

**“Evaluación de Antígenos
recombinantes de
Mycobacterium tuberculosis
frente a la tuberculina PPD**

Tesis para optar al título de Magíster en
Microbiología Molecular

Alumna: Bioq. Claudia L. Argüelles

Director: Dr. Esteban Bontempi

Servicio Derivados de Micobacterias
Instituto Nacional de Producción de Biológicos

2011

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Esteban Bontempi por haber aceptado la dirección de esta tesis, por todo su aporte y crítica corrección.

Al Dr. Angel Cataldi por guiarme y permitirme realizar gran parte de este trabajo en su laboratorio del Instituto de Biotecnología perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Castelar.

A la Dra. Alicia Alito, por su dedicación y enseñanza en mis primeros pasos en las técnicas de biología molecular.

A los organizadores de esta maestría, especialmente a la Dra. Mirta Carlomagno por su aliento permanente.

A la Lic. Lucia Barrera y Med. Vet. Beatriz López por la lectura crítica del manuscrito.

A Rut, por su apoyo incondicional, por hacerme sentir que siempre está, en las buenas y en las malas.

A Tania y Gerardo, por su compañerismo, buena onda y predisposición que hacen más fácil la rutina diaria.

A Ariana, por brindarme todo su conocimiento y apoyo.

A la Lic. María Luisa Brero, por su ayuda desinteresada, por facilitarnos las tareas aportándonos lo que nos falta; insumos, equipos, y sobre todo por sus buenos y oportunos consejos.

A mis “viejos”, sin ellos no sería lo que soy.

A Ale, por su gran amor y comprensión.

A mis hijos, Tomás y Martina, por el tiempo que les quité de “mamá” para realizar este trabajo.

Carátula	i
Agradecimientos	ii
Índice general	iii
Abreviaturas	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
Resumen	x
I- INTRODUCCION	1
TUBERCULOSIS:	1
1-Agente etiológico	1
2-Epidemiología	2
3-Historia Natural	5
4-Respuesta inmune	9
5-Diagnóstico	11
6-Prueba cutánea de la Tuberculina (PCT)	13
6-1. Historia	13
6-2 Utilidad e interpretación	16
6-3 Tipos de Tuberculina	17
Evolución de las Tuberculinas	17
Tuberculina usada en nuestro país	19
6-4 Antígenos específicos de <i>M.tuberculosis</i> utilizados en nuevos reactivos	20
II-OBJETIVOS	25
III-MATERIALES Y METODOS	26
ANTIGENOS RECOMBINANTES	26
Obtención de rAg 85B	26
Obtención de cultivos de <i>M.tuberculosis</i>	26
Obtención de ADN micobacteriano	26
Amplificación del gen por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
Clonado del producto de PCR	31

Subclonado en el plásmido de expresión	32
Expresión de la proteína recombinante	33
Análisis por SDS-PAGE y WESTERN-BLOT	34
Purificación de la proteína recombinante	35
ENSAYOS DE DTH	36
Cultivos y cepas bacterianas	36
Preparación de antígenos y productos	36
Sensibilización de cobayos	37
Test cutáneo	38
Ensayo de potencia relativa del PPD 1-94 frente al PPD RT-23	38
Ensayo de comparación de reactividad de rAgs frente al PPD 1-94.	39
IV-RESULTADOS	41
Amplificación y clonado del gen del rAg 85B	41
Expresión de la proteína recombinante	45
Purificación de la proteína	47
Ensayos de DTH en modelo animal: Pruebas cutáneas	48
Potencia relativa de PPD 1-94 frente a PPD RT-23	48
Reactividad de los antígenos recombinantes de <i>M.tuberculosis</i>	49
Reactividad de una mezcla de rAgs frente al PPD 1-94	54
V-DISCUSIÓN	57
VI-CONCLUSIONES	62
VII-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	63
ANEXO	71

ABREVIATURAS

Ac:	Anticuerpo
ADN:	Acido Desoxiribonucleico
ANLIS:	Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud
BCG:	Bacilo Calmette-Guérin
BCIP:	5-Bromo-4-cloro-3-indolfosfato
BE:	Bromuro de etidio
BREFA:	Buffer de Fosfatasa Alcalina
CD:	Células dendríticas
CEPANZO:	Centro Panamericano de Zoonosis
CFP-10:	Proteína de filtrado de cultivo 10 kDa (del inglés <i>Culture Filtrate Protein-10kDa</i>)
CTAB:	Bromuro de (N-cetil-N,N,N-trimetil) amonio
Da:	Dalton
DO:	Densidad óptica
DS:	Desvío estándar
DTH:	Hipersensibilidad tardía (del inglés <i>Delayed-type Hypersensitivity</i>)
<i>E.coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESAT-6:	Antígeno de secreción temprana para células T
FDA:	Food and drug administration
i.d:	intradérmica
IgG:	Inmunoglobulina G
IGRAs:	Ensayos de producción de interferón gamma (del inglés <i>Interferon Gamma Release Assays</i>)
IL:	Interleuquina
INF- γ:	Interferón gamma
INPPAZ:	Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis
IPTG:	Isopropil- β -tiogalactopiranosido
IUATLD:	The International Union Against Tuberculosis and Lung Disease
kb	kilobase
kDa:	kiloDalton
LAM:	Lipoarabinomanosa
LB:	Luria Bertani
LT:	Linfocito T
LTBI:	Infección latente de Tuberculosis (del inglés <i>Latent Tuberculosis infection</i>)
M:	Molar

mA:	miliamper
mg:	miligramo
µg:	microgramo
ml:	mililitro
mm:	milímetro
mM:	miliMolar
<i>M.tuberculosis:</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NBT:	Tolidueno nitroazul de tetrazolio
NK:	<i>Natural killer</i>
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OPS:	Organización Panamericana de la Salud
OT:	Vieja o Antigua Tuberculina (del inglés <i>Old Tuberculin</i>)
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
pb:	pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PCT:	Prueba cutánea a la Tuberculina
pmol	picomol
PPD:	Derivado Proteico Purificado (del inglés <i>Protein Purified Derivative</i>)
rAgs:	Antígenos recombinantes
RD:	Región deleteada
RNLTB:	Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis
rpm	Revoluciones por minuto
SDS:	Dodecil Sulfato de sodio
SIDA:	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SSI:	<i>Statens Serum Institute</i>
Taq:	polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TB:	Tuberculosis
TNF- α:	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UICTER:	Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
UT:	Unidad Tuberculínica
VIH:	Virus de inmunodeficiencia humana
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa

LISTA DE FIGURAS

Figura I-1	Tasa de incidencia de TB estimada por país, 2009.	4
Figura I-2	Notificación por provincia: TB de todas las formas.	5
Figura I-3	Diferentes resultados de la infección por <i>M.tuberculosis</i> .	8
Figura I-4	Pruebas diagnósticas <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i> .	13
Figura I-5	Medida de la induración de la PCT.	16
Figura I-6	Esquema de evolución propuesto para <i>M.tuberculosis</i> .	22
Figura I-7	Genealogía parcial de subcepas de BCG.	23
Figura III-1	Secuencia nucleotídica del gen Rv 1886c obtenida del Tuberculist.	27
Figura III-2	Secuencia aminoacídica del gen Rv1886c.	28
Figura III-3	Gráficos arrojados por el Programa Signal P para la predicción del péptido señal.	29
Figura III-4	Vector plasmídico de clonado pGEM-T Easy Vector.	31
Figura IV-1	Mapa del vector de expresión pRSET A.	41
Figura IV-2	Estrategia de clonado en pGEMT y subclonado en pRSET A.	42
Figura IV-3	Gen Rv 1886c (Ag 85B) de 858 pb amplificado por PCR.	43
Figura IV-4	Digestión de ADN plasmídico (pGEM-T) con <i>Eco</i> RI.	44
Figura IV-5	Digestión de ADN plasmídico (pRSET A) con <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III.	45
Figura IV-6	Evaluación de la expresión de la proteína recombinante.	46
Figura IV-7	Western blot revelado con suero policlonal anti Histidina.	46
Figura IV-8	Western blot revelado con suero policlonal anti 85B.	46
Figura IV-9	Puesta a punto de las condiciones de inducción de la proteína recombinante.	47
Figura IV-10	Purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad con quelatos metálicos níquel- ácido nitrilotriacético	48
Figura IV-11	Potencia relativa de PPD 1-94 frente al PPD RT-23.	49
Figura IV-12	Corrida en gel de poliacrilamida de 12 % de los rAgs.	50

Figura IV-13 Medida de la reacción cutánea 24 hs después de la inyección i.d de 0,02 µg de PPD 1-94, PPD de BCG y PPD de <i>M.avium</i> en 3 grupos de animales.	51
Figura IV-14 Medidas de los diámetros de los halos producidos por 1 µg de rAgs y 0,03 µg de PPD.	52
Figura IV-15 Representación del diámetro promedio ± su DS de 1 µg de rAgs y 0,03 µg de PPD.	53
Figura IV-16 Respuesta de dosis crecientes de mezcla de rAgs. comparada con dosis crecientes de PPD 1-94 en cobayos sensibilizados con <i>M.tuberculosis</i> .	54
Figura IV-17 Respuesta cutánea de dosis crecientes de mezcla de rAgs comparada con dosis crecientes de PPD 1-94 en grupo de 6 animales sensibilizados con BCG.	55
Figura IV-18 Respuesta de dosis crecientes de mezcla de rAgs. comparada con dosis crecientes de PPD 1-94 en grupo de 6 animales sensibilizados con <i>M.avium</i> .	56

LISTA DE TABLAS

Tabla III-1	Ensayo de potencia relativa del PPD 1-94 frente al PPD RT-23:diseño de cuadrado latino.	39
Tabla III-2	Ensayo de comparación de reactividad de cada rAgs frente al PPD 1-94: diseño de cuadrado latino.	39
Tabla IV-1	rAgs utilizados en el ensayo y su masa molecular.	50
Tabla IV-2	Respuesta de DTH de distintas tuberculinas desafiadas en los 3 grupos de animales.	51
Tabla IV-3	Medias \pm sus D.S del diámetro de halo producido por 1 μ g de los rAgs y 0,03 μ g de PPD 1-94 en los 3 grupos de animales.	52
Tabla IV-4	Medida de los halos en mm de las dosis baja, media y alta (1,2 y 3 respectivamente) de PPD 1-94 y mezcla de rAgs ensayada en cobayos previamente sensibilizados con <i>M.tuberculosis</i> .	54
Tabla IV-5	Medida de los halos en mm de las dosis baja, media y alta (1,2 y 3 respectivamente) de PPD 1-94 y mezcla de rAgs ensayada en cobayos previamente sensibilizados con BCG.	55
Tabla IV-6	Medida de los halos en mm de las dosis baja, media y alta (1,2 y 3 respectivamente) de PPD 1-94 y mezcla de rAgs ensayada en cobayos previamente sensibilizados con <i>M.avium</i> .	56

La tuberculosis (TB) es una enfermedad pulmonar o generalizada causada por micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*), siendo el *M.tuberculosis* el agente más común en humanos. Es una de las enfermedades más antiguas que afecta al hombre y hoy en día continúa siendo una de las que causa más morbi-mortalidad en el mundo. Es por esto que un diagnóstico rápido, accesible y confiable es una de las prioridades en la lucha contra la TB.

La “antigua” o “vieja” Tuberculina (OT, del nombre en inglés *Old Tuberculin*), introducida por Koch (un filtrado del caldo de cultivo de *M.tuberculosis*) y posteriormente el Derivado Proteico Purificado (Tuberculina mejorada por Florence Seibert), fueron utilizados por muchos años en pruebas cutáneas como herramienta diagnóstica. En la actualidad, como alternativa a esta prueba, se han aprobado pruebas *ex vivo* basadas en el principio de que células T de individuos sensibilizados con antígenos de *M.tuberculosis* producen interferón gamma (IFN- γ) cuando se reencuentran con esos antígenos. Estas pruebas serían más sensibles y específicas que la Prueba cutánea a la Tuberculina (PCT). Sin embargo su costo elevado limita su uso, especialmente en países en desarrollo como el nuestro.

