces con PBS-tween y se adicionaron 100 μ l de una preparación de solución de revelado que contenía 10 ml de una solución amortiguadora de citratos (pH 5) con 5.4 mg de ortofenilendiamina en presencia de peróxido de hidrógeno de 30 volúmenes (4 μ l), se mantuvo en obscuridad por un período de 15 minutos y se detuvo la reacción con 50 μ l de ácido sulfúrico 1N y se leyeron las absorbancias a 492 nm, en el lector de ELISA de una unidad automatizada Biomek 1000 (Beckman E.U.A). Este ensayo se hizo por duplicado para cada muestra de carbohidratos de los diferentes microorganismos así como para LAM de *M.tuberculosis*.

6. RESULTADOS

El crecimiento masivo de M.tuberculosis se obtiene de 6 semanas en el medio líquido de Proskauer Beck modificado de Youmans (PBY) suplementado con 5% de suero bovino o de caballo e incubado a 37°C y al terminó del mismo se cosecha el cultivo. El paquete celular deslipidado se somete a la sonicación y prensado, aquí es importante señalar la necesidad de un prensado efectivo ya que la sonicación por sí misma no es suficiente para romper la micobacteria.

La eficiencia de los procesos de sonicacion y prensado se realiza una tinción de Zielh- Neelsen, si se observa a M.tuberculosis íntegro es un indicio de la ineficiencia de los tres primeros procesos en la purificación de LAM. Si el número de micobacterias observadas es menor al 50% se realiza un reflujó con etanol de 96° con la finalidad de liberar polisacáridos que se encuentren en la pared celular al finalizar este proceso de aproximadamente tres horas se evapora el etanol y se concentra el extracto por liofilización a un tercio de su volumen ajustandose el pH a 7.4 con solución amortiguadora de Tris-base.

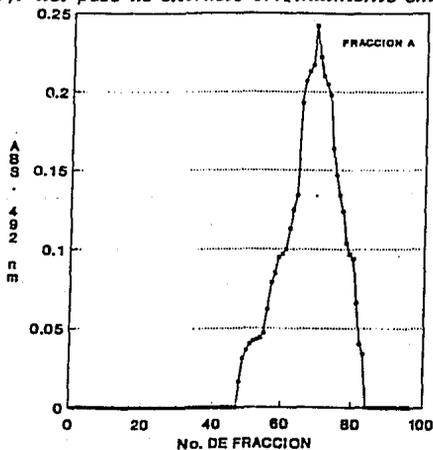
La digestión enzimática con RNAasa y DNAasa del producto suspendido en tris-base permite la eliminación de los ácidos nucleicos de la micobacteria que se conpurificaron durante este procesamiento. Seguidamente se efectúa el tratamiento con fenol para la eliminación de las proteínas como las presentes en la membrana así como enzimas de todo tipo. La eliminación del fenol por la dialisis exhaustiva contra agua destilada, es la más recomendable ya que su extracción con solventes resulta muy tediosa.

El material libre de fenol se disuelve en un volumen mínimo de solución amortiguadora de tris-base y se aplica a una columna con gel de DEAE Sephacel se colectan las fracciones que contienen componentes sin carga eléctrica o cargas positivas, al aplicar un gradiente lineal de NaCl 1M, se desprenden los componentes con carga negativa como es lipoarabinomana.

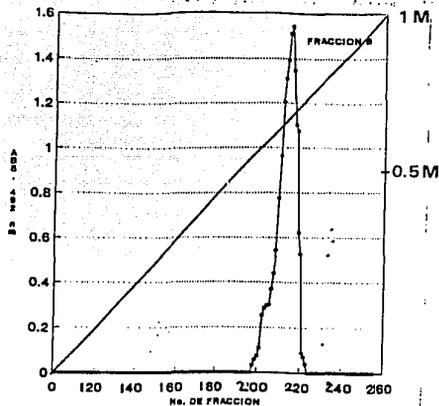
Se detectan 2 fracciones por valores de absorbancia a 492nm de las que son ricas en carbohidratos llamadas A y B (Gráficas 3 y 4) y la fracción A contiene polisacáridos sin carga eléctrica como arabinogalactanas, mananas etc, y la fracción B esta compuestas de lipoarabinomananas principalmente. Todos los tubos de las muestras de la fracción B se reúnen en un sola fracción, misma que se aplica a una columna de exclusión de peso molecular de 5 millones (gráfica 5).

Las fracciones colectadas de esta columna, fueron de 2 ml de volumen y que presentaron lecturas de absorbancia mayores o iguales a 0.2 conjuntas se concentran en un mínimo volumen por liofilización. La solución se almacena a 4°C por toda la noche, el sobrenadante se decanta y se descarta; el precipitado remanente de LAM se seca a temperatura ambiente.

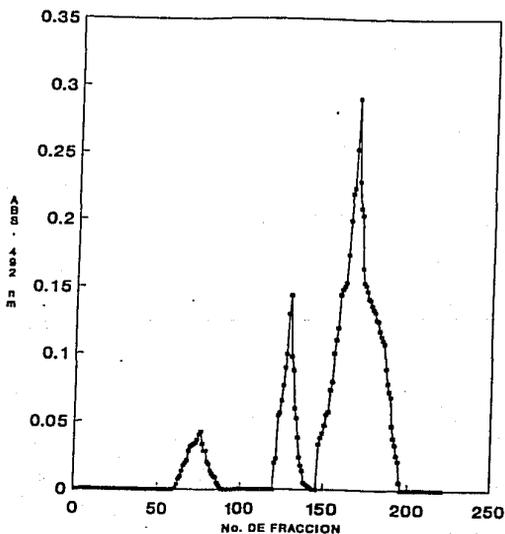
El rendimiento de LAM se calculo pesando el producto seco (1.2 mg) que representa un 0.97% en una segunda purificación el peso final de este producto fue de 2.5 mg cuyo rendimiento fue del 3.8% del peso de extracto originalmente empleado.



Gráfica 3 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN COLUMNA DE DEAE-SEPHACEL. (fracción A: constituida por arabinogalactanas, arabinanas, mananas, lipomananas etc. en Tris-HCl .01M pH 7.4 y triton X-100 al 1%).



Gráfica 4 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DEAE-SEPHACEL CON GRADIENTE DE NaCl 1M Y TRIS-HCl 0.01M pH 7.4, LA FRACCION B CONTIENE PREDOMINANTEMENTE LAM.



Gráfica 5 CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL CON BIO-GEL A-5M EMPLEANDO SOLUCION DE TRIS-HCl 0.1M pH 7.4 EN TRITON X-100 AL 1%

El LAM purificado se detecta por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en el aparato de electroforesis Phast system (Pharmacia, Suecia). La banda de lipoarabinomanana se localiza con un peso molecular de 3,9 kilodaltones (kDa) los marcadores de peso molecular (en kilodaltones) utilizados fueron proteínas como 14.2, para lisozima de huevo, 21.5 inhibidor de tripsina de soya; 31 anhidrasa carbónica bovina, 45 ovoalbúmina, 66 albúmina sérica bovina, 97.4 fosforilasa de músculo de conejo.

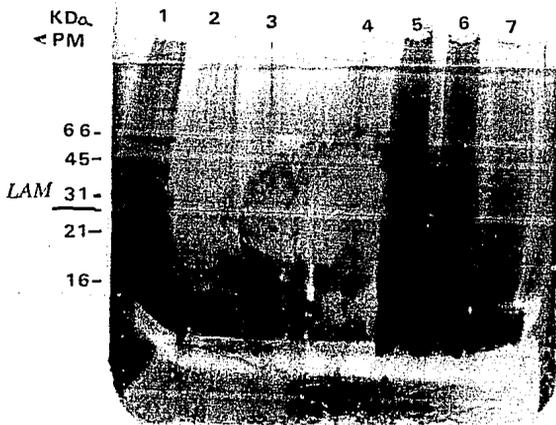


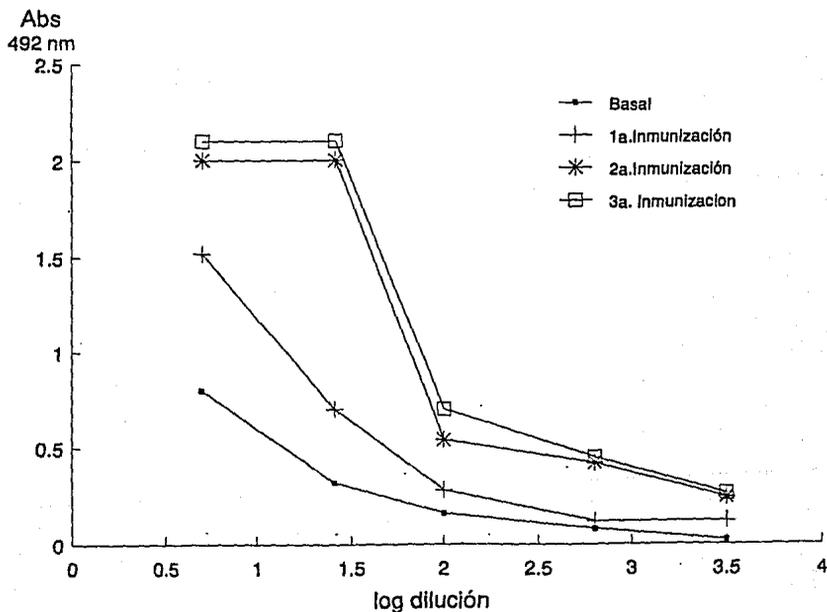
Figura 6 PATRON DE LOS EVENTOS ELECTROFORETICOS EN LA PURIFICACION DE LAM DE *M. tuberculosis*

Gel SDS-PAGE (10-15%) Tinción de Plata para lipopolisacáridos.

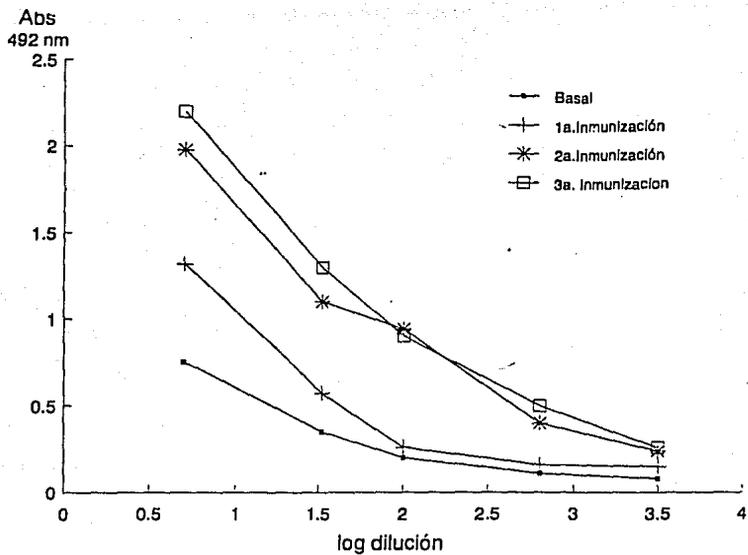
Columna (1) Marcadores de proteínas de bajo peso molecular, (2) LAM puro estándar, (3) LAM purificado, (4) extracto de MTB dializado, (5) extracto de MTB liofilizado, (6) MTB prensado y sonicado, (7) MTB prensado.

Se emplearon en el esquema de inmunización 5 ratones BALB/c hembras de 5 a 6 semanas de edad a todos ellos se les realiza una sangría previa a la primera inmunización y las inmunizaciones subsecuentes.

Los sueros obtenidos durante este esquema se titulan contra antígenos de LAM por ELISA, la respuesta inmune humoral de cada animal se incrementa en función del número de las dosis del inmunogéno. Los títulos de anticuerpos contra LAM se encontraron en el intervalo de 1:10 a 1:250 como se describen en los ejemplos de los ratones 2 y 3 de las gráficas 6 y 7.



Gráfica 6 TITULACION DE LOS ANTICUERPOS SERICOS MURINOS CONTRA LAM DE *M. tuberculosis* POR ELISA EN EL RATON NUMERO 2.



Gráfica 7 TITULACION DE LOS ANTICUERPOS SERICOS MURINOS CONTRA LAM DE *M.tuberculosis* POR ELISA EN EL RATON NUMERO 3.

Se realizaron tres fusiones celulares, para la obtención de anticuerpos monoclonales contra LAM de *M.tuberculosis*, se obtuvieron un total 30 de hibridomas estables en cultivo celular, de los cuales tres fueron clonados por dilución limitante y algunos se perdieron con el tiempo ya sea por reversión de la hibridación o por contaminaciones con microorganismos en el medio de cultivo. Finalmente un total de 11 hibridomas estables productoras de anticuerpos contra LAM de *M.tuberculosis* incluyendo los clonados.

De los hibridomas obtenidos se seleccionaron a 3 clonas de anticuerpos monoclonales obtenidos *in vitro* en cultivo celular e *in vivo* como líquido de ascitis. Los anticuerpos se denominaron: LAM 11:4, LAM 11:5 y LAM 11:6, todos ellos fueron IgG_{2a}. Sus títulos en líquido de ascitis los fueron de 1:100 con una concentración aproximada de 500 µg de inmunoglobulina/ml (Tabla 8).

En los monoclonales obtenidos en cultivo celular presentaron un título por ELISA de 1/25 y la concentración en este medio no fue cuantificada.

Tabla 8 PRESENTACION DE LAS CLONAS PRODUCTORAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LAM DE *M.tuberculosis*

Acs		Cultivo	Líquido de ascitis	
Monoclonales	Isotipo	Título	Título	Conc.(µg/ml)
LAM 11:4	IgG _{2a}	1:25	1:100	500
LAM 11:5	IgG _{2a}	1:25	1:100	500
LAM 11:6	IgG _{2a}	1:25	1:100	500

Estos anticuerpos monoclonales presentados resultaron ser muy homogéneos tanto en el isotipo y título de anticuerpos contra LAM de *M.tuberculosis*.

Con el fin de conocer si los anticuerpos monoclonales isotipificados y titulados por ELISA eran capaces de reconocer al antígeno presente en la superficie capsular completa de esta micobacteria, se decidió por el método de la inmunofluorescencia indirecta. Se procedió a conocer al mismo tiempo la especificidad de los mismos hacia otros microorganismos que en su estructura sean similares a *M.tuberculosis*.

Para ello se seleccionaron a *M.avium*, *C.albicans*, *C.neoformans*, *N.asteroides*, *N.brasiliensis*, *C.inmitis*, *H.capsulatum*, *A.fumigatus*. Los resultados de este ensayo de inmunofluorescencia se muestran en la tabla 9. En la que se observa que ninguno de los microorganismos diferentes a *M.tuberculosis* dio resultados positivos de inmunofluorescencia, por lo que no fueron reconocidos por ninguno de los anticuerpos monoclonales LAM 11:4, 11:5 y 11:6. *M.tuberculosis* procedente de cultivo sólido el cual se encontraba deslipidado y otro *M.tuberculosis* proveniente de una espectoración, mismo que había sido caracterizado previamente por tinción ácido-resistente de Ziehl-Neelsen y cultivo fueron positivos, por lo que los anticuerpos monoclonales resultaron ser género específicos. El ensayo de inmunofluorescencia resultó ser positivo para las preparaciones de cepas de *M.tuberculosis*, lo que implica que estos anticuerpos monoclonales 11:4, 11:5 y 11:6 fueron capaces de reconocer a LAM expresado en la cápsula de la bacteria completa como se muestra en la figura 7.



Figura 7 ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA LA DETECCIÓN DE *M.tuberculosis* CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LAM.

El ensayo de inmunofluorescencia junto con el de la tinción ácido-alcohol resistente se interpretan como la identificación microscópica de bacilos delgados y agregados de este bacilo, sin embargo esta técnica con los anticuerpos monoclonales generados contra LAM son de género específico, dado que solo presentó la inmunofluorescencia positiva para la cepas de *M.tuberculosis* provenientes de cultivo y de expectoración por el contrario la tinción antes señalada que sólo es capaz de identificar al género *Micobacterium* sin distinción de especies.

Se pensó que para comprobar esto último si estos monoclonales eran capaces de reconocer una o varias especies del género *Micobacteriano*. Se realizó el ensayo de inmunofluorescencia con estos anticuerpos monoclonales a las cepas de *M.avium*, *M.scrofulaceum* y *M.gordonae*, conocidas comúnmente como micobacterias atípicas este ensayo resulto positivo solo para las cepas de *M.tuberculosis* probadas anteriormente, lo que sugiere fuertemente que los anticuerpos monoclonales 11:4, 11:5 y 11:6 son especie específicos para *M.tuberculosis*.(Tabla 10)

Tabla 9 REACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES A *M.tuberculosis* CONTRA OTROS MICROORGANISMOS POR INMUNOFLUORESCENCIA

MICROORGANISMOS	ANTICUERPO MONOCLONAL		
	11:6	11:5	11:4
<i>M.tuberculosis</i>	+	+	+
<i>N.asteroides</i>	-	-	-
<i>N.brasiliensis</i>	-	-	-
<i>C.neoformans</i>	-	-	-
<i>C.albicans</i>	-	-	-
<i>H.capsulatum</i>	-	-	-
<i>C.inmitis</i>	-	-	-
<i>A.fumigatus</i>	-	-	-

(-) No existe reconocimiento

(+) Si existe reconocimiento

Tabla 10 REACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES A *M.tuberculosis* CONTRA MICOBACTERIAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