El Derivado Proteico Purificado (PPD, del término en inglés *Purified Protein Derivative*) es una mezcla compleja, pobremente definida, de compuestos secretados y somáticos que incluyen principalmente proteínas, y en menor proporción lípidos, glucolípidos y ácidos nucleicos, obtenidos por filtración de cultivos de cepas de *M.tuberculosis* y posterior precipitación con ácido tricloroacético o sulfato de amonio. Produce hipersensibilidad tardía cuando se lo administra por vía intradérmica al hombre y animales de laboratorio previamente sensibilizados con bacilos tuberculosos.

La PCT tiene baja especificidad diagnóstica ya que el PPD contiene antígenos comunes a otras micobacterias patógenas pertenecientes al complejo *M.tuberculosis*, micobacterias no tuberculosas ambientales y la cepa vacunal *M.bovis* BCG (Bacilo Calmette-Guérin).

Debido a las limitaciones del PPD es necesario el desarrollo de nuevos reactivos específicos para el diagnóstico de tuberculosis.

En el presente estudio se comparó la hipersensibilidad tardía producida en un modelo animal de experimentación (Cobayos cepa Short hair) por los antígenos recombinantes (rAgs) **ESAT-6**, **CFP-10**, **Ag 85B** y **MPT64**, de *M.tuberculosis*, frente a la producida por la tuberculina PPD 1-94 usada en la producción nacional.

Los genes que codifican los antígenos fueron amplificados por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) usando como templado ADN genómico de *M.tuberculosis*. Los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM-T, introducido en *E. coli* y luego subclonados en el vector de expresión pRSET A e introducidos en *E.coli*. Las proteínas recombinantes se purificaron por columnas de níquel-agarosa.

Se sensibilizaron tres grupos de cobayos con *M.tuberculosis*, *M.avium* y BCG Pasteur 1173 P2 respectivamente. Se realizó un ensayo cutáneo con los rAgs: ESAT-6 CFP-10, MPT64 y Ag 85B y el PPD 1-94 en cada una de los grupos de animales previamente definidos.

PPD presentó medida de reacciones cutáneas (induración) similares en los 3 grupos de animales (medida del halo de reacción mayor o igual a 5 mm).

Los cuatro rAgs produjeron respuesta de hipersensibilidad tardía de similar intensidad en el grupo de cobayos sensibilizados con *M.tuberculosis*, no así en los grupos sensibilizados con *M.avium* y *M.bovis* BCG. Mientras ESAT-6, CFP-10 y MPT64 produjeron halos inferiores a 5 mm, el Ag 85B respondió de manera similar al PPD en esos 2 grupos de animales. ESAT-6, CFP-10 y MPT64 serían específicos para *M.tuberculosis*.

La respuesta producida por 3 concentraciones de una mezcla de ESAT-6, CFP-10 y MPT64 se comparó con la producida por 3 concentraciones del PPD 1-94 en los mismos grupos de animales. La mezcla de antígenos recombinantes se comportó de manera similar al PPD en el grupo de cobayos sensibilizados con *M.tuberculosis*, observándose un aumento de respuesta con el aumento de la dosis. Esto no fue observado para la mezcla de rAgs en los grupos sensibilizados con BCG y *M. avium*.

ESAT-6, CFP-10 y MPT64 podrían ser candidatos para la producción de una tuberculina más específica que permita la diferenciación de individuos

infectados con *M.tuberculosis* de individuos infectados con otras micobacterias o vacunados con BCG. El uso de antígenos recombinantes permitiría también estandarizar la producción y el control de calidad de los reactivos usados para los test cutáneos.

TUBERCULOSIS:

1-AGENTE ETIOLÓGICO

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa, cuyo agente etiológico principal es *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*) o bacilo de Koch.

M. tuberculosis es un bacilo aerobio estricto, sin movilidad, no forma esporas, no produce toxinas y no tiene cápsula. Es un microorganismo de crecimiento lento, con un tiempo de replicación de aproximadamente 20 horas. A esto se atribuye la naturaleza crónica de la infección y enfermedad, dificultando el diagnóstico microbiológico y la necesidad de un largo tratamiento con drogas antituberculosas (Kaufmann 2001).

Se inactiva con rayos ultravioletas y temperaturas mayores a 60 °C.

Posee una pared celular rica en lípidos y glicolípidos, entre los que se destacan los ácidos micólicos, que le confieren la característica resistencia de decoloración con alcohol-ácido después de la tinción con fucsina básica (Glickman et al. 2001). Aproximadamente 250 genes dentro del genoma de *M. tuberculosis* están involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos. (Kaufmann 2001). Además esta pared robusta contribuye significativamente a la capacidad de *M.tuberculosis* de sobrevivir en los fagocitos y resistir contra la defensa del huésped (Kaufmann et al. 2005a).

M.tuberculosis es uno de los miembros del **Complejo *Mycobacterium tuberculosis*** (Malaga et al. 2008), el cual incluye 6 especies estrechamente relacionadas: *M.bovis* (incluyendo *bovis* BCG Bacilo Calmette-Guérin), *M.africanum* y *M.microti* y los recientemente incluidos *M.canettii*, *M.caprae* y *M.pinnipedii* (Ahmad 2011).

Por extensión se aplica también el nombre de TB a la enfermedad causada por todas otras especies del complejo *M.tuberculosis* aunque presenten diferencias fenotípicas e involucren distintos hospedadores (Gutierrez et al. 2005).

M.bovis, afecta principalmente al ganado bovino y es transmitida al hombre a través de la leche del animal infectado, *M.africanum* causa enfermedad en la población del Africa Occidental y *M.microti* en roedores y casos aislados en el hombre (Caminero 2007).

El bacilo BCG (*M.bovis* atenuado) puede ocasionar raramente una enfermedad clínicamente indistinguible de la TB en huéspedes severamente inmunocomprometidos (Consenso.Sociedad.Argentina.de.Pediatría 2002).

2-EPIDEMIOLOGIA

La TB fue responsable de millones de muertes humanas en el pasado, cuando no existían métodos de tratamiento adecuados para los pacientes enfermos. Con el advenimiento de la quimioterapia y las medidas profilácticas se produjo una drástica reducción de la mortalidad, la cual fue mantenida por varias décadas (Gay Ducati et al. 2006) . Sin embargo en este nuevo milenio continúa siendo la enfermedad infectocontagiosa crónica más importante que existe en el mundo causada por un único germen (WHO 2010).

La reemergencia de la TB en ciertos escenarios es básicamente la consecuencia de una suma de factores, tales como:

- la pandemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en los comienzos de la década del `80,
- la aparición de cepas de *M.tuberculosis* multirresistentes a drogas,
- cambios en la estructura social (como la desigualdad en la distribución de la riqueza),
- el incremento de inmigrantes de países con alta prevalencia de esta enfermedad a países desarrollados,
- la transmisión en ambientes de grandes conglomeraciones de individuos (tales como prisiones, hospitales) y
- la degradación de los sistemas de cuidados de salud.

(Zúñiga Ramos et al. 2000; Caminero 2003; Gay Ducati et al. 2006; Caminero 2007; García 2009).

La variación en la eficacia de la única vacuna aprobada contra la TB para uso humano hasta la actualidad (BCG) (Colditz et al. 1994) y las limitaciones

propias de los métodos de diagnóstico clásicos: estudios bacteriológicos, prueba tuberculínica y más recientemente los métodos moleculares (García 2009) y las deficiencias en la administración de tratamientos contribuyen también a que esta enfermedad continúe azotando a la humanidad.

Esta situación llevó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a declarar en 1993 a la TB como una emergencia de salud a nivel mundial, recomendando que se intensificaran los esfuerzos para tratar de implementar una estrategia de lucha antituberculosa común (Ellner 1997; Gay Ducati et al. 2006).

Actualmente, la TB es responsable de más muertes humanas que cualquier otro agente infeccioso simple. De acuerdo a la OMS, TB mata más gente que la malaria y el SIDA juntos (Gay Ducati et al. 2006).

La proporción de la población que se infecta anualmente constituye la incidencia de infección o riesgo anual de infección TB y se puede calcular por pruebas tuberculínicas en una población infantil (de Kantor et al. 2009).

Los epidemiólogos estiman que aproximadamente 2 billones de personas, un tercio de la población mundial, está infectada con *M.tuberculosis* en forma latente (WHO 2010). Los individuos infectados latentemente tienen un riesgo del 10 % de desarrollar la enfermedad durante toda su vida, y este enorme reservorio global de infección y enfermedad sirven como una continua fuente de transmisión.

Los últimos datos de vigilancia epidemiológica de la OMS informaron que alrededor de 9,4 millones de nuevos casos y 1,7 millones de muertes (4700 muertes por día) ocurrieron en el 2009 en todo el mundo por esta enfermedad, a pesar de los esfuerzos invertidos para el control de la misma en la última década (WHO 2010).

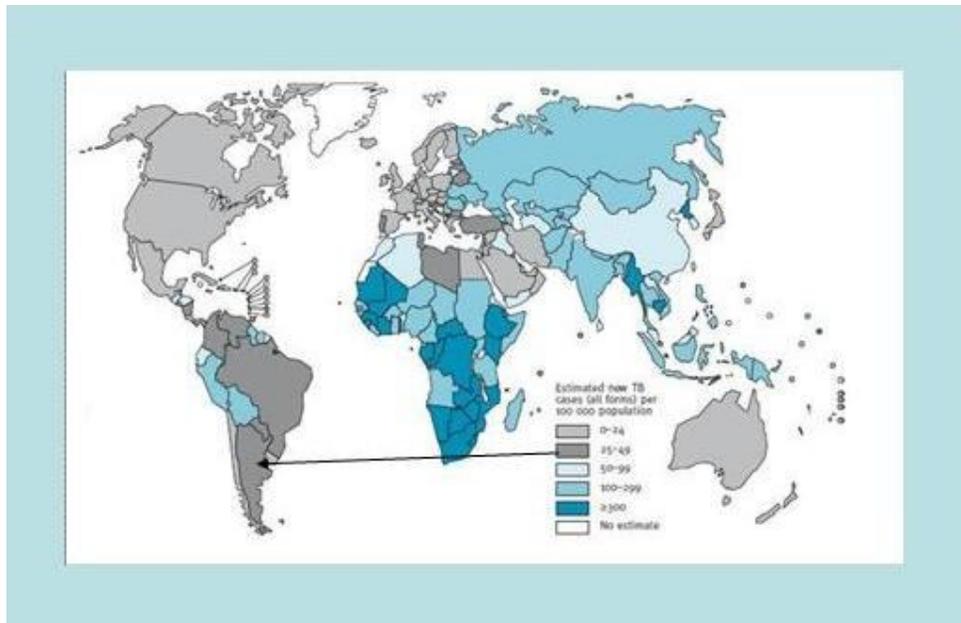


Figura I-1- Tasa de incidencia de TB estimada por país, 2009 (WHO 2010)

Las tasas de incidencia están bajando a nivel mundial, excepto en la región del Sur de Asia Sudoriental y Africa Sub-Sahara donde se mantienen estables (Figura I-1).

Las tasas de mortalidad a nivel mundial disminuyeron un 35 % desde 1990 al 2009, y si continúan disminuyendo a este ritmo el objetivo del milenio de una reducción del 50% para el año 2015 podría lograrse. La prevalencia también está disminuyendo a nivel mundial, pero el objetivo de reducir a la mitad la tasa de prevalencia de 1990 para el año 2015 parece estar fuera del alcance a nivel global, aunque puede lograrse en la Región de las Américas, del Mediterráneo Oriental y del Pacífico Occidental (WHO 2010).

En nuestro país, la TB es un problema de salud pública importante. El Programa Nacional de Tuberculosis del Ministerio de Salud de la Nación conduce actividades de control de esta enfermedad. La enfermedad es de notificación obligatoria lo que permite caracterizar la situación epidemiológica. La meta es conseguir una tasa de curación superior al 85 % de los enfermos diagnosticados con baciloscopía positiva, y una tasa de abandono inferior al 6 %.

En el 2009 se notificaron alrededor de 10.657 casos nuevos de todas las formas de TB en todo el país (26,6 casos/100.000 habitantes), siendo el 84,9 % TB pulmonar y 13,5% TB extrapulmonar. Durante ese año el 70 % de los casos notificados en el país tenía entre 20 y 64 años, con tasas mayores en varones que mujeres.

La notificación de los casos de TB también fue diferente en las 24 jurisdicciones del país (Figura I-2), la tasa de notificación más alta del país en el 2009 fue en Salta (61,5 por 100.000) y la más baja en la provincia de La Rioja (6,0 por 100.000) (Ministerio.de.Salud 2010).