MICROORGANISMO	ANTICUERPO MONOCLONAL		
	11:6	11:5	11:4
<i>M.tuberculosis</i> *	+	+	+
<i>M.tuberculosis</i> **	+	+	+
<i>M.avium</i>	-	-	-
<i>M.scrofulaceum</i>	-	-	-
<i>M.gordonae</i>	-	-	-

(-) No hay reconocimiento

(+) si hay reconocimiento

(*) muestra deslipidada

(**) muestra de expectoración

Tabla 11 CARBOHIDRATOS TOTALES DE SOBRENADANTES DE MICROORGANISMOS DIFERENTES A *M.tuberculosis*

MICROORGANISMO	CONCENTRACION mg/mL
<i>C.neoformans</i>	0.54
<i>C.albicans</i>	3.50
<i>N.asteroides</i>	5.00
<i>N.brasiliensis</i>	0.30
<i>H.capsulatum</i>	1.30
<i>C.immitis</i>	2.00
<i>A.fumigatus</i>	0.73
<i>M.avium</i>	0.53
<i>E.coli</i>	0.20
<i>S.aureus</i>	0.18

El ensayo de inmunodot llevado a cabo para conocer si los anticuerpos monoclonales en este caso representados por LAM 11:6 son reactivos a los carbohidratos presentes en los sobrenadantes de *C.neoformans*, *C.albicans*, *N.asteroides*, *N.brasiliensis*, *H.capsulatum*, *C.immitis*, *A.fumigatus*, *M.avium*, *E.coli* y *S.aureus*.

LAM purificado en este trabajo y LAM de referencia donado gentilmente por el Dr Brennan fueron utilizados como controles positivos, dentro de este ensayo se incluyo un extracto de *M.tuberculosis* sometido a prensado y sonicado.

Dentro de este ensayo se emplearon también anticuerpos policlonales de conejo que fue inmunizado con un extracto crudo de *M.tuberculosis*. Un anticuerpo monoclonal a LAM donado por el Dr.Brennan fue utilizado como referencia al reconocimiento a este antígeno.

La reactividad de los anticuerpos policlonales resulto ser manifiesta hacia los diferentes microorganismos los cuales presentaron una mancha nitida en la membrana de nitrocelulosa prueba del reconocimiento antígeno-anticuerpo significando un resultado positivo, y el no reconocimiento estuvo dado por la ausencia de esta mancha fue considerado como resultado negativo. Los resultados de los diferentes anticuerpos monoclonales se encuentran en la tabla 12.

Tabla 12 DETECCIÓN DE LAM SOLUBLE CON DIFERENTES ANTICUERPOS POR ENZAYO DE INMUNODOT

Microorganismo (sonicado)	Anticuerpo		
	Policlonal de conejo(1:250)	Monoclonal LAM 11:6 (1:20)	Monoclonal de ref. *** (1:50)
<i>C.neoformans</i>	P	P	N
<i>C.albicans</i>	P	P	N
<i>N.asteroides</i>	P	P	P
<i>N.brasiliensis</i>	P	N	N
<i>H.capsulatum</i>	P	P	P
<i>C.immitis</i>	P	P	P
<i>A.fumigatus</i>	P	P	P
<i>M.avium</i>	P	P	P
<i>E.coli</i>	P	P	P
<i>S.aureus</i>	P	N	N
<i>M.tuberculosis</i> **	P	P	P
LAM	P	P	P
LAM referencia***	P	N	P
Albúmina	N	N	N

* Concentración de carbohidratos totales 5 µg

** Pensado concentración de carbohidratos totales 5 µg

*** Donado gentilmente por el Dr.Brennan y Dr.Sada

P Positivo

N Negativo

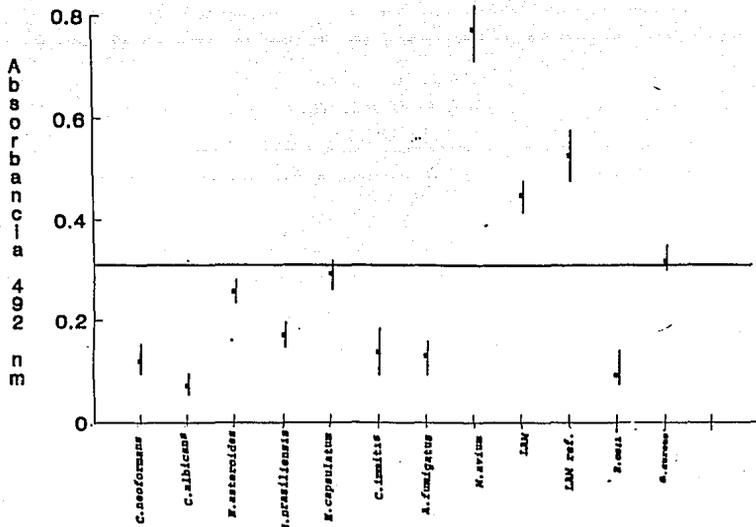
Para ELISA, el ensayo consistió en la cuantificación de carbohidratos totales de todos los microorganismos estudiados (tabla 11) se sensibilizó una microplaca con 5 µg/ml de cada uno de ellos y se procedió a incubarlos con el anticuerpo monoclonal 11:6,este

complejo antígeno-anticuerpo se detectó por la adición de un anti-anticuerpo marcado con la enzima peroxidasa de rábano, los resultados se muestran en la gráfica 8.

ELISA indirecta fue utilizada con la finalidad de determinar, si los sobrenadantes de los cultivos de los microorganismos señalados previamente son útiles para el escrutinio de la detección de LAM soluble de *M.tuberculosis*. Se determinó un punto de corte de 0.3 unidades de absorbancia y leído a longitud de onda de 492 nm con el anticuerpo monoclonal LAM 11:6, mismo que reconoció a LAM de referencia con valores de 0.450 ± 0.031 y con el antígeno purificado de 0.528 ± 0.035 con *M.avium* 0.733 ± 0.057 mientras que empleando anticuerpos policlonales a LAM de referencia se obtuvieron valores de 0.441 ± 0.039 ; *S.aureus*, utilizado como control negativo 0.318 ± 0.022 .

Para los sonicados de los otros microorganismos estudiados y con valores de absorbancia menores de 0.3 fueron para *C.neoformans* 0.120 ± 0.045 , *C.albicans* 0.072 ± 0.010 , *N.asteroides* 0.257 ± 0.025 , *N.brasiliensis* 0.170 ± 0.015 , *H.capsulatum* 0.293 ± 0.025 , *C.immitis* 0.317 ± 0.010 y *A.fumigatus* 0.131 ± 0.008 .

Estos resultados demuestran que el anticuerpo monoclonal LAM 11:6 es útil en la diferenciación de LAM soluble de *M.tuberculosis* proveniente de cultivo puro, de otros sobrenadantes de otros microorganismos; lo que sugiere que este ensayo podría ser utilizado como un método alternativo, en los casos en que no se observe micobacteria por inmunofluorescencia. Además este método de ELISA, podría ser semicuantitativo y de ayuda inicial en el diagnóstico de la tuberculosis.



Gráfica 8 REACTIVIDAD DE LOS SOBRENADANTES OBTENIDOS POR SONICACION DE 10 MICROORGANISMOS DIFERENTES CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL LAM 11:6 CONTRA *M.tuberculosis* POR ELISA.

7.0 DISCUSION

M.tuberculosis esta constituido de manera importante por lipoarabinomana misma que está localizada en la pared celular según los primeros estudios realizados a este lipopolisacárido (72).

Se ha estimado que entre un 25-40% de la pared celular de *M.tuberculosis* esta compuesto de este lipopolisacárido y, por lo tanto, no es extraño que sea liberado (11,73).

LAM ha sido descrito como un posible factor de virulencia (11) debido a que se han encontrado evidencias experimentales de que es un potente inhibidor de gamma interferón, el cual media la activación de macrófagos murinos.

Los estudios del mecanismo por el cual LAM regula este evento es sugerido por los resultados experimentales descritos recientemente (11) en los cuales, existe un bloqueo por parte de *M.tuberculosis* de los radicales libres del oxígeno dentro del macrófago ya que ellos son potencialmente citotóxicos a la micobacteria, esto dentro de la serie de eventos que ocurren en la respuesta inmune celular.

Ademas se ha reportado a LAM como responsable de la inhibición de la actividad de la proteína cinasa C y en el bloqueo de la actividad transcripcional de los genes inductores de gamma interferón en líneas celulares de macrófagos (11). Estos datos sugieren que LAM contribuye a la persistencia de la micobacteria dentro de fagocitos mononucleares durante la infección tuberculosa humana.

El rendimiento bajo de LAM obtenido en la primera purificación (0.97%) permitió establecer nuevas estrategias y aplicarlas en el segundo intento de purificación como fue un aumento en el peso de la masa micobacteriana en base húmeda de casi 40 gr mismo que se traduce en incrementar la proporción de carbohidratos totales durante el prensado.

La eficiencia de la ruptura bacteriana es también función del prensado que en *M.tuberculosis* deberá ser superior a 10 ton/cm² según nuestra experiencia. Esto nos llevó a la detección 796 µg de carbohidratos totales por mililitro de sobrenadante del prensado. Estos resultados difirieron del primer intento de purificación en donde se obtuvo una cantidad de carbohidratos totales de 315 µg por mililitro después de 8 prensados efectuados.

Adicionalmente, a los prensados se observó un incremento de un 50% en la cantidad de carbohidratos totales al término de la sonicación por 15 minutos. El extracto seco liofilizado obtenido finalmente fue de 115 mg en la primera purificación y 350 mg en la segunda.

La aplicación de estos extractos en los siguientes pasos de purificación base de cálculo en la evaluación del rendimiento final para lipoarabinomanana de 0.97% y un 3.8% en la segunda purificación empleando en ambos casos 115 mg de extracto micobacteriano liofilizado y no corresponde a lo reportado por Hunter y Brennan (38) que es de 30 mg de lipoarabinomanana por 115 mg de extracto micobacteriano empleado.

Las pérdidas de material en el proceso de purificación a través de los diferentes eventos pudieron ser por ejemplo: en la extracción de la fase fenólica, en la concentración de material por liofilización, o por una separación deficiente en algunas de las columnas cromatográficas empleadas.

La posibilidad de pérdida de LAM en la extracción fenólica en el primer intento, tal vez, se debió a una deficiente extracción de la fase acuosa por los solventes empleados. La estrategia establecida para el segundo intento fue la eliminación del fenol residual después de la digestión fue la diálisis exhaustiva contra agua deionizada por un período de 72 hr o hasta desaparición de todo el fenol y posteriormente se filtró y concentró por liofilización esto resultó más práctico que la extracción con solventes, también se evitó la pérdida de LAM localizada en la interfase fenol-agua.

Otro punto muy importante en la interpretación de pérdidas de LAM durante la purificación es el uso de las columnas cromatográficas ya que LAM y algunos coproductos poseen la misma carga negativa y ello representa competencia de los co-productos con LAM hacia las cargas positivas del gel durante la elución de los productos.

Por lo cual el LAM remanente se filtró en la fracción A la cual debe contener material sin carga negativa y al mismo tiempo impedir el intercambio iónico de LAM con el gel de la columna y esta fracción A estará conformada por polisacáridos como arabinogalactanas, arabinanas, lipomananas y arabinomananas (56).

Hasta el momento se han empleado anticuerpos monoclonales específicos a LAM por inmunodot hacia muestras de la fracción A y se ha encontrado reconocimiento hacia este antígeno. Pero ello no es suficiente para concluir si se trata únicamente de LAM no retenido en la columna o bien de arabinomananas las cuales no poseen la porción lipídica con carga negativa.

Por lo cual fue necesario identificar a LAM de la fracción A y B por un corrimiento electroforético y determinar la inmunorreactividad de estos polisacáridos por inmunoblot, sin embargo, los intentos hechos hasta ahora para reconocer a LAM puro por esta técnica sugieren que LAM puro no se transfiere del gel a la membrana de nitrocelulosa bajo las condiciones ensayadas hasta ahora en el laboratorio, aunque se continuará estandarizando esta técnica.

En ensayos de inmunoblot se ha logrado detectar inmunorreactividad a LAM en extractos de micobacteria y, en material prensado de *M. tuberculosis*, lo que sugiere que LAM es co-migrado con proteínas las cuales presentan buena adsorción a la nitrocelulosa además de mayor número de cargas eléctricas. La posibilidad de encontrar proteínas en la fracción A es mínima en ese paso de purificación dado que el material ya ha sido digerido con fenol.

Dentro del procedimiento de purificación de LAM también se ha visto la posibilidad de purificar este antígeno con otros procedimientos cromatográficos, tales como: el uso de los principios de la afinidad e inmunofinidad.

En el primero de ellos se intentaría la purificación de LAM con el empleo de concanavalina A, reconociendo que las lectinas tienen gran afinidad por los polisacáridos, en este caso concanavalina A tiene afinidad por estructuras con manosa y galactosa. Sin embargo, puede obtenerse una co-purificación de LAM con otros polisacáridos de estructuras similares.

El empleo de anticuerpos monoclonales obtenidos en este trabajo servirían servirían para purificar LAM de un extracto crudo y así evitar una co-purificación con otros carbohidratos.

Como punto importante en la purificación de LAM para la cuantificación de carbohidratos totales se basaron en un principio en la reacción de antrona y ácido sulfúrico y el método de fenol ácido sulfúrico, este último resultó ser más práctico. Además por ensayos comparativos entre ellos empleando muestras estándar de glucosa, se establecieron resultados similares en cuanto a detección de carbohidratos, aunque el empleo del método fenol ácido sulfúrico resultó de mayor utilidad en su uso a nivel micro y menos pasos a seguir.

El seguimiento del esquema de inmunización por el método de ELISA en los ratones BALB/c demostró que las dosis y el período de tiempo fueron adecuados para, desarrollar una respuesta inmune, porque se observó el incremento de anticuerpos séricos de los animales. Así que resultó idóneo para estimular a los linfocitos del bazo que fueron utilizados posteriormente en la fusión celular.

*El aumento de la respuesta inmune observada observada durante las reinmunizaciones sugirió que el sistema inmune fue activado en su totalidad, mismo que se observa en las curvas de titulación de anticuerpos contra LAM de *M.tuberculosis*.*

Si bien los niveles de anticuerpos fueron similares en todos los animales los dos últimos refuerzos (reimmunizaciones) no mostraron ser diferentes. Lo que implica que la activación de la respuesta inmune con esta dosis y vía de inoculación fue la máxima, sin descartar la posibilidad de que otras vías y otras dosis de antígenos pudiesen ser de efecto diferente en la respuesta inmune.

Los hibridomas obtenidos de la fusión celular detectados como secretores de anticuerpos contra LAM por ELISA, inicialmente fue en alta proporción 50-60% de los pozos de cultivo celular en promedio en las tres fusiones celulares realizadas.

Sin embargo, se pierden hibridomas con el tiempo debido tal vez, a la pérdida de las características híbridas de estas células, también llamada pérdida de cromosoma que finalmente resulta en un 5-6% de los hibridomas originalmente obtenidos.

Por lo tanto, fue recomendable realizar una segunda y una tercera fusión celular, mismas que mostraron mejor producción de anticuerpos y se clonaron, en el caso de la segunda fusión por dilución limitante y fueron útiles para la producción del líquido de ascitis.

En las tres fusiones celulares realizadas hasta ahora se ha observado una lenta duplicación de la masa celular en función del tiempo, por ejemplo se contaron 200,000 hibridomas en una caja de cultivo celular de 85cm² al cabo de 6 semanas de cultivo, cuando en otros protocolos se señalan poblaciones de hibridomas de millones de ellos en similares condiciones de cultivo.

Aunque cabe mencionar que los anticuerpos monoclonales contra los que se hace esta comparación son dirigidos a antígenos protéicos que es a donde se dirigen la mayoría de las investigaciones a nivel mundial y quizá en lipolisacáridos resulte diferente la propagación de hibridomas.

Por ser unos cuantos pozos los que presentaron ese crecimiento celular aceptable se procedió a clonaras por la técnica de dilución limitante y expandirlas en cultivo in vitro para para obtención de mayor masa celular y obtención de anticuerpos monoclonales propiamente dicho.

Se pensó que la falta de masa celular era debido al suero fetal bovino suplementado al medio de cultivo (MME) era deficiente en los llamados factores de crecimiento, lo cual es común que suceda según la experiencia por grupos de expertos (63,82).

Por lo cual se decidió probar varias marcas comerciales de suero fetal bovino (Bioexport, in vitro, Gibco) sin obtener de ellos resultados importantes. Como alternativa se decidió suplementar el medio de cultivo celular (MME-SFB) con los llamados factores de crecimiento sintéticos los cuales se han empleado para el cultivo de hibridomas en medios libres de suero (47,65).

Particularmente se empleo el 2- mercaptoetanol (Sigma. EUA) en concentración de 5×10^{-5} M lo que permitió en un lapzo de 4 semanas un incremento sustancial de la masa celular que en promedio tenía 200,000 células al inicio aumentando a valores de 560,000 - 780,000 hibridomas.

Por lo cual estas células con mejor crecimiento, resultaron en tres clonas que se introdujeron en peritoneo de ratón, para la producción del líquido de ascitis. Se emplearon tres ratones adultos machos BALB/c de 12 semanas de edad para la producción de ascitis se procedió a sensibilizarlos con pristano después de 2 semanas se inmunosuprimieron con ciclofosfamida 24 horas antes de la introducción de los hibridomas en su el peritoneo (0.5 mg de ciclofosfamida/20 gr de peso) para depletar la población de linfocitos CD4.