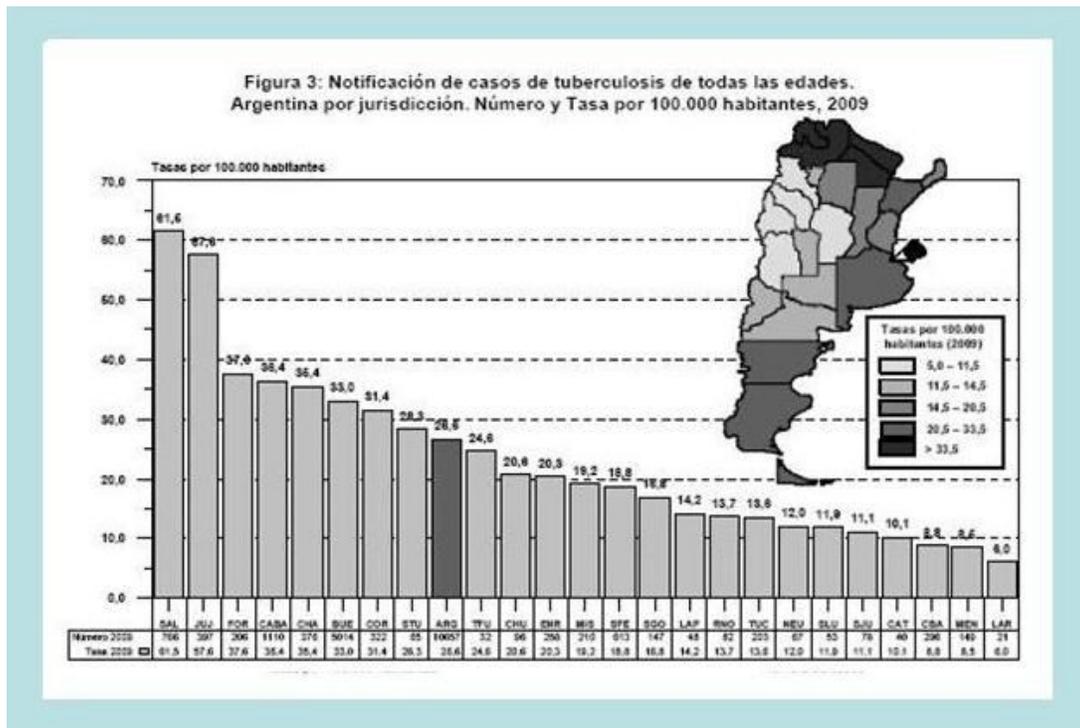


Figura I-2- Notificación por provincia: TB de todas las formas. Número de casos y tasas por 100.000 habitantes.(Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Emilio Coni”, con base en los datos de los Programas del Control de la Tuberculosis de las 24 jurisdicciones del país. Ministerio de Salud. Argentina. Noviembre de 2010).

Desde el año 2004 en nuestro país mueren aproximadamente 800 personas al año a causa de esta enfermedad. Sin embargo la tasa del 2007 llegó a ser la más baja desde 1980, con 2,02 muertes/100.000 habitantes (Ministerio.de.Salud 2010).

3-HISTORIA NATURAL

El bacilo *M.tuberculosis* habitualmente ingresa a los pulmones a través de la inhalación y puede propagarse desde su localización inicial a otras partes del organismo mediante el flujo sanguíneo, el sistema linfático, las vías aéreas o por extensión directa a otros órganos. Así la TB puede clasificarse en pulmonar y extrapulmonar, siendo la pulmonar la forma más frecuente.

El mecanismo de transmisión más importante es la vía aerógena, causando la casi totalidad de los contagios (Caminero 2003). El hombre enfermo, al hablar, estornudar, y sobre todo al toser, elimina microgotas, en forma de aerosoles, cargadas de micobacterias que pueden ser inhaladas por un sujeto próximo. La infección es más probable con la exposición sostenida a un foco bacilífero. Las microgotas, que contienen de 1 a 5 bacilos, pueden llegar y depositarse en la región alveolar. La zona de establecimiento preferente es la región subpleural del lóbulo anterior, la más ventilada del pulmón.

Cuando *M.tuberculosis* llega al alvéolo de un huésped inmunocompetente, los macrófagos alveolares, las células *natural killer* (NK) y los neutrófilos neutralizan y destruyen generalmente a los bacilos. Los sujetos expuestos que desarrollaron este proceso limitado conforman la población que en la práctica es indistinguible de la no expuesta (Caminero 2007).

Pero cuando el microorganismo es capaz de ocultarse dentro del endosoma del macrófago con éxito, usando varios mecanismos para defenderse del sistema inmune del hospedador (cambio de pH, inhibición de superóxidos tóxicos y la apoptosis), comienzan a reproducirse en forma logarítmica hasta que el macrófago estalla dejando en libertad a toda la progenie bacilar. Entonces otros macrófagos son atraídos, fagocitan a los bacilos, y así continúa el proceso (Kaufmann 2001).

Los macrófagos alveolares infectados y también las células dendríticas infectadas pueden no destruir al bacilo, más aún pueden servirle de hábitat, transportando al bacilo hacia el parénquima pulmonar y eventualmente al drenaje de los nódulos linfáticos adyacentes. Allí es donde las células dendríticas presentan a los antígenos micobacterianos en el marco de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad activando a las distintas poblaciones de células T. En este estadio temprano de la infección, ciertas proteínas secretadas por *M.tuberculosis* tales como el antígeno de secreción temprano para células T (ESAT-6) y el antígeno 85 (Ag 85) servirían como

antígenos dominantes para estimular linfocitos T (LT) CD4+. Los LT CD4+ inician una respuesta inmune Th1 y migran hacia el foco infeccioso en el pulmón (Kaufmann et al. 2005a). Esto ocurre aproximadamente a las 3 semanas post infección, y en un individuo inmunocompetente se desarrolla una respuesta inmune mediada por células contra el bacilo. Estos LT rodean y activan a los macrófagos incrementando su habilidad para destruir a las micobacterias que han ingerido. Esta respuesta inmune va acompañada por la aparición de la hipersensibilidad tardía (DTH, del inglés *Delayed-type Hypersensitivity*) o “tuberculínica”. Si la respuesta inmune es eficaz, los macrófagos activados continuarán fagocitando y destruyendo los bacilos en la lesión inicial y la infección quedará circunscripta (TB primaria) (Flynn et al. 2001).

Cuando la respuesta del organismo no es suficiente, la proliferación bacilar puede continuar. El Interferón gamma (IFN- γ), en sinergia con el Factor de necrosis tumoral (TNF- α), activan los macrófagos y también favorecen el aislamiento del *M. tuberculosis* dentro del granuloma. En un estadio más tardío de la infección también son estimulados los LT CD8+ que rodearán la parte más externa del granuloma (Kaufmann et al. 2005a). También LT $\gamma\delta$ y células T $\alpha\beta$ CD1, forman parte de la respuesta inmune (Collins et al. 2001; Flynn et al. 2001; Kaufmann et al. 2005a).

En un estadio posterior, el granuloma es rodeado de una pared fibrótica y estructuras foliculares linfoides. De esta manera, puede persistir por décadas y contener la infección tuberculosa en un estado adormecido (TB latente) por privación de oxígeno y nutrientes a la micobacteria, tanto tiempo como el individuo permanezca inmunocompetente (Boon et al. 2002; Chan et al. 2004).

La TB latente también puede ser reconocida por la reacción DTH producida por la prueba cutánea a la tuberculina (PCT) y, si la necrosis lesional fue suficientemente intensa, puede quedar una calcificación radiológicamente visible. No se considera a estos individuos como tuberculosos aunque raramente la reinfección puede ocurrir (Kaufmann 2001).

Si el balance entre las defensas del huésped y la persistencia de la micobacteria se inclina en favor del patógeno, la activación de la enfermedad ocurre (Kaufmann 2004).

En resumen, la infección por *M.tuberculosis* puede resultar en una infección asintomática (TB latente), en TB pulmonar progresiva, en TB extrapulmonar hasta la enfermedad grave que puede originar la muerte (Zúñiga Ramos et al. 2000).

Solo una minoría de las personas infectadas con *M.tuberculosis* es capaz de progresar a enfermedad clínica. En términos generales el 90 % de las personas infectadas tendrán controlados los bacilos en estado latente toda la vida, por medio de sus defensas inmunes. Un 5 % presentará TB primaria progresiva y otro 5 % presentará la enfermedad en estados tardíos de la vida, lo que se denomina TB de reactivación o post-primaria (Caminero 2003) (Figura I-3).

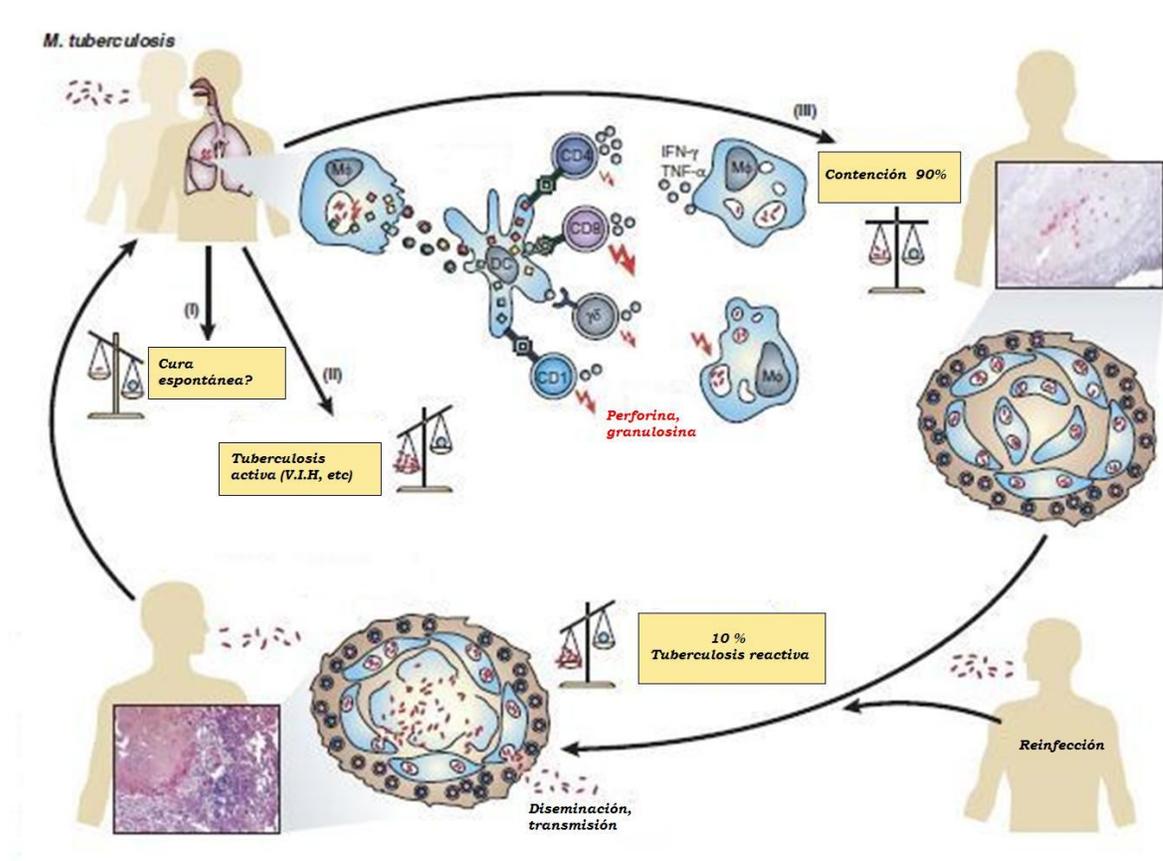


Figura I-3-Diferentes resultados de la infección por *M.tuberculosis*: entra al huésped por inhalación dentro de microgotas. Tres resultados son los posibles: I) Erradicación inmediata de *M.tuberculosis* por el sistema inmune innato. II) La infección se transforma en enfermedad (TB activa), III). *M.tuberculosis* sobrevive dentro de los macrófagos y es contenido dentro de los granulomas (TB latente) toda la vida (90 % de los casos), o sucede una reinfección o activación (TB reactiva o post primaria, 10 % de los casos). Adaptado de Kaufmann et al. Nat. Med. 2005; (4 Suppl):S33-44.