Cuando se observó un notable crecimiento del vientre de los ratones se sacrificaron y se extrajo el líquido de ascitis después de seis semanas de haberlos inoculado con los hibridomas cultivados in vitro, este líquido de ascitis se tituló por ELISA y una semicuantificación del mismo. Esta semicuantificación ofreció un resultado cercano a 500

$\mu\text{g/ml}$ del líquido de ascitis que aparenta ser inferior a lo descrito por los protocolos de la producción de anticuerpos monoclonales que son del orden de 5-15 mg por ratón (54).

Se piensa como otra posibilidad que el bajo rendimiento de anticuerpos monoclonales fue debido a una deficiencia genética en los hibridomas obtenidos tal vez por la línea de mieloma utilizada o de la cepa de ratón.

Adicionalmente los hibridomas obtenidos fueron cultivados en presencia de IL-6 (Gibco BRL) que ha sido descrita como el principal factor de crecimiento para hibridomas, suplementándolo al medio de cultivo celular según las instrucciones del fabricante (5 unidades IL-6/ml de MME) sin embargo, el crecimiento de la masa celular no fue satisfactorio en realidad.

Los hibridomas de la tercera fusión celular fueron seleccionados únicamente por ELISA y se reconocieron a los secretores de anticuerpos de los pozos de cultivo y se conservaron por congelación para estudios posteriores. Pero cuyo comportamiento en cultivo "in vitro" no es diferente de las otras células provenientes de anteriores fusiones celulares.

La caracterización de los anticuerpos monoclonales en las clonas obtenidas hasta ahora correspondieron a el isotipo IgG_{2a} . Este fue caracterizado con un estuche comercial en un ensayo de tipo ELISA y se comprobó el resultado empleándose un estuche de fácil uso (Sigma ISO-1. EUA) con tiras de papel impregnadas con anticuerpos anti-isotipo.

La explicación de la igualdad del isotipo se debió probablemente a que las clonas derivaron de un mismo hibridoma madre del cultivo inicial (pozo 4 A 10). La comprobación hacia este aparente predominio de IgG_{2a} sobre otros isotipos estaría dado por la caracterización de otros anticuerpos provenientes de otras clonas o fusiones celulares o bien bajo comprobación en futuras fusiones celulares.

Los anticuerpos monoclonales obtenidos de esta manera fueron capaces de reconocer al antígeno de lipoarabinomana expresado en la superficie capsular de *M. tuberculosis*

por la técnica de inmunofluorescencia indirecta y no así en otro tipo de micobacterias, hongos y levaduras que no observaron reactividad con estos anticuerpos posiblemente estos microorganismos no expresan LAM o estructuras como LAM en su superficie.

Este tipo de reconocimiento por los anticuerpos monoclonales apoya la hipótesis, que establece la presencia de lipoarabinomanana en la cápsula de *M.tuberculosis* (85).

Los sobrenadantes solubles obtenidos de los sonicados de diferentes microorganismos y aplicados en la técnica de inmunodot mostraron en su gran mayoría reactividad cruzada con el anticuerpo monoclonal 11:6 esto explica que este antígeno es común en el género de micobacteria (58). También esto se demostró con los anticuerpos policlonales y con el monoclonal de referencia.

Se han descrito estructuras similares a LAM de *M.tuberculosis* en *Nocardia* y *Corynebacteria* (1) y estructuras de mananas se han descrito para *Candida* (59). Se ha evidenciado la reactividad inmunológica de anticuerpos hacia *M.tuberculosis* que reconocen también a *Histoplasma Capsulatum* (87) lo que explica los resultados obtenidos del inmunodot.

Un aspecto importante en la realización de este inmunodot con el anticuerpo monoclonal LAM 11:6 es el no reconocimiento a LAM de referencia y en contraste, sí reaccionó contra LAM purificado en el laboratorio; esto sin lugar a duda es motivo de posteriores investigaciones para determinar el epítipo que están reconociendo estos anticuerpos monoclonales en la estructura de lipoarabinomanana.

Es importante también el efectuar este tipo de reconocimiento de epítopes con los demás anticuerpos monoclonales de las clonas que hasta este momento se guardan en congelación.

Por otra parte, el ensayo de ELISA con el anticuerpo monoclonal LAM 11:6 con las estructuras provenientes de los sonicados de los diferentes microorganismos permitió

diferenciarlos por lecturas de absorbancia a una concentración fija de carbohidratos (5µg/ml).

Se tomó como base un punto de corte de 0.3 leído a 492 nm esto correspondió a 2 veces el valor promedio del control negativo en la placa de ELISA y este ensayo se realizó por duplicado. Únicamente un valor de absorbancia mayor al de LAM de *M.tuberculosis* fue obtenido en *M.avium* esto fue tal vez debido a que la presencia de LAM es mayor en el sonicado de esta micobacteria en relación al LAM purificado de *M.tuberculosis*.

Sin embargo la diferencia en las lecturas de ELISA ha permitido reconocer a cada micobacteria, lo que no fue posible realizar en el inmunodot. Aunque sería recomendable realizar este ensayo de ELISA empleando muestras de prensados de *M.tuberculosis* y *M.avium* para tener iguales condiciones en las muestras a ensayar.

La estructura de LAM es bien conocida por ensayos de espectroscopía de infrarrojo (56) y resonancia magnética (38). Su composición de azúcares y las uniones entre ellas establece los sitios antigénicos importantes que quizá no solamente sean de conformación sino de una implicación en la patogénesis en la evocación de la respuesta inmune.

Se sugiere entonces que pudieran estar involucrados en la diferenciación de especies en el género de las micobacterias.

8. CONCLUSIONES

- 1.- *Se ha logrado obtener lipoarabinomanana en bajos rendimientos, sin embargo, este antígeno es reconocido por ELISA, en electroforesis se demostró su pureza. Es necesario continuar la estandarización del método de purificación.*
- 2.- *Es necesario optimizar la metodología de producción de hibridomas, para obtener una mayor cantidad de líquido de ascitis que nos permita finalizar los ensayos de caracterización.*
- 3.- *La técnica de inmunofluorescencia ha resultado muy útil ya que permitió identificar *M.tuberculosis* de otros microorganismos, provenientes de cultivos. Su utilidad en muestras clínicas estaría sujeta a una estandarización.*
- 4.- *La técnica de ELISA ha mostrado utilidad en el reconocimiento de lipoarabinomanana de *M.tuberculosis* diferenciando estructuras internas de otros microorganismos. Con este tipo de ensayos podremos obtener la especificidad de la prueba y aplicarlo a muestras clínicas.*

9. APENDICE

9.1 METODO DE CUANTIFICACION DE CARBOHIDRATOS.

El método empleado en la cuantificación carbohidratos totales en la técnica de purificación de lipoarabinomana se basa en la reacción de fenol sulfúrico la cual tiene como fundamento en la deshidratación de polisacáridos para formar furfurales de pentosas y hidroximetil furfurales de hexosas cuando han estado en presencia de ácido sulfúrico. De esta forma las soluciones de furfurales o hidroximetilfurfurales son tratados con otro reactivo (una amina aromática o un fenol) y producir un compuesto coloreado el cual puede ser determinado en un colorímetro o un espectrofotómetro.

De los diversos métodos que aplican este fundamento el método fenol sulfúrico han sido se ha caracterizado por su simplicidad y su relativa sensibilidad en la determinación de carbohidratos microbianos representados cuantitativamente como índice de carbohidratos totales. Para la aplicación de este método se realiza primero la determinación de carbohidratos con muestras estándar de glucosa en solución a concentraciones de 2 a 20 µg/ml las lecturas colorimétricas de este ensayo sirven para obtener una curva patrón, o bien introducir estas cantidades como control interno dentro del desarrollo del micrométodo.

El micrométodo en cuestión necesita de una placa de 96 pozos de poliestireno como la empleada en el desarrollo de un inmunoenzayoenzimatico (ELISA). Para el desarrollo de este ensayo se deben emplear muestras estándar y/o muestras problema por duplicado, y de igual manera se emplearan soluciones blanco, de esta manera se depositan en los pozos 20 µl de muestra, seguidamente se depositan 20 µl de solución de fenol al 5% a cada pozo y se agita levemente durante 30 segundos, posteriormente se deposita en cada pozo 100 µl de ácido sulfúrico concentrado cuidadosamente se agita durante 2 minutos y se aprecia una coloración, se deja reposar durante 5 minutos y se leen las absorbancias en un lector de ELISA comercial a 492 nm.

9.2 MATERIALES Y REACTIVOS

MATERIAL PARA PURIFICACION DEL ANTIGENO DE LAM

- Bio-gel A-5 m (Biorad: 151-07-40, E.U.A).
- Bomba peristáltica (Bucheler Instruments: Polystaltic pump, E.U.A).
- Centrifuga (Dupont: Sorvall RC-5B, E.U.A).
- Colector de fracciones (Pharmacia: Frac-100, Suecia).
- Columna LKB. (Bromma LKB: 80 cm X 1.5 cm diámetro, Suecia).
- Columna LKB. (Bromma LKB: 110 cm X 1.5 cm diámetro, Suecia).
- Desoxirribonucleasa I (Sigma: D 4263, E.U.A).
- Espectrofótometro (Gilford Instruments, E.U.A).
- Gel de DEAE Sephacel (Pharmacia: 17.0500-01, Suecia).
- Liofilizadora (Labconco: Frezze Dryer 18, E.U.A.).
- Membranas de diálisis (Spectrapor: 12000-14000, E.U.A).
- Mezclador de gradientes (Pharmacia: Gradient Mixer GM-1, Suecia).
- Placas de ELISA (Nunc: Maxisorp, Dinamarca).
- Prensa X (Ab Biok Nacka: X-25, Suecia).
- Ribonucleasa I-A (Sigma: R 4875, E.U.A).
- Sonicador (Labsonic Systems: Lab Line Ultratip, E.U.A).
- Tubos cónicos 50ml (Becton Dickinson: Falcon 2070, E.U.A).
- Tubos de vidrio Pyrex (13 X 100 mm).

MATERIALES PARA CULTIVO CELULAR

- Baño metabólico (Precision Scientific: Waterbath 183, E.U.A)
- Botellas de cultivo celular de 80 cm² (Nunc: Nunclon 153732, E.U.A)
- Botellas de cultivo celular de 175 cm² (Nunc: Nunclon 156502, E.U.A).
- Centrifuga refrigerada (Sorvall: RT 6000B, E.U.A).
- Etanol 70%.

- Glutaraldehído 2%.
- Incubadora con 5% de CO₂ 85% de humedad y 37°C (Forma Scientific: Stericult 200, E.U.A).
- Kit para isotipificación de anticuerpos monoclonales (Sigma Immunochemicals: Iso-2, E.U.A).
- Medio mínimo esencial (MME) con 10% suero fetal bovino.
- Medio salino.
- Micropipetas de 0.5-10 µl; 5-40 µl; 40-200 µl; 200-100 µl (Finnpipette Digital, Finlandia).
- Microscopio invertido (Carl Zeiss: IM, Alemania).
- Stock de células de mieloma P3X63Ag8.653 criopreservadas (-196°C).
- Tubos cónicos estériles de 15 y 50 ml (Becton Dickinson: Falcon 2095 y 2070, E.U.A) .
- Membrana de Nitrocelulosa (Sigma: N-2764, E.U.A).

MATERIALES PARA LA EXTRACCION DEL BAZO.

- Cajas petri estériles (Technicare, 100 X 15 mm, México) .
- Cámara de anestesia con éter.
- Centrifuga refrigerada (Sorvall: RT600B, E.U.A).
- Cuchara estéril.
- Malla de nailon estéril.
- Pinzas y tijeras de disección estériles.
- Pipetas serológicas estériles de 1ml, 5ml, 10 ml y 25 ml (Becton Dickinson: Falcon, E.U.A).
- Pipetor (Drummond: pipet aid 7775110, E.U.A).
- Ratón BALB/c hiperinmunizado.
- Tubos cónicos estériles de 15 y 50 ml (Becton Dickinson: Falcon, 2095 y 2070, E.U.A).

MATERIALES PARA FUSION CELULAR

- Baño metabólico (Presicion Scientific: Waterbath 183, E.U.A)
- Cámara de Neubauer (Superior: 0.0025 mm², Alemania)
- Células de bazo de ratón hiperinmune.
- Células de mieloma P3X63Ag8.653 en crecimiento exponencial.
- Centrifuga refrigerada (Sorvall: RT600B, E.U.A) .
- Incubadora (Forma Scientific: Steri cult 200, E.U.A).
- Microplacas de cultivo de 96 pozos (Becton Dickinson: Falcon

- 3072, E.U.A) sensibilizadas con macrófagos de peritoneo.
- Pipeta multicanal (Dynatech: 50-200, E.U.A).
- Pipetas Pasteur estériles.
- Pipetas serológicas de 1ml, 5ml, 10ml, 25ml (Becton Dickinson: Falcon, E.U.A).
- Pipetor (Drummond: pipet aid 7775L10, E.U.A).
- Placas de cultivo de 24 y 6 pozos (Becton Dickinson: 3047 y 3046 Falcon, E.U.A).
- Puntas estériles de plástico (ELKAY: 000-00000-024, E.U.A).
- Tubos cónicos de 50 ml (Becton Dickinson: Falcon 2070, E.U.A).

SOLUCIONES Y REACTIVOS

- Adyuvante completo de Freund (Difco: 0638-60-7, E.U.A).
- Agente fusógeno. 2.0 gr polietilenglicol 4000 (Merck: 9727, Alemania); 1 ml dimetilsulfóxido (Sigma: D 2650) 10 ml medio salino; esterilizar.
- 3,3'-Diaminobencidina (Sigma: D 8126, E.U.A).
- Hidróxido de Amonio (J.T Baker: 9721-59, México).
- Nitrato de Plata (Kodak: Reagent ACS, E.U.A).
- L-Glutamina (Gibco: 300-2420AD, E.U.A)
- Medio Mínimo Esencial. (MME) (Gibco: 410-1700, E.U.A) en 1000 ml de H₂O desionizada. Esterilizar y suplementar.
- Medio MME-HAT. Hipoxantina (Sigma: H-9377, E.U.A) 10 mM; Aminopterina (Sigma: A-2255, E.U.A) 0.04 mM; Timidina (Sigma: T-9250, E.U.A) 1.6 mM
- Medio MME-HT. Hipoxantina (Sigma: H-9377, E.U.A) 10 mM; Timidina (Sigma: T-9250, E.U.A) 1.6 mM.
- Medio salino. NaCl 8.0 gr; KCl 0.4 gr; Na₂HPO₄·2H₂O 1.77 gr NaH₂PO₄·H₂O 0.69 gr; Glucosa 2.0 gr; Rojo de fenol 0.01 gr llevar a 1000 ml con H₂O.

- Medio de Proskauer-Beck modificado de Youmans.
Asparagina 5.0 gr; KH_2PO_4 5gr; KSO_4 6.5 gr; Citrato de sodio 0.68 gr; MgCl 0.19 gr; Glicerol 50 ml, llevar a 1000 ml de H_2O pH 6.8; Esterilizar.
- Orto-fenilendiamina (Sigma: P 1526, E.U.A).
- Pristano (Sigma: Hibrimax P-1403, E.U.A).
- Solución de ácido sulfúrico 1N.
55 ml de H_2SO_4 (95% J.T Baker, México) y llevar a 1000 ml con H_2O .
- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).
 NaCl 16 gr; Na_2PO_4 5.8 gr; KH_2PO_4 0.4 gr; KCl 0.4 gr
 H_2O 2000 ml.
- Solución amortiguadora de citratos.
ácido cítrico 0.730 gr; Na_2HPO_4 1.180 gr
 H_2O 100 ml.
- Solución amortiguadora de tris-base (TBS).

Tris-Base 2.42 gr; NaCl 29.2 gr; 100 ml H_2O .
- Suero fetal bovino (Gibco: 210-6510 AJ, E.U.A).
- Sulfato de Gentamicina (Sigma: G1397, E.U.A).

10. BIBLIOGRAFIA

- 1 Afou-Zad C, Hardee M, Samsson S, Curran C. 1988. Cross reactivity from the cytoplasm and cell walls of some Corynebacterium and Mycobacterium. *J. Hyg. Camb.* 101: 170-177.
- 2 Altman S, Meade W.R. 1984. Extrapulmonary tuberculosis revisited: A review of experience at Boston City and other hospitals. *Med. Clin. N. Am.*
- 3 American Thoracic Society. 1990. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 142: 725-735.
- 4 Balows A. 1991. Mycobacterium. *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. American Society for Microbiology 5th ed. Washington D.C. 34: 316-317.
- 5 Brisson-Noel A, Aznar Ch, Chateau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, Bouety R, Pialoux G, Gicquel B, Garrigue G. 1991. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet*. 338: 364-365.
- 6 Burrows W. 1974. *Tratado de Microbiología*. Ed. Interamericana Su edición México D,F p.576-577.
- 7 Brennan P.J. 1989. Structure of mycobacteria: Recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev.Infect.Dis.* 11 suppl. 2:3420-3430.
- 8 Butler R.W, Jost C.K, Kilburn O.J. 1991. Identification of Mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J.Clin.Microbiol.* 29:11 2468-2472.
- 9 Calderon O.A, Arbos M.J. 1975. *Manual de técnicas en micobacteriología*. Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias. Centro Nacional de Microbiología Majadahonda. Madrid, España. pp 20-40.
- 10 Cicero R.S, Ramirez C.E, Ramirez P.S, Viamontes J.L. 1989. Tuberculosis y DNA en Mexico. *Boletín Mensual de epidemiología. IMZiro.* 4:9 124-129.
- 11 Chan J, Fan X, Hunter W.S, Brennan J.P, Bloom P.B. 1991. Lipocarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* 59:5 1755-1761.