4-RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune contra la infección por *M.tuberculosis* es multifacética y compleja, y dependería del balance entre la inmunidad innata y la adaptativa. El control de la infección estaría determinado por la interacción entre los macrófagos infectados y los linfocitos T (LT) (Tufariello et al. 2003).

La respuesta inmune es iniciada cuando las micobacterias llegan al espacio alveolar donde se encuentran con los macrófagos. El surfactante A producido por las células epiteliales alveolares, aumenta la interacción.

M.tuberculosis induciría su propia fagocitosis utilizando diferentes receptores del macrófago para adherirse y ser fagocitado.

La unión ligando–receptor puede tener consecuencia disímiles, pues actúa tanto activando la función efectora del macrófago como asegurando la supervivencia de la bacteria dentro del mismo (van Crevel et al. 2002).

Algunos componentes conservados de las micobacterias (PAMPs) pueden interactuar con los receptores tipo Toll e inducir la producción de citoquinas proinflamatorias que actúan como indicadores o señales de infección (IL-1 y TNF- α). Estas moléculas proinflamatorias, producidas también por células epiteliales y endoteliales, estimulan y reclutan hacia el sitio de infección diferentes efectores de la respuesta inmune innata (neutrófilos, células NK, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B) (Rivas-Santiago et al. 2005).

La IL12 y la IL18, producidas por macrófagos y células dendríticas (CD), son activadores de la respuesta Th1, ya que inducen a las células NK y LT CD 4+ a producir IFN- γ ; y a éstos últimos también a producir IL2. Estas citoquinas activan y reclutan más macrófagos al sistema (Flynn et al. 2001).

Algunas citoquinas como la IL8 atraen los neutrófilos, los cuales pueden fagocitar las bacterias sin la capacidad de eliminarla, evitando la diseminación de la misma.

Los macrófagos y las CD además de actuar como células efectoras, son células presentadoras de antígenos; migran a los nódulos linfáticos donde ocurre la presentación de los antígenos de la micobacteria a las diferentes poblaciones de linfocitos (García et al. 2004).

Las células T $\alpha\beta$ CD 4+ y CD8+ reconocen a los antígenos micobacterianos en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y clase I respectivamente (Smith et al. 2000; Lewinsohn et al. 2006).

Las células T $\alpha\beta$ CD4- CD8- reconocen los glicolípidos presentados por moléculas CD1 (Porcelli 1999) y los LT $\gamma\delta$ reconocerían pequeños antígenos fosforilados (Kaufmann et al. 2005a).

Las células NK y los LT CD 8+ citotóxicos comparten enzimas como granulosa, granzimas y perforinas que al ser liberadas pueden inducir la lisis tanto de células blanco como de *M.tuberculosis*.

M.tuberculosis, al igual que otras bacterias patógenas intracelulares facultativas, provocan en el huésped principalmente una respuesta inmune mediada por células (Mackaness 1964), por lo que se cree que los anticuerpos juegan un rol menor en la protección contra el bacilo (Johnson et al. 1997). En vacunos la IgG 1 anti *M.bovis* se correlaciona con un aumento de la patología (Welsh et al. 2005). Sin embargo, Glatman-Freedman, sugiere que una elevada respuesta serológica anti-polisacáridos tales como la lipoarabinomanoza (LAM) puede ser protectora contra la TB en niños (Glatman-Freedman 2006).

Los diferentes tipos de linfocitos activados inician la respuesta adaptativa específica, migrando a la circulación (la cual se manifiesta por la prueba tuberculínica), y retornan al sitio de infección en el parénquima pulmonar para contener la infección formando parte del granuloma (García et al. 2004).

El granuloma, marcador histopatológico de TB, incluye también células B, endoteliales, fibroblastos y probablemente también células del estroma, la proporción de los diferentes tipos celulares difiere con el tiempo de formación del mismo. El granuloma puede prevenir la diseminación de la bacteria sirviendo de barrera entre ésta y el resto del pulmón, y también funcionar como un microclima inmunológico donde se facilita la interacción entre macrófago, células T y citoquinas. Puede actuar también como un reservorio de las micobacterias por un largo período de tiempo. Si las bacterias se multiplican en forma excesiva, se produce una pérdida de la estructura del granuloma, necrosis y formación de cavidades. Por el contrario, si un número limitado de micobacterias sobrevive nos enfrentamos a lo que se conoce como TB latente (Tufariello et al. 2003).

5-DIAGNÓSTICO

La prioridad de los Programas de Control, en países con alta incidencia, es el diagnóstico temprano y el tratamiento apropiado de los casos de TB pulmonar bacilífera para cortar así la cadena de transmisión de esta enfermedad (Dominguez et al. 2006; de Kantor et al. 2009).

La TB pulmonar puede ser diagnosticada por sus síntomas, por radiografía de tórax, y otros parámetros clínicos, y puede ser confirmado por estudios microbiológicos. La microscopía directa de esputo es rápida y barata, pero tiene una sensibilidad de solo 50-60%. El cultivo de *M.tuberculosis* es el método diagnóstico de referencia, aunque requiere entre 6 a 8 semanas en medios convencionales y 3 a 4 semanas en medios líquidos con equipos de lectura automatizada. Además en un 10-20 % de los casos diagnosticados el bacilo no puede ser aislado (Andersen et al. 2000; Simsek et al. 2010).

M.tuberculosis produce una fuerte respuesta inmune tras la infección por la estimulación de LT CD4+ y LT CD8+, como también de otras células del sistema inmune, determinando una respuesta de tipo 1 (Th1) dominada por interferón gamma (IFN γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Amicosante et al. 2010). La respuesta inmune llamada DTH ha sido usada por más de 100 años para identificar sujetos infectados con *M. tuberculosis* por el uso de la PCT. Cuando los antígenos micobacterianos denominados “tuberculinas” son inoculados por vía intradérmica, los linfocitos T sensibilizados por la infección previa con *M.tuberculosis* son atraídos al área de inyección y sintetizan citoquinas que causan vasodilatación, edema, induración y migración adicional de células inflamatorias (monocitos y macrófagos) al sitio (de Kantor et al. 2009).

Hoy en día la detección de TB latente aún está basada en la PCT (Simsek et al. 2010) y el tipo de tuberculina que se utiliza es el Derivado Proteico Purificado (PPD del nombre en inglés *Purified Protein Derivative*) (Figura I-4).

El PPD contiene proteínas que son comunes a los integrantes del complejo *M.tuberculosis*, entre ellos a BCG utilizado en la vacuna homónima, y a algunas micobacterias ambientales, lo que le resta especificidad a la PCT (Gonzalez-Martin et al. 2010).

Con el fin de mejorar el diagnóstico se han desarrollado y aprobado nuevos métodos diagnósticos basados en la cuantificación *ex vivo* de la respuesta inmune celular. Estos métodos denominados genéricamente con el acrónimo IGRAs (del inglés *Interferon Gamma Release Assays*) se basan en el principio que las células T de individuos sensibilizados producen IFN- γ cuando ellas se reencuentran con los antígenos de *M.tuberculosis* (Tufariello et al. 2003) (Figura I-4).

Actualmente existen versiones comerciales como el quantiFERON-TB (Cellestis, Victoria, Australia) y el T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, Inglaterra). La primera generación de quantiFERON-TB, aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) en el año 2001, medía la liberación de IFN- γ en respuesta al PPD. En el año 2004, la FDA aprobó la segunda generación de este test diagnóstico denominado quantiFERON-TB Gold, que a diferencia de la primera generación, no utiliza como antígenos micobacterianos al PPD, sino antígenos más específicos como son ESAT-6 y “Culture Filtrate Protein”-10 (CFP-10). Estos antígenos son codificados por genes localizados en la región RD-1 del genoma de *M.tuberculosis*. Estas proteínas están presentes en todas las especies patógenas del complejo *M.tuberculosis* excepto en BCG y en la mayoría de las micobacterias ambientales, por lo tanto no habría reacción en individuos vacunados o sensibilizados con micobacterias no patógenas.

Recientemente la FDA ha aprobado la tercera generación de este test, denominada quantiFERON–Gold in Tube (QFT-IT), que incorpora un tercer antígeno micobacteriano: el TB 7.7 (Connell et al. 2008; Miranda et al. 2010).

El T-SPOT.TB, a diferencia del quantiFERON, utiliza sangre entera y mide la cantidad de células productoras de IFN- γ (Kobashi et al. 2010; Miranda et al. 2010).

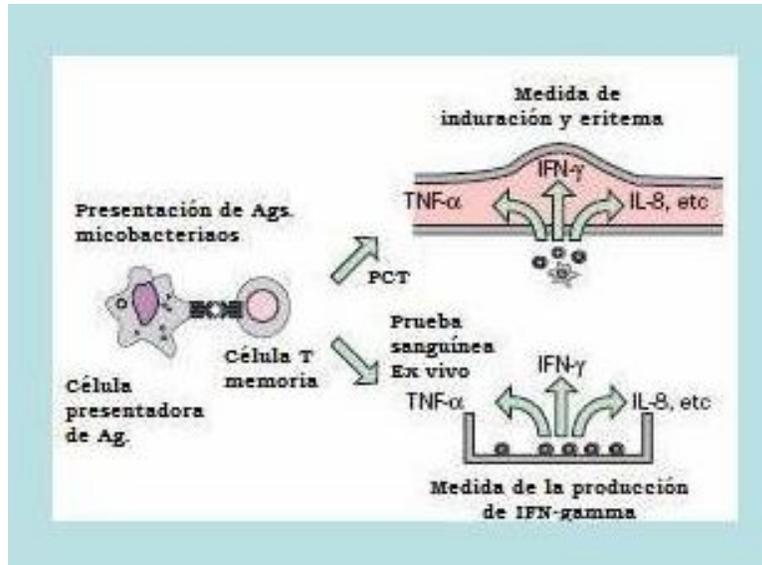


Figura I-4: Pruebas diagnósticas *in vivo* y *ex vivo*. Ambas, *in vivo* (PCT) y *ex vivo* (pruebas con sangre) dependen de la liberación de citoquinas inflamatorias de las células T previamente sensibilizadas con antígenos micobacterianos. En la PCT los antígenos son inoculados intradérmicamente, causando la infiltración de linfocitos específicos a esos antígenos y la elaboración de citoquinas inflamatorias. La reacción inflamatoria resulta en la induración característica en el sitio de inyección. En la prueba con sangre, las células mononucleares de sangre periférica son estimuladas *in vitro* y la producción de IFN- γ de las células T sensibilizadas es medido mediante un ELISA.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α ; IL8: Interleuquina 8.

Adaptado de Andersen P. et al. The Lancet 2000 (356); 1099-1104

6-PRUEBA CUTANEA DE LA TUBERCULINA (PCT)

6-1 HISTORIA

La historia de la tuberculina se remonta al 4 de agosto de 1890, cuando Robert Koch, en el 10º congreso internacional de Medicina realizado en Berlín, anunciaba el descubrimiento de un agente curativo contra la tuberculosis. El describía este “agente” como “un fluido traslúcido amarronado” que no sólo era capaz de detener el crecimiento bacilar en el tubo de ensayo, sino también en el animal enfermo (Sakula 1982; Gradmann 2001; Cardona 2006). La inoculación de cultivos de *M.tuberculosis* muerto no provocaba reacción en cobayos sanos, pero sí pequeñas dosis evidenciaban una reacción inflamatoria destructiva en el sitio de inyección mientras que dosis más altas podían matar los animales (Vilaplana et al. 2010).

Tres meses más tarde Koch publicaba sus hallazgos en *The Lancet* (Editorial. The nature of Dr. Koch's liquid. *Lancet* 1890;2:1233) donde él afirmaba que el fluido tenía un efecto sanador específico sobre el proceso tuberculoso de todas las clases en humanos (Kaufmann 2005).

Este producto, conocido como "Tuberculina de Koch" fue luego administrado a pacientes con TB, y Koch afirmaba que este tratamiento resultaba en la cura de la enfermedad ya establecida (Gradmann 2001; Kaufmann et al. 2005b).

El tratamiento de Koch consistía en inocular el fluido vía subcutánea, en dosis que aumentaban diariamente. Se creía que el fluido promovía la curación a través de su acción específica sobre "el tejido tuberculoso vivo" en el cual el bacilo estaba inmerso, pero no sobre el bacilo tuberculoso en sí. Hasta entonces Koch mantenía en secreto la naturaleza del fluido (Mazana 2009; Vilaplana et al. 2010).