10. BIBLIOGRAFIA

- 1 *Abou-Zeid, C. Harboe, M. Sundsten, B. Cocito, C. 1985. Cross reactivity from the cytoplasm and cell walls of some Corynebacteria and Micobacteria. J.Infec.Dis.151:1 170-177.*
- 2 *Alvarez, S. Mccbe, W.R. 1984. Extrapulmonary tuberculosis revisited: A review of experience at Boston city and other hospitals. Med. 63:1 25-53.*
- 3 *American Thoracic Society. 1990. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. Am.Rev.Respir.Dis. 142: 725-735.*
- 4 *Balows, A. 1991. Mycobacterium. Manual of Clinical Microbiology. Ed.American Society for Microbiology 5th ed. Washington D.C. 34: 316-317*
- 5 *Brisson-Noel, A. Aznar, Ch. Chareau, C. Nguyen, S. Pierre, C. Bartoli, M. Bonete, R. Pialoux, G. Gicquel, B. Garrigue, G. 1991. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. Lancet. 338: 364-365.*
- 6 *Burrows, W. 1974. Tratado de Microbiología. Ed. Interamericana 3a edición México D,F p.576-577.*
- 7 *Brennan, P.J. 1989. Structure of mycobacteria: Recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. Rev.Infect.Dis.11 suppl. 2:S420-S430.*
- 8 *Butler, R.W. Jost, C.K. Kilburn, O.J. 1991. Identification of Mycobacteria by high-performance liquid chromatography. J.Clin.Microbiol.29:11 2468-2472.*
- 9 *Calderon, O.A. Arbos, M.J. 1975. Manual de técnicas en micobacteriología. Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias. Centro Nacional de Microbiología Majadahonda. Madrid, España. pp 20-40.*
- 10 *Cicero, R.S. Ramírez, C.E. Ramírez, R.S. Viramontes, J.L. 1989. Tuberculosis y SIDA en Mexico. Boletín Mensual de epidemiología. México. 4:9 124-129.*
- 11 *Chan, J. Fan, X. Hunter, W.S. Brennan, J.P. Bloom, R.B. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of Mycobacterium tuberculosis within macrophages. Infect. Immun. 59:5 1755-1761.*

- 12 Coates,A.R.M. Hewitt,J. Allen,B.W. Ivanyi,J. Mitchison,D.A. 1981. Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies. *Lancet*. ii 167-169.
- 13 Coligan,E.J. Kruisbeek,M.A. Marguiles,H.D. Shevach,M.E. Strober,W. 1991. Production of monoclonal antibodies: Basic protocol. *Current protocols in immunology*. John Wiley and Sons 2.5.1 - 2.5.17.
- 14 Daniel,T.M. 1987. New approaches to the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. *J.Infec.Dis.* 155:4 599-602.
- 15 Daniel,M.T. 1988. Antibody and antigen detection for the immunodiagnosis of tuberculosis: why not? what more is needed? where do we stand today? *J.Infect.Dis.* 158:4 678-680.
- 16 Daniel,T.M. Debanne,S.M. 1987. The serodiagnosis of tuberculosis and mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am.Rev.Respir.Dis.* 135: 1137-1151.
- 17 Daniel,T.M. Janicki,B.W. 1978. Mycobacterial antigens: A review of their isolation, chemistry, and immunological properties. *Microbiol.Rev.* 42:1 84-113
- 18 Damiani,B. Beltrame,A. Vismara,A. Mezzopreto,D. Colizzi,F.M. Young,V. B.D. Bloom, R.B. 1988. Generation and characterization of monoclonal antibodies to 28-35 and 65-kilodalton proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infec.Immun.* 56:5 1281-1287
- 19 Dewit,D. Steyn,L. Shoemaker,S. Sogin,M. 1990. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J.Clin.Microbiol.* 28:11 2437-2441.
- 20 De Young,G.H. 1986. Monoclonal Antibodies: promises fulfilled. *High Technol.* february 33-41
- 21 Eisenach,D.K. Sifford,D.M. Cave,D.M. Bates,H.J. Crawford,J.T. 1991. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polimerase chain reaction. *Am.Rev.Respir.Dis.* 144:1160-1163.
- 22 Eilner,J.J. Daniel,T.M. 1979. Immunosuppression by *Mycobacterium arabinomannan*. *Clin.Exp.Immunol.* 35:250-257.

- 23 Ekins,R. 1989. *A shadow over immunoassay. Nature.* 340:256-258.
- 24 Fazekas,de St.G. Scheidegger,D. 1980. *Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J.Immunol.Met.* 35:1-21
- 25 Fentanes,G.E. 1988. *Biotecnología:oportunidades y amenazas. Ciencia y Desarrollo.* 80:21-40
- 26 Fife,D. Crane,L.G. Bishburg,E. 1991. *Cumulative AIDS incidence and altered mortality from mycobacterial disease: New Jersey. Am.Rev.Respir Dis.*143:717-720.
- 27 Figueroa,M.E. Rasheed,S. 1991. *Molecular pathology and diagnosis of infectious diseases. A.J.C.P. Suppl.*1 95:4 S8-S21.
- 28 French,G.L. Chan,C.Y. Cheung,S.W. Teoh,R. Humpries,M.J. O'Mahony,G.O. 1987. *Diagnosis of tuberculous meningitis by detection of tuberculostearic acid in cerebrospinal fluid. Lancet.* ii 117-119.
- 29 Gilles,D. Desseault,M. 1979. *Tuberculous meningitis in children: a retrospective study of 79 patients,with an analysis of prognostic factors. CMA J.*120:305-309.
- 30 Gillis,P.T. Buchanan,M.T. 1982. *Production and partial characterization of monoclonal antibodies to Mycobacterium leprae. Infect.Immun.* 37:1 172- 178.
- 31 Girling,D.J. Darbyshire,H.J. Humpries,M.J. O'Mahoney,G.S. 1988. *Extrapulmonary tuberculosis. Br.Med.Bull.* 44:3 738-756.
- 32 Gonzales,L.A. Knappe,A.W. Fischer,W.G. Kelsey,K.D. Raff,V.H. 1991. *Comparative protective activity of human monoclonal and hyperimmune polyclonal antibody against group B Streptococci. J.Infect.Dis.* 163:792-798.
- 33 Goding,J.W. 1986. *Monoclonal antibodies: Principles and practice. Academic Press, San Diego, USA.* 1-53.
- 34 Groschel,M.H.D. 1982. *The etiology of tuberculosis: A tribute to Robert Koch on the occasion of the centenary of his discovery of the tubercle bacillus. ASM News.* 48:6 248-250.
- 35 Hermans,P.W.M. Van soolingen,D. Dale,W.J. Schuitema,R.J.A. Mcadam,R.A.M. Catty,D. Vanembden,J.D.A. 1990. *Insertion element IS 986 from Mycobacterium*

- tuberculosis: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J.Clin.Microbiol.* 28:9 2051-2058.
- 36 Hewitt,J. Coates,A.R.M. Mitchison,D.A. Ivanyi,J. 1982. The use of murine monoclonal antibodies without purification of antigen in the serodiagnosis of tuberculosis. *J.Immunol.Methods.* 55: 205-211.
- 37 Hill,R.A. Premkumar,S. Brustein,S. Vaidya,K. Powell,S.L.P Suster,B. 1991. Disseminated tuberculosis in the acquired immunodeficiency syndrome era. *Am.Rev.Respir.Dis.* 144:1164-117.
- 38 Hunter,S.W. Gaylord,H. Brennan,P.J. 1986. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *J.Biol.Chem.* 261:26 12345-12351.
- 39 Ivanyi,J. Morris,J.A. Keen,M. Studies with monoclonal antibodies to mycobacteria. *Monoclonal Antibodies Against Bacteria.* ed.Academic Press Inc. 1:59-89.
- 40 Itoh,T. 1985. Biotech trends in the japanese pharmaceutical industry. *Bio.Technol.* 5:794-799.
- 41 Kadival,V.G. Chaparas,D.S. 1987. Production, characterization, and species specificity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* 25:1 76-80.
- 42 Kadival,V.G. Mazarelo,S.M.B.T. Chaparas,D.S. 1986. Sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of antigen in tuberculous meningitis cerebrospinal fluids. *J.Clin.Microbiol.* 23:5 901-904.
- 43 Kennedy,D.H. Fallon,R.J. 1979. Tuberculous meningitis. *JAMA* 241: 264-268.
- 44 Kohler,B.R. 1986. Antigen detection to diagnose bacterial infections. *CRC Press Inc.Boca raton Flo. USA.* II:156-158.
- 45 Kohler,G. Milstein,C. 1975. Continuous culture of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256:495-497.
- 46 Koch, R. 1882. Die Aetiologie der tuberculose. *Berl.Klin.Wochenschr.* 19:221-230.