Recién a principios de 1891 reveló que el fluido era un filtrado del caldo de cultivo del bacilo tuberculoso al cual le dio el nombre de tuberculina (Kaufmann et al. 2005b; Cardona 2006).

El escepticismo de algunos científicos tales como Billroth, Virchow y Sir Arthur Doyle fue rápidamente confirmado, la tuberculina no tenía propiedades curativas ni protectivas (Huebner et al. 1993). Pero no en vano Koch obtuvo la tuberculina, ya que a pesar de su falla como sustancia terapéutica, rápidamente llegó a ser importante para el diagnóstico (Caminero 2003).

Varios investigadores vieron en la tuberculina una potencial prueba de diagnóstico. Basándose en las reacciones observadas en los pacientes que habían sido tratados en un intento de cura, sugirieron la aplicación local de la misma, a fin de evitar las reacciones sistémicas, y proporcionar un método de determinación de hipersensibilidad retardada a la sustancia. El uso de la tuberculina como agente diagnóstico condujo al desarrollo de nuevos métodos de administración, los cuales eliminaban la reacción generalizada y causaban sólo una reacción localizada en el sitio de inyección (Huebner et al. 1993).

En general los nuevos procedimientos ensayados involucraban la administración de tuberculina dentro de la piel más que dentro de tejidos subcutáneos.

A comienzos del siglo XX, von Pirquet fue el primero en introducir la PCT (Lee et al. 2002). En su técnica, la tuberculina se dejaba caer gota a gota en la piel limpia que posteriormente se raspaba. Él observó que la sensibilidad del test era menor al 100 % en las formas más severas de la TB.

En la misma década, Moro utilizando una técnica sencilla que consistía en frotar por la piel una “crema de tuberculina”, encontró que la sensibilidad era comparable con el método de von Pirquet.

Mendel y Mantoux introdujeron casi simultáneamente (1909-1910) la técnica intradérmica, permitiendo la administración de una dosis exacta de tuberculina con jeringa y aguja (Rieder 1999).

Aunque las tres técnicas han sobrevivido, en formas modificadas, la forma intradérmica es la más utilizada en todo el mundo y es la recomendada oficialmente para uso en los estudios epidemiológicos. A pesar de las dificultades de esta técnica, es más sensible y específica que otros métodos (Lee et al. 2002). La PCT requiere del uso de jeringas calibradas y una aguja para la inyección de 0,1 ml de tuberculina diluida dentro de la capa más superficial de la piel en la cara anterior o posterior del antebrazo (Rieder 1999; Lee et al. 2002; Caminero 2003).

La reacción a la PCT se mide por el diámetro de induración visible y palpable a las 48-72 hs posteriores a la inyección del antígeno (Figura I-5). Clínicamente, la reacción puede comenzar a las pocas horas después de la inyección de la tuberculina con una induración color rosada de la piel seguida de una reacción de DTH, la cual alcanza su pico máximo después de las 48-72hs y que puede persistir por varias semanas (Mack et al. 2009).



Figura I-5– Medida de la induración de la PCT. Reacción positiva, halo superior a 10 mm
Caminero, J. A. (2003). "Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas."
Internacional Union Against Tuberculosis and Lung Disease". París.

6-2 UTILIDAD E INTERPRETACIÓN

La PCT ha sido utilizada en el diagnóstico de la TB por más de 100 años, y en nuestro país constituye una herramienta de utilidad para el Programa Nacional de Control de la tuberculosis. Está indicada para la evaluación de los contactos de los enfermos con tuberculosis bacilífera, como complemento del diagnóstico de la tuberculosis infantil y para seguimiento del personal de salud inicialmente tuberculino negativo que trabaja en áreas de alto riesgo de infección con el bacilo de la tuberculosis.

Se basa en la inyección intradérmica del PPD y mide la inmunidad mediada por células en la forma de respuesta de DTH.

Cuando el PPD penetra en la piel, una parte desaparece vía linfática y el resto permanece en el sitio de inyección; las células dendríticas y de Langerhans presentes en la piel se activan por mecanismos de la inmunidad innata y fagocitan el material antigénico. Esto produce una reacción inflamatoria con participación de células polimorfonucleares y algunas mononucleadas. En individuos no sensibilizados esta reacción inflamatoria desaparece en horas, pero en personas sensibilizadas por la infección micobacteriana previa, esta respuesta se incrementa y aparece una importante infiltración perivascular

linfocitaria atraída por las citoquinas liberadas por los LT circulantes “con memoria” que han reconocido a los antígenos administrados en la dermis (Caminero 2003).

La dosis estandarizada recomendada por la OMS y la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), es 2 Unidades Tuberculínicas (UT) de PPD en 0,1 ml.

Se ha adoptado como límite para considerar a un individuo infectado una prueba tuberculínica con un tamaño igual o mayor a 10 mm. En los individuos VIH (+) este límite es de 5 mm (de Kantor et al. 2009).

Ciertas condiciones biológicas tales como la coexistencia de TB con enfermedades virales (inclusive VIH), ciertas inmunosupresiones provocadas por fármacos, malnutrición o TB diseminada avanzada, suprimirán la respuesta de DTH. Además una mala conservación del PPD, o un error en la aplicación o lectura de la PCT, podrían dar un resultado falso negativo (LoBue et al. 2010).

La PCT pierde sensibilidad y especificidad cuando no puede diferenciar entre la infección con *M.tuberculosis* y la sensibilización con otras micobacterias ambientales. También la vacunación con BCG puede causar falsas reacciones positivas, aunque si no es reciente la medida de la reacción suele ser menor a 10 mm (de Kantor et al. 2009; Ahmad 2011).

6-3-TIPOS DE TUBERCULINAS

EVOLUCIÓN DE LAS TUBERCULINAS

La preparación de la tuberculina original de Koch consistía en un extracto de los residuos de cultivos de *M.tuberculosis*, previamente calentados a 100 °C por varias horas, filtrados y luego concentrados 10 veces por evaporación, en un solvente glicerinado. Este material contenía un gran número de carbohidratos y antígenos proteicos así como antígenos del caldo vacuno usado como medio de cultivo. Durante muchos años las tuberculinas fueron producidas de esta manera sin intentar estandarizarlas (Bass 1993; Bass 2001; Lee et al. 2002).

La antigua o vieja tuberculina (OT, del término en inglés *Old Tuberculin*) fue adaptada rápidamente para la detección de tuberculosis activa y

consecuentemente para detectar infección latente de TB (LTBI: *latent tuberculosis infection*) en la población “aparentemente” sana. Hasta 1932 fueron usadas inyecciones secuenciales de OT, hasta que D`Arcy Hart demostró que una dilución 1:10 de OT era la concentración adecuada para la detección de infección con *M.tuberculosis*.

Fengers y colaboradores encontraron que preparaciones de micobacterias ambientales, aviarias o bovinas, producían reacciones en personas no infectadas, sugiriendo que las reacciones positivas con grandes dosis de OT resultaban de la sensibilización con Micobacterias no tuberculosas (Lee et al. 2002).

Para ese entonces había ya una clara necesidad de una tuberculina más pura, con mayor especificidad.

Florence B. Seibert, en el Instituto Henry Phipps en Filadelfia, determinó que las preparaciones de OT contenían cantidades variables de proteínas y polisacáridos y que las proteínas eran los antígenos relevantes de la PCT.

En 1934, ella desarrolló una técnica de precipitación con sulfato de amonio para aislar proteínas de filtrados de cultivos autoclavados de bacilo tuberculoso. Este nuevo tipo de tuberculina fue denominado Derivado Proteico Purificado (PPD : *Purified Protein Derivative*) (Lee et al. 2002).

A pesar de su denominación, además de proteínas en varios estadios de desnaturalización, el PPD también contiene algunos polisacáridos y ácidos nucleicos (Harboe 1981; Andersen et al. 2000; Bass 2003).

En 1939, Seibert y colaboradores prepararon un gran lote (PPD lote 49608) que llegó a ser el estándar de referencia para los Servicios de Salud Pública de Estados Unidos después de una cuidadosa estandarización (Seibert et al. 1941). En 1944 este lote fue renombrado PPD-S (S por “standard”), y en 1952 El PPD-S fue adoptado como estándar internacional por la OMS (Lee et al. 2002).

La disponibilidad de una gran cantidad de tuberculina purificada cuidadosamente preparada, envasada y estandarizada es un prerrequisito para estudios epidemiológicos de sensibilidad a la tuberculina.

La primera fuente de tal material fue producida en el **Statens Serum Institute** (SSI) en Copenhagen, Dinamarca, cuyas tuberculinas purificadas designadas con las letras RT y un número de lote, han sido ampliamente usadas,

especialmente en estudios subsidiados por la OMS. El lote preparado por Magnusson y Bentzon en 1958 fue suficiente para 33.000 millones de dosis (Magnusson et al. 1958). Designado como RT23, la nueva tuberculina fue ampliamente estandarizada en animales por Guld y colaboradores (1958) y en humanos comparada con otras tuberculinas ampliamente usadas a nivel mundial (Guld et al. 1958).

El PPD RT-23 fue considerado desde entonces referencia de OMS.

A los fines prácticos las dosis de PPD son expresadas en UT. Se define a la UT como una cantidad definida de proteína (0,02 μg tanto para el PPD-S como para el PPD RT-23) que produce una respuesta de DTH en individuos previamente sensibilizados (Huebner et al. 1993).

La dosis óptima del PPD-S fue determinada en Estados Unidos por un estudio con pacientes con alta y baja probabilidad de infección tuberculosa. Así se estableció para este PPD que una dosis de 5 UT mantenía la sensibilidad y la especificidad (Edwards et al. 1960).

Durante los esfuerzos de estandarizar el PPD RT-23 frente al PPD-S, se llegó a la conclusión que era imposible definir dosis que fueran equipotentes en todas las situaciones, dado que la potencia relativa difería con el tipo y nivel de sensibilización de las poblaciones evaluadas (Comstock et al. 1964).

A pesar de estas diferencias, se aceptó que una dosis de 2 UT de PPD RT-23 es aproximadamente equivalente a una dosis de 5 UT de PPD-S y estas son las dosis respectivas que recomienda la OMS y The International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD).

TUBERCULINA USADA EN NUESTRO PAÍS

Durante casi 40 años, el SSI y la OMS suplieron a la comunidad mundial de PPD RT-23, producto de alta y uniforme calidad. Desde inicios de la década de los 80, CEPANZO, y luego el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis, INPPAZ (OPS) recibía periódicamente del SSI ampollas del PPD RT23 liofilizado, referencia de OMS, que era reconstituido a una solución de 1 mg/ml (equivalente a 50 000 UT/ml). Esa solución concentrada se distribuía a los laboratorios de referencia nacionales de los países miembros de OPS, donde se preparaba, a partir de esa solución concentrada, el PPD

2UT, para empleo en pruebas intradérmicas, de acuerdo a instrucciones específicas. CEPANZO, y luego INPPAZ realizaba controles de calidad de referencia a muestras del producto final (PPD 2UT) enviados por los laboratorios nacionales de salud. El periodo de validez, una vez diluido a esa concentración, y correctamente conservado, era de 6 meses. En el año 1993 el SSI suspendió la entrega del PPD RT23 liofilizado a OPS/OMS, y por lo tanto, también de la solución proteica madre, 1 mg/ml, empleada para preparar PPD diluido para pruebas de Mantoux en los Servicios de Salud Pública. Ante esta situación, algunos países optaron por adquirir el PPD 2UT RT23, del SSI, o productos similares de otros orígenes. En Argentina, se estableció un convenio entre el INPPAZ/OPS, el Instituto Nacional de Microbiología (actualmente A.N.L.I.S, Dr. Carlos G. Malbrán) y el Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires (La Plata) para la producción de un lote estándar de tuberculina PPD que pudiera satisfacer por varios años la producción nacional de PPD 2 UT. Esta preparación de tuberculina PPD, constituida por el lote I-94, se llevó a cabo entre fines de 1993 y principios de 1994. La cantidad total producida fue distribuida en partes iguales entre las tres instituciones en frascos ampollas conteniendo 5 ml de tuberculina a una concentración de 2 mg/ml y 140.000 UT/ml.

6-4 ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE *M.tuberculosis* UTILIZADOS EN NUEVOS REACTIVOS

Los antígenos de la tuberculina, derivados de micobacterias, han sido usados ampliamente por médicos e inmunólogos, probablemente más que otras preparaciones antigénicas microbianas. Los extractos de micobacterias contienen muchos antígenos de composición química variada (Daniel et al. 1978). Las proteínas de superficie y las proteínas secretadas activamente por *M.tuberculosis* son importantes blancos para el sistema inmune durante la fase temprana de la infección (Sorensen et al. 1995).

Algunos de estos antígenos son específicos de especie, otros son compartidos entre varias especies y contribuyen comúnmente a la reactividad cruzada observada en las tuberculinas (Daniel et al. 1978; Harboe 1981).

Previo a la identificación del genoma completo de *M.tuberculosis*, varios autores han descrito varios antígenos de *M.tuberculosis* en base su respuesta de DTH (Nagai et al. 1981; Nagai et al. 1991; Young et al. 1992; Haslov et al. 1995; Oettinger et al. 1995; Manca et al. 1997a; Manca et al. 1997b). La mayoría de estos antígenos se encuentran en el filtrado de cultivos de *M.tuberculosis* (Brosch et al. 2002).

La identificación de regiones del genoma de *M.tuberculosis* que están ausentes en BCG y en la mayoría de las micobacterias no tuberculosas dieron una oportunidad para el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico (Brosch et al. 1998).

La secuencia genómica completa del *M.tuberculosis* H37Rv fue comunicada por Cole y col en 1998, señalando que estaba constituida por 4.411.529 de pares de base (pb), con un alto contenido de guanina-citosina (65,6 %) y 3.924 genes que codifican para proteínas (Cole et al. 1998). Más tarde se identificaron 4 errores de secuenciación cambiando el tamaño del genoma a 4.411.532 pb (Camus et al. 2002).

Las micobacterias agrupadas en el complejo *M.tuberculosis* se caracterizan por tener un 99.9% de similitud a nivel nucleotídico, pero difieren ampliamente en su tropismo por el huésped, fenotipos y patogenicidad. Se asume que todas ellas derivan de un ancestro común. Algunas son exclusivamente humanas (*M. tuberculosis.*, *M africanum*, *M canettii*), o patógenas para roedores (*M. microti*), mientras otras tienen un amplio espectro de huéspedes (*M.bovis*) (Brosch et al. 2002).

La figura I-6 esquematiza la vía de evolución propuesta para el complejo *M.tuberculosis* (Brosch et al. 2002).

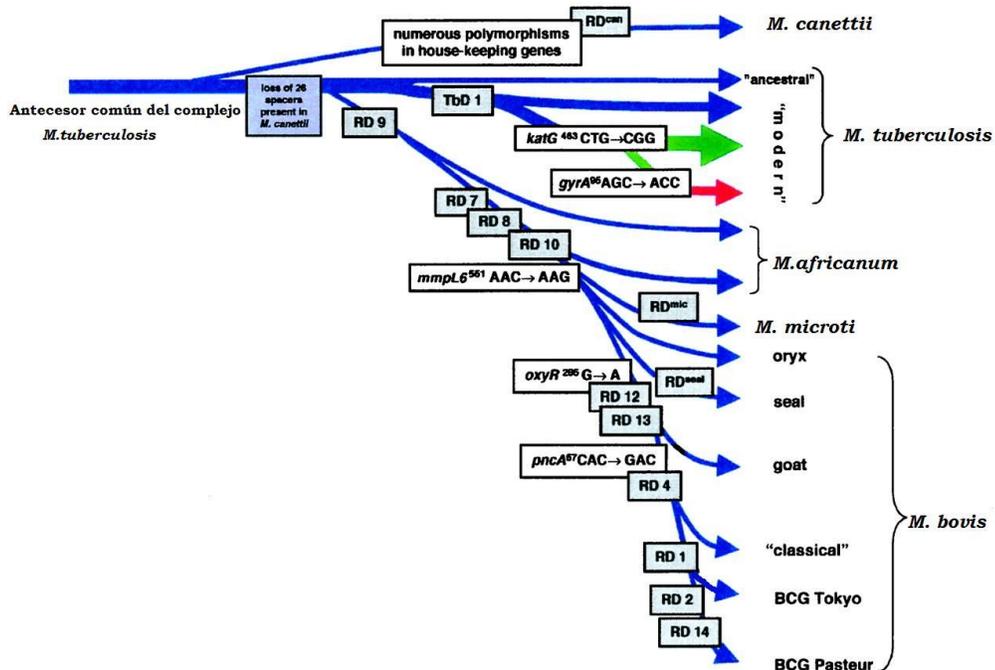


Figura I-6- Esquema de evolución propuesto para *M.tuberculosis* que ilustra pérdidas sucesivas de ADN (rectángulos celeste) en ciertos linajes. Brosch et al. PNAS 2002; 99: 3684-3689

Los análisis de hibridación diferencial utilizados para comparar *M. bovis* y BCG (Mahairas et al. 1996) y los análisis de microarreglos de ADN comparando el genoma de *M.tuberculosis* H37Rv y BCG (Behr et al. 1999b) permitieron identificar 16 regiones de diferencia (RD1-16), con una medida que va de 2 a 12,7 Kb, que están ausentes en BCG Pasteur comparándola con *M.tuberculosis* H37Rv (Gordon et al. 1999). Así, de estas 16 regiones suprimidas con respecto al genoma de *M.tuberculosis*, 11 pertenecen a *M. bovis* y 5 son exclusivas de BCG. Una de esas 5 deleciones, designada RD1 (9454 pb) está ausente en todas las cepas de BCG comúnmente usadas como vacunas contra la TB en todo el mundo (Hsu et al. 2003). En la figura 1-7 se muestra la delección de las regiones de diferencia RD1 y RD2 en la evolución de algunas de las subcepas de BCG en donde se encuentran los genes que codifican para algunas de las proteínas de interés en este trabajo.

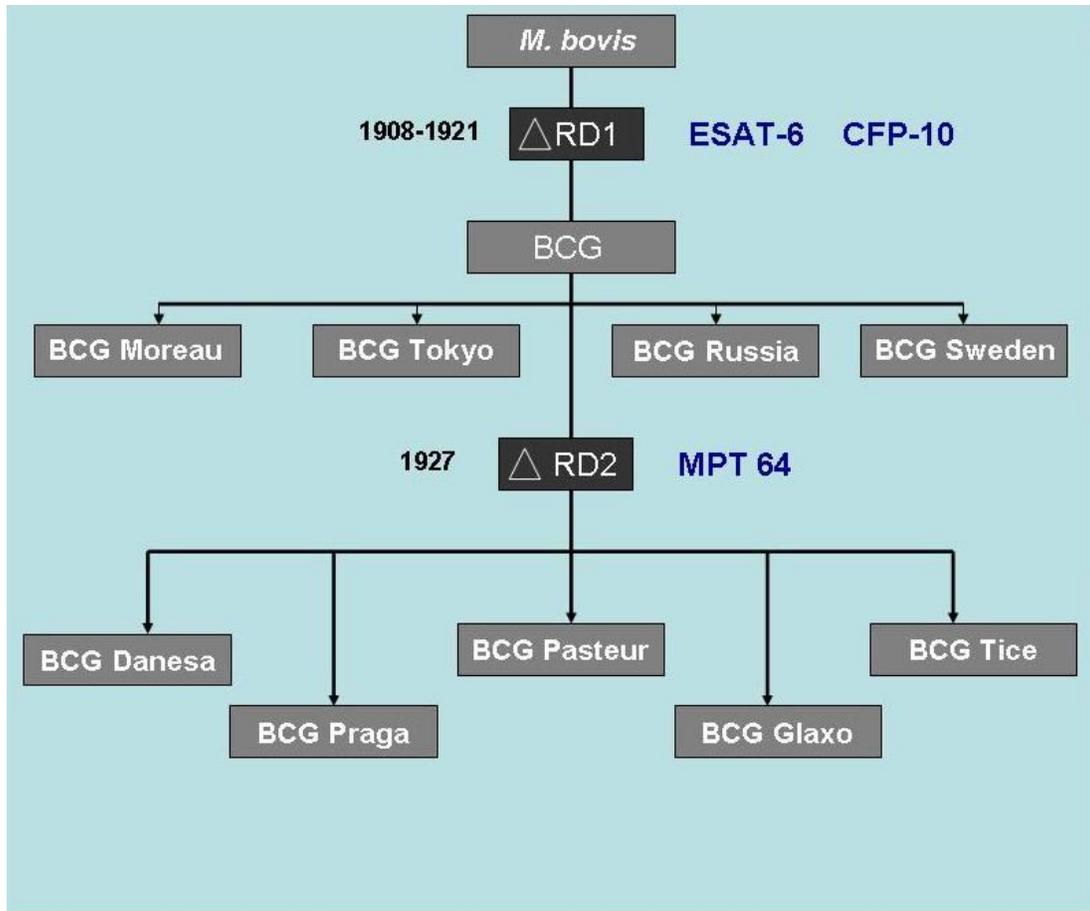


Figura 1-7- Genealogía parcial de subcepas de BCG. En los recuadros negros se marcan las regiones de diferencia deletadas RD1 y RD2 donde se encuentran los genes que codifican las proteínas ESAT-6/CFP-10 y MPT 64 respectivamente.

La delección de RD1 ocurrió muy temprano durante el desarrollo de BCG, probablemente antes de 1921 (Behr et al. 1999a). Por esta razón se sugirió y luego se demostró que RD1 fue la mutación primaria de atenuación, la cual resultó en la generación de BCG a partir de *M.bovis* (Pym et al. 2002; Hsu et al. 2003; Lewis et al. 2003).

Esta región ha sido estudiada muy en detalle ya que los productos de sus genes son de interés para el desarrollo de nuevas vacunas y también de suma utilidad para los fines diagnósticos. Los antígenos secretados en forma temprana como ESAT-6 y CFP-10 están localizados en esta región y su actividad inmunológica ha sido extensamente evaluada (Andersen et al. 1995; Sorensen et al. 1995; Andersen et al. 2000; van Pinxteren et al. 2000; Brock et al. 2001; Hanif et al. 2010).

ESAT-6 y CFP-10 son importantes candidatos para el diagnóstico por estar ausentes en todas las cepas de BCG y ser antígenos inmunodominantes, pues serían capaces de distinguir infección con micobacterias patógenas de la exposición a micobacterias ambientales o vacunados con BCG (Ravn et al. 1999; Arend et al. 2000; Munk et al. 2001; Brock et al. 2004; Ravn et al. 2005). Fuera de la región RD1, muchos antígenos han sido caracterizados y estudiados en relación a su capacidad inmunogénica: MPT64 cuyo gen se encuentra en la región RD2 (Tavares et al. 2007; Kalra et al. 2010a; Kumar et al. 2011) propuesto como un potencial diagnóstico en una prueba de parche cutáneo (Nakamura et al. 1998; Nakamura et al. 2001) , el complejo Ag 85 formado por tres miembros : Ag 85A, Ag 85B y Ag 85C presentes en todo el complejo *M.tuberculosis* y en otras especies del género *Mycobacterium* (Kashyap et al. 2007; Dayal et al. 2008; Kashyap et al. 2010; Nagdev et al. 2010), MPT63, MTC28, MPT70 específicos del Complejo *M.tuberculosis* (Lyashchenko et al. 1998), Rv3619c presente en la región RD9, el cual está suprimido en todas las cepas de BCG (Hanif et al. 2010). La identificación de todos estos antígenos específicos y su inmunogenicidad dan la oportunidad de desarrollar nuevas tuberculinas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la especificidad de la respuesta inmunocelular producida por antígenos recombinantes de *M.tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10, Ag 85B, MPT64) como reactivos de la prueba cutánea en modelo animal.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Obtención de rAgs: clonación del gen, amplificación y expresión de proteína recombinante.
- 2) Purificación de proteínas recombinantes
- 3) Diseño experimental de modelo animal para evaluación de rAgs por medida de DTH.
- 4) Ensayo de especificidad de los rAgs. Comparación de reactividad cutánea frente a la Tuberculina PPD 1-94.

III- MATERIALES Y METODOS

ANTÍGENOS RECOMBINANTES:

Se emplearon las siguientes proteínas recombinantes: rESAT-6, rCFP-10 y rMPT-64 seleccionadas de los antígenos recombinantes obtenidos en el laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biotecnología INTA, Castelar. Además, se produjo en esta misma Institución el rAg 85B, cuya producción forma parte de esta tesis y se detalla a continuación.

Obtención de rAg 85 B:

- Obtención de cultivos de *M. tuberculosis*

Se utilizó la cepa de *M.tuberculosis* H37 Rv (cedida por el laboratorio de Micobacterias de INEI-ANLIS Dr Carlos G. Malbrán). Los bacilos se sembraron sobre medio sólido Lowenstein-Jensen y se incubaron a 37° C hasta el crecimiento de colonias claramente visible.

- Obtención de ADN micobacteriano

Se siguió la técnica descrita por D.van Soolingen y colaboradores (van Soolingen et al. 2001). Brevemente; se tomaron con un ansa calibrada de 10 µl suficiente cantidad de micobacterias crecidas en Lowenstein-Jensen y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga Eppendorff de 1,5 cc conteniendo 500 µl buffer Tris/HCl-EDTA (TE) .Se calentó el mismo a 80°C durante 20 minutos para inactivar las células, luego se enfrió a temperatura ambiente. Se le agregó 50 µl de lisozima 10 mg/ml, se mezcló en vortex y se incubó toda la noche a 37° C. Luego se agregó una mezcla de Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 % y Proteinasa K y se incubó en baño termostático a 65 °C, después de 10 min. se le agregó NaCl 5 M y una solución de Bromuro de (N-cetil-N,N,N,-trimetil) amonio (CTAB)/NaCl. Se realizaron extracciones sucesivas con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Los ácidos nucleicos se precipitaron de la fase acuosa con isopropanol, se lavaron con etanol 70% y se resuspendieron en agua bidestilada con 20 µg/ml de ribonucleasa A durante 1 hora a 37°C.

La integridad, pureza y cuantificación del ADN se analizó por electroforesis en gel de agarosa (D1-LE Biodynamics) al 0,8 % (P/V), utilizando buffer Tris-Acético-EDTA (TAE) de corrida, sembrando 1 µl de solución de ADN. El ADN se visualizó por tinción con bromuro de etidio (BE) y observación a la luz U.V. La cuantificación se realizó comparando a la luz UV la fluorescencia producida por cantidades conocidas de ADN.

-Amplificación del gen por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El diseño de los primers se realizó de acuerdo a la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el antígeno 85B (gen Rv 1886c) en *M.tuberculosis* obtenida del Tuberculist (Figura III-1). El gen tiene 978 pares de bases.

M.tuberculosis H37Rv|Rv1886c|fbpB 978 bp-SECRETED ANTIGEN 85-B
 FBPB (85B) (ANTIGEN 85 COMPLEX B) (MYCOLYL TRANSFERASE 85B)
 (FIBRONECTIN-BINDING PROTEIN B) (EXTRACELLULAR ALPHA-ANTIGEN)

```

atgacagacgtgagccgaaagattcgagcttggggacgcccattgatgatcggcacggca
cgggctgtagtccttccgggcctgggtggggcttgccggcggagcggcaaccgcgggcgcg
ttctcccgccgggggctgccggtcgagtacctgcaggtgccgtcgccgctcgaaggccgc
gacatcaaggttcagttccagagcgggtgggaacaactcacctgcggtttatctgctcgac
ggcctcgcgcccaagacgactacaaaggctgggatatcaacacccggcgttcgagtggtg
tactaccagtcgggactgtcgatagtcattgcccggctcggcggcagtcagcttctacagc
gactggtacagcccggcctgaggtaaggctggctgccagacttacaagtgggaaaccttc
ctgaccagcagctgcccgaatggttgtccgccaacagggccgtgaagcccaccggcagc
gctgcaatcggcttgctgatggccggctcgctcggcaatgatcttggccgcctaccacccc
cagcagttcatctacgccggctcgctgtcggccctgctggacccctctcaggggatgggg
cctagcctgatcggcctcgcatgggtgacgcggcgggttacaaggccgcagacatgtgg
ggtccctcgagtgaccggcatgggagcgcgaaccctacgcagcagatccccaaagctg
gtcgaaaacaacacccggctatgggtttattgcggaacggcaccacccgaacgagttgggc
ggtgccaacatacccgccgagttcttggagaacttcgttcgtagcagcaacctgaagttc
caggatgctgacaacgcggcggggcgggcacaacgcctgttcaacttcccgcccaacggc
acgcacagctgggagtagtggggcgctcagctcaacgccatgaagggtgacctgcagagt
tcgtaggcggcggctga

```

Figura III-1- Secuencia nucleotídica del Rv 1886c obtenida del Tuberculist. Se señalan en azul las bases elegidas para el diseño de los primers.

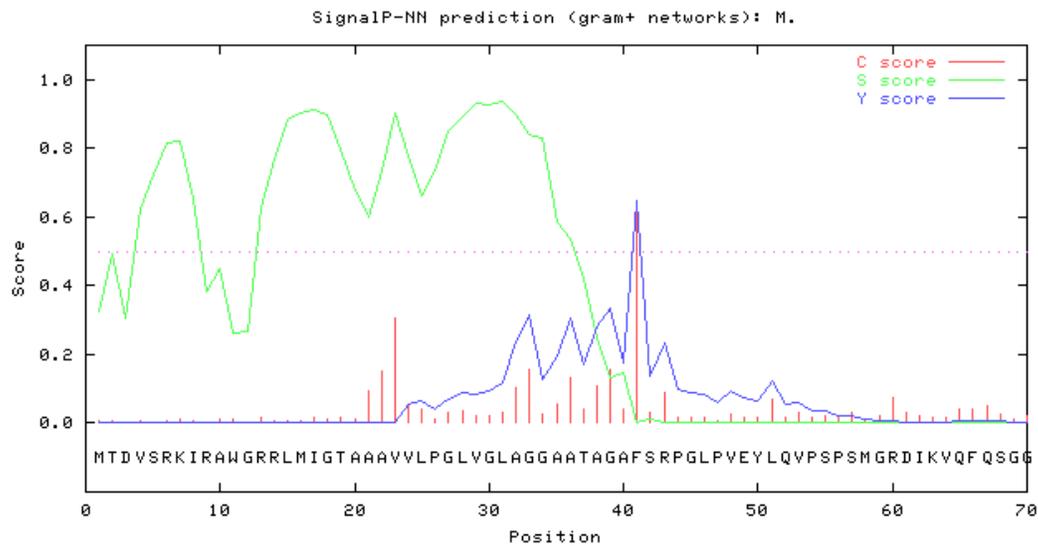
Para determinar la presencia y localización del sitio de clivaje del péptido señal se utilizó el programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína 85B y teniendo en cuenta que *M.tuberculosis* es una bacteria Gram positiva (Figura III-2).

M. tuberculosis H37Rv|Rv1886c|FbpB: 325 aa - SECRETED ANTIGEN 85-B FBPB (85B) (ANTIGEN 85 COMPLEX B) (MYCOLYL TRANSFERASE 85B) (FIBRONECTIN-BINDING PROTEIN B) (EXTRACELLULAR ALPHA-ANTIGEN)

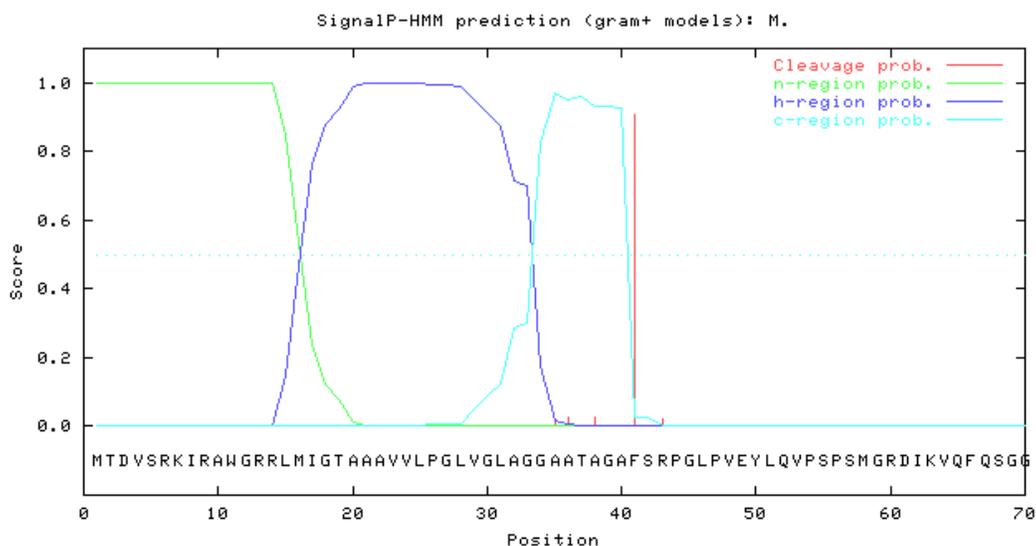
MTDVSRKIRAWGRRMLMIGTAAAVVLPGLVGLAGGAATAGAFSRPGLPVEYLQVPSPSMGR
 DIKVQFQSGGNNSPAVYLLDGLRAQDDYNGWDINTPAFEWYYQSGLSIVMPVGGQSSFYS
 DWYSPACGKAGCQTYKWETFLTSELPQWLSANRAVKPTGSAAIGLSMAGSSAMILAAYHP
 QQFIYAGSLSALLDPSQGMGPSLIGLAMGDAGGYKAADMWGPSSDPAWERNDPTQQIPKL
 VANNTLWVYCGNGTPNELGGANIPAEFLENFVRSNLKFQDAYNAAGGHNAVFNFPPNG
 THSWEYWGAQLNAMKGDLSLQSSLGAG

Figura III-2- Secuencia aminoacídica del gen Rv 1886c que codifica para la proteína 85B obtenida del Tuberculist.

El resultado obtenido del programa SignalP predice que el sitio de clivaje de la proteína estaría localizado entre la posición aminoacídica 40-41, según los gráficos arrojados (Figura III-3).



```
>M.                               length = 70
# Measure   Position  Value  Cutoff  signal peptide?
  max. C     41       0.617  0.52   YES
  max. Y     41       0.647  0.32   YES
  max. S     31       0.937  0.97   NO
  mean S     1-40     0.655  0.51   YES
  D         1-40     0.651  0.45   YES
# Most likely cleavage site between pos. 40 and 41: AGA-FS
```



>M.
 Prediction: Signal peptide
 Signal peptide probability: 1.000
 Max cleavage site probability: 0.905 between pos. 40 and 41

Figura III-3. Gráficos arrojados del Programa SignalP para la predicción del péptido señal.

Los oligonucleótidos usados para la amplificación del gen por PCR fueron los siguientes:

Primer directo o “forward” (85Bdir):

Fue diseñado de manera tal que no incluya la porción del gen que codifica para el péptido señal y con una secuencia adicional de reconocimiento para la enzima de restricción *Bam* HI (resaltado en azul)

5' **GGATCC**TTCTCCCGGCCGGGGCTG 3'

Primer reverso: (85Brev)

5' **AAGCTT**TCAGCCGGCGCCTAACGAACTC 3'

Diseñado con el sitio de restricción para la enzima *Hind* III. (resaltado en azul)

El cálculo de las T.m para ambos primers se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$T_m = 69,3 + 0,41 \frac{(C+G)}{\text{Total}^*} \times 100 - \frac{650}{\text{Total}^*}$$

* Total de bases (sin incluir la secuencia de corte de enzima)

Las T.m obtenidas fueron 65,08 y 65,84 para el primer directo y para el primer reverso respectivamente, sin contar los sitios de restricción adicionados.

Los primers liofilizados fueron obtenidos de Alpha DNA, Montreal.

Se reconstituyeron con agua tipo I estéril según las indicaciones del fabricante.

Se alicuotaron en microtubos y se conservaron a -20°C .

Para la reacción de PCR se prepararon volúmenes finales de $50\ \mu\text{l}$ conteniendo 10mM de buffer Tris pH8, 2,5 mM de MgCl_2 , 100 μM de cada desoxinucleótido trifosfato, 83 pmol de cada primer, 2 Unidades de la enzima ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) y 5 ng de ADN cromosomal de *M. tuberculosis*.

Se ensayaron distintas condiciones de amplificación resultando ser la más conveniente:

-Paso inicial de desnaturalización de ADN (96°C durante 3 minutos) seguidos de 3 ciclos con los siguientes pasos:

1º ciclo 96°C durante 1 minuto (desnaturalización)

$66,5^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto (unión de los primers al ADN molde)

72°C durante 2 minutos (extensión)

2º ciclo 96°C durante 1 minuto (desnaturalización)

66°C durante 1 minuto

72°C durante 2 minutos

3º ciclo 96°C durante 1 minuto

$65,5^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto

72°C durante 2 minutos

Luego 27 ciclos de:

1º ciclo 96°C durante 1 minuto

65°C durante 1 minuto

72°C durante 2 minutos

-Paso final a 72°C durante 10 min. y finalmente a 4°C .

Se usó un termociclador automático (marca Biometra Trio, Alemania).

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE 1 con BE y el tamaño se verificó frente a un marcador de ADN (1 Kb DNA ladder Promega).

Los fragmentos de ADN se purificaron del gel de agarosa utilizando los reactivos de QIAquick Gel extraction kit (Qiagen).

-Clonado del producto de PCR

Los productos de PCR fueron clonados en el vector plasmídico T (pGEM-T easy Vector System 1, Promega), adecuado para la clonación de productos de PCR, ya que contiene en cada extremo 3' del sitio de inserción una Timidina (Figura III-4).

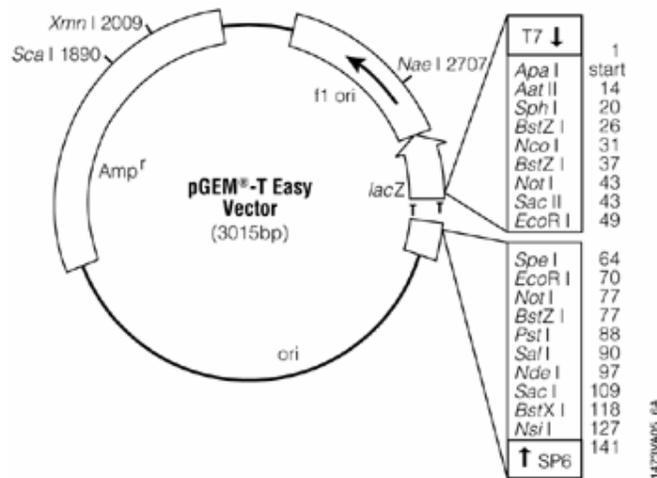


Figura III-4- Vector plasmídico de clonado pGEM-T Easy Vector

El vector plasmídico contiene el promotor T7 y los genes *Amp^r* y *lacZ*. En este último se encuentra el sitio de clonado múltiple.

En primer lugar se realizó la reacción de ligación del inserto (producto de PCR) con T4 ADN ligasa, el buffer correspondiente conteniendo ATP y DTT y el vector pGEM-T en una relación inserto: vector 2:1. Se incubó toda la noche a 4 °C.

La transformación se realizó en células competentes *Escherichia coli* (*E.coli*) DH5 α (ver Anexo). Dichas células mantenidas a -70°C se incubaron en baño de hielo (0°C) con agitación suave durante 5 minutos.

Cuidadosamente se transfirieron 45 μ l de la suspensión de células a un microtubo con 5 μ l de de producto de ligación. Se dejó 1 hora a 0°C (baño de hielo) y luego se realizó un choque térmico durante 2 minutos a 42°C sin agitación. Se le agregó 200 μ l de caldo Luria Bertani (LB) y se incubó 20 minutos a 37°C en cámara estufa (proceso de recuperación).

Se sembraron 100 μ l de ese cultivo, expandiendo con rastrillo hasta absorción, en placa de Petri conteniendo agar LB adicionado con 100 μ g/ml de Ampicilina, 0,1 mM de isopropyl- β -tiogalactopiranosido (IPTG) y 0,2 % de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidasa (X-Gal). Se incubó a 37 °C durante toda la noche.

La selección de los clones bacterianos transformados por el plásmido que contienen el inserto se realizó por visualización de la actividad de la β -galactosidasa.

Las colonias de color blanco se sembraron en 5 ml de LB adicionado con Ampicilina, y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación de 150 rpm.

El ADN plasmídico se extrajo con un kit comercial (Wizard plus sv Minipreps DNA Purification system Promega) según las especificaciones del fabricante.

Para verificar la presencia del inserto se hizo una digestión con la enzima *Eco* RI, que flanquea el inserto, y se corrió en un gel de agarosa 0,8 % con BE en buffer TAE 1X, y luego se observó a la luz U.V. de un transiluminador.

Los plásmidos de dos de las colonias que liberaron el inserto fueron enviados a secuenciar (Servicio de secuenciación INTA;Castelar) para determinar la identidad del mismo.

-Subclonado en el plásmido de expresión

Para la inducción y expresión de la proteína se utilizó el vector pRSET A (Invitrogen). Es un vector apropiado para la expresión de niveles altos de proteínas en *E.coli*, debido a la presencia de promotor T7, permitiendo una regulación externa del momento de la expresión por la inducción del agregado de IPTG.

Además el vector agrega una cola de 6 histidinas al extremo N-terminal de la proteína expresada, facilitando de esta manera la posterior purificación de la misma por resina de afinidad de níquel agarosa.

El ADN plasmídico (PGEM-T + inserto 85B) fue digerido con 2 enzimas de restricción: *Bam* HI y *Hind* III (cuyos sitios se encuentran en los primers de clonado) según especificaciones del fabricante (New England Biolabs). Para la

doble digestión se utilizó el buffer de *Bam* HI, compatible con ambas enzimas de restricción.

Las muestras digeridas fueron sembradas en un gel de agarosa al 0,8 % para la purificación del inserto y luego se realizó la ligación con el vector pRSET A, previamente digerido con las mismas enzimas utilizadas anteriormente y desfosforilado, en una relación vector-inserto de 3:1.

Se transformaron células competentes *E.coli* BL21pLys, con los productos de ligación (PRSET A-85B) y con pRSET A + ligasa (control negativo). Se incubaron las ligaciones con las bacterias descongeladas durante 1 hora en baño de hielo y luego se sometieron a un shock térmico de 42°C durante 2 minutos. Transcurrido ese tiempo se les adicionó 200 µl de caldo LB + 100 µg/ml de ampicilina + 25 µg/ml de cloranfenicol, y se agitó 20 minutos a 37°C. Luego se sembraron placas de agar LB suplementadas con ampicilina y cloranfenicol.

Se eligieron al azar varios clones crecidos y se sembraron en caldo LB +ampicilina+cloranfenicol a 37°C en agitación toda la noche. Se extrajo luego el ADN plasmídico con kit comercial (Wizard plus sv Minipreps DNA Purification system Promega) y se realizó una digestión con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III. Las muestras digeridas fueron corridas en un gel de agarosa 0,8% con BE en buffer TAE 1X, y luego fueron observadas a la luz U.V

-Expresión de la proteína recombinante

Se crecieron bacterias *E. coli* de la cepa BL21pLys previamente transformadas con el plásmido recombinante (pRSET A-85B) en 5 ml de caldo LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina + 25 µg/ml de cloranfenicol mantenido a 37°C en agitación durante toda la noche.

Se preparó un caldo LB de 50 ml suplementado con 100 µg/ml de ampicilina + 25 µg/ml de cloranfenicol y se le agregó 500 µl del cultivo crecido durante toda la noche. Se incubó en cámara estufa a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial ($D.O_{600\text{ nm}} = 0,320$).

El cultivo se dividió en dos alícuotas de 20 ml cada una. Una de las alícuotas se indujo con 200 µl de IPTG 100 mM. Ambas alícuotas fueron nuevamente

incubadas a 37°C con agitación. Se retiraron muestras de 5 ml de cada una a distintos tiempos de incubación: 0, 60, 120, 180 minutos y toda la noche, con el fin de optimizar la expresión de la proteína.

La misma secuencia de cultivos fue repetida, pero haciendo una inducción con 600 µl de IPTG 100mM.

Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 2 minutos en centrífuga (Eppendorf). Los pellets celulares se resuspendieron en 200 µl de buffer de siembra PAGE 6X y se hirvieron durante 5 minutos. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 12,5% en una cuba Mini-Protean (Bio-Rad). El gel fue teñido con Coomassie-Blue para visualizar las proteínas.

-Análisis por SDS-PAGE y WESTERN-BLOT

Los pellets de los cultivos con y sin inducción fueron analizados en SDS-PAGE. Las muestras se disolvieron en buffer de corrida (2% SDS, 0,125 M Tris-ClH, pH 6,8, 1% 2-mercapetanol, 0,02 % azul de bromofenol y 10 % glicerol) y fueron calentadas a 100 °C durante 5 minutos. Se sembraron 2 geles de poliacrilamida al 12,5 % y se corrieron a 30 mA durante 1 hora.

Uno de los geles se tiñó con Coomassie-Blue y el otro se utilizó para electrotransferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (BRL) a 100 mA durante toda la noche a 4 °C. La eficiencia de la transferencia se visualizó con una coloración transitoria con Rojo Ponceau.

La identidad inmunológica de la proteína recombinante fue probada mediante Immunoblot.

Las membranas fueron bloqueadas con 5% leche descremada en TBS (50 mM Tris-HCl, pH 8 y 150 mM NaCl) a 4°C durante 1 hora con agitación constante. Luego fueron enfrentados con Ac. anti histidina (GE Healthcare) y Ac. anti 85B (ac. policlonal de conejo, INTA) durante 2 hs a 4°C. Luego de 4 lavados con TBS al 1 % se agregaron los segundos anticuerpos (IgG anti ratón e IgG anti conejo) marcados con fosfatasa alcalina a una dilución de 1/1000 y se incubaron durante 2 hs más a 4°C con agitación. Por último se reveló con p-toluidina 5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) y cloruro de tetrazolio nitroazul (NBT) resuspendido en buffer, previo 3 lavados más con TBS al 1 % y un

lavado con buffer de fosfatasa alcalina (BREFA) (100mM Tris-HCl, pH9,5, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂). La reacción fue detenida por agregado de agua después de los 20 minutos.

-Purificación de la proteína recombinante

Los pellets celulares obtenidos de un cultivo de 200 ml con una inducción de 2 hs con IPTG 1 mM fueron resuspendidos en PBS y buffer de lisis (100 mM NaCl, 70 mM Tris-HCl pH 8, 10 % Glicerol, 0,5 % Triton X-100). Luego se les agregó una punta de espátula de esferas de sílica de 0,1 mm y se pasó por FastPrep FP120(Bio101-Savant, Holbrook, NY) durante 40 segundos a una velocidad de 6.0. Posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min.

El sobrenadante fue separado del pellet y ambos fueron analizados por SDS-PAGE al 12,5 %.

Los sedimentos fueron tratados con buffer de extracción (70 mM Tris-HCl pH8 , 400 mM NaCl, PMSF 1 mM, Glicerol 10 %, y 8M urea) durante 45 minutos en agitación, para solubilizar los cuerpos de inclusión y desnaturalizar las proteínas. Luego se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se mezcló con 5 ml de resina Ni²⁺-NTA (Invitrogen), previamente equilibrada según especificaciones del fabricante, con agitación constante durante 45 minutos.

Esta resina contiene el ligando ácido nitrilotriacético (NTA) unido fuertemente con iones Ni²⁺, que tienen alta afinidad por proteínas de fusión a las que se adicionó una cola con 6 residuos de histidinas, facilitando así su purificación.

La purificación se realizó en columna. Luego de obtener el percolado, se realizaron lavados sucesivos con buffer de lavado (70 mM Tris-HCl pH 8, NaCl 400 mM) conteniendo urea en concentraciones decrecientes: 8M, 4M, 2M y 1M. Por último se lavó con buffer de lavado solo. Posteriormente se realizaron las eluciones con soluciones de 250 mM, 500 mM y 1000 mM de imidazol en buffer de purificación (70 mM Tris.HCl pH 8 NaCl 100 mM) en la misma columna.

Las fracciones obtenidas de cada elución conteniendo la proteína de interés fueron mezcladas y dializadas contra Buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2 toda la noche a 4°C, utilizando una membrana de celulosa con un límite de corte de

3,500 Da (Cellu Sep TM). Luego fueron concentradas y valoradas con reactivo de Bradford (Bio-Rad) y conservadas