- 47 Kovar, J. Franek, F. 1986. Serum-free medium for hybridoma and parenteral myeloma cell cultivation. *Methods Enzymol.* 121:23 277-294
- 48 Krambovitis, E. McInurray, M.B. Lock, P.E. Hendrickse, W. Holzel, H. 1984. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by latex particle agglutination. *Lancet* ii:1229-1231.
- 49 Kurstak, E. 1986. *Enzyme Immunodiagnosis.* Academic Press, San Diego USA. 1-40.
- 50 Levis, R.W. Meeker, C.H. Schuller-Levis, G. Sersen, E. Brennan, P.J. Fried, P. 1987. Mycobacterial carbohydrate antigens for serological testing of patients with leprosy. *J. Clin. Infec. Dis.* 156:5 763- 765.
- 51 Maldonado, M. 1992. El tercer mundo en la era de la Biología. *Información Científica y Tecnológica.* 163:25-30.
- 52 Mathieson, P.W. Cobbold, P.S. Hale, G. Clark, M.R. Oliveira, D.B.G. Lockwood, C.M. Waldmann, H. 1990. Monoclonal antibody therapy in systemic vasculitis. *N. Engl. J. Med.* 233:4 250-254.
- 53 McDonough, J.A. Sada, D.E. Sippola, A.A. Ferguson, E.L. Daniel, T.M. 1992. Microplate and dot immunoassay for the serodiagnosis of tuberculosis. *J. Lab. Clin. Med.* 120:2 318-322.
- 54 Milstein, C. Galfré, G. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. *Methods Enzymol.* 92: part E 42-44.
- 55 Minden, P. Kelleher, J.P. Freed, H.J. Nielsen, D.L. Brennan, J.P. McPherson, L. McClatchy, K. 1984. Immunological evaluation of a component isolated from *Mycobacterium bovis* BCG with a monoclonal antibody to *M. bovis* BCG. *Infect. Immun.* 46:2 519-525.
- 56 Misaki, A. Azuma, I. Yamamura, Y. 1977. Structural and immunochemical studies on D-arabino-D-mannans and D-mannans of *Mycobacterium tuberculosis* and other *Mycobacterium* species. *J. Biochem.* 82: 1759-1770.
- 57 Misaki, A. Yukawa, S. Tsuchiya, K. Yamasaki, T. 1966. Studies on cell walls of *Mycobacteria*. I. Chemical and biological properties of the cell walls and the mucopeptide of BCG. *J. Biochem.* 59:4 388-396.

- 58 Misaki,A. Yukawa,S. 1966. Studies on cell wall of *Mycobacteria* II. Constitution of polysaccharides from BCG cell walls. *J.Biochem.* 59:5 511-520.
- 59 Nakamura, A.Ishikawa, N.Suzuki,H. 1991. Diagnosis of invasive candidiasis by detection of mannan antigen by using the avidin-biotin enzyme immunoassay. *J.Clin.Microbiol.* 29:11 2363-2367.
- 60 Olds,R.G. Sanson,J.A. Daniel,M.T. 1987. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 epitopes by using a panel of 19 monoclonal antibodies. *J.Clin.Microbiol.* 25:3 471-475.
- 61 Patel,J.R. Fries,W.J. Piessens,F.W. Wirth,F.D. 1990. Sequence analysis and amplification by polimerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol* 28:3 513-518
- 62 Peterson,M.E. Lu,R. Floyd,C. Nakasone,A. Friedly,G. Dela Maza L.M. 1989. Direct identification of *Mycobactetrium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*,and *Mycobacterium intracelulare* from amplified primary cultures in BACTEC media using DNA probes. *J.Clin.Microbiol.* 27:7 1543- 1547.
- 63 Pintus,C. Ransom,H.J. Evans,H.CH. 1983. Endothelial cell growth supplement:a cell cloning factor that promotes the growth of monoclonal antibody producing hybridoma cells. *J.Immunol.Methods.* 61:195-200
- 64 Pitchenik,E.A. 1990. Editorials: Tuberculosis control and the AIDS epidemic in develeoping countries. *Ann.Intern.Med.* 113:2 89-91.
- 65 Pollard,W.J. Walker,M.J. 1989. Animal cell culture. *Methods in molecular biology.* Ed.Humana Press, Clifton N.J USA. 5:601-668.
- 66 Ramírez,O.T. -Sureshkumar,G.K. Mutharasan,R. 1990. Bovine colostrum or milk as a serum substitute for the cultivation of a mouse hybridoma. *Biothechnol.Bioeng.* 35:882-889.
- 67 Ratafia,M. 1987. Mammalian cell culture: Worldwide activities and markets. *Bio.technol.* 5:692-694.
- 68 Ribera,E. Martinez- Vazquez,J.M. Ocaña,I. Segura,R.M. Pascual,C. 1987. Activity of adenosine deaminase in cerebrospinal fluid for the diagnosis and follow-up of tuberculous meningitis in adults. *J.Infec.Dis.* 155:4 603-611.

- 69 Riechmann,L. Clark,M. Waldmann,H.W. 1988. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 332: 323-327.
- 70 Roberts,C.M. Mcmillan,C. Coyle,C.M. 1987. Whole chromosomal DNA probes for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* Complex. *J.Clin.Microbiol.* 25:7 1239-1243.
- 71 Rumschlag,H.S. Yakrus,M.A. Cohen,L.M. Glickman,S.E. Good,R.C. 1990. Immunologic characterization of a 35-kilodaltons recombinant antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* 28:3 591-595.
- 72 Sada,E. Aguilar,D. Torres,M. Herrera,T.1992. Detection of Lipoarabinomannan as Diagnostic Test for Tuberculosis. *J.Clin.Microbiol.* 30:9 2415-2418.
- 73 Sada,E. Brennan,P.J. Herrera,T. Torres,M. 1990. Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. *J.Clin.Microbiol.* 28: 12 2587-2590.
- 74 Sada,E. Ferguson,E.L. Daniel,M.T. 1990. An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000 Da native antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Infec.Dis.* 162:928-931.
- 75 Sada,E. Ruiz-Palacios,G.M. López-Vidal,Y. Ponce de León,S. 1983. Detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* ii:651-652.
- 76 Sada,D.E. Torres,R.M. Herrera,B.T. 1988. Nuevos métodos diagnósticos en tuberculosis. *Rev.Inst.Nal.Enf.Resp.Mex.* 1:2 121-125.
- 77 Secretaria de Salud. 1991. Manual de normas y procedimientos para la prevención y control de la tuberculosis. Sistema Nacional de Salud.1-5
- 78 Shin-ichi,Y. Ochi,H. Ohtsuka,H. Kato,M. Noguchi,H. 1989. Heterogeneity of the L-Rhamnose residue in the outer core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide characterized by using human monoclonal antibodies. *Infec.Immun.* 57:6 1691-1696.
- 79 Steele,B.A. Daniel,T.M. 1991. Evaluation of the potential role of serodiagnosis of tuberculosis in a clinic in Bolivia by decision analysis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 143:713-716.
- 80 Sternberg,K. 1991. Biotech grows up. *Chem.Week.* 146:2 16-26.

- 81 Styblo,K. 1989. *Overview and epidemiologic assessment of the current global tuberculosis situation with a emphasis on control in developing countries.* *Rev.Infec.Dis.*11 suppl. 2:S339-340.
- 82 Sugasawara,J.R. 1988. *Hybridoma growth factors.* *Biotechnol.* 6:895-902.
- 83 Yañez,A.M. Coppola,P.M.R.A.D. Delaha,E. Chaparas,D.S. Yeager,H. 1986. *Determination of Mycobacterial antigens in sputum by enzyme immunoassay.* *J.Clin.Microbiol.* 23:5 822-825.
- 84 Yelton,D.E. Schoerff,M.D. 1981. *Monoclonal antibodies: A powerful a new tool in biology and medicine.* *Am.Rev.Biochem.* 50:657-680.
- 85 Young,B.D. 1988. *Structure of mycobacterial antigens.* *Br.Med.Bull.* 44:3 562-583.
- 86 Watt,G. Zaraspe,G. Bautista,S. Laughlin,W.L. 1988. *Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by using an enzyme-linked immunosorbent assay to detect Mycobacterial antigen and antibody in cerebrospinal fluid.* *J.Infect.Dis.* 158:4 681-685.
- 87 Wheat,J. French,L.V.M. Kamel,S. Tewari,P.R. 1986. *Evaluation of cross-reactions in Histoplasma capsulatum serologic test.* *J.Clin.Microbiol.* 23:3 493-499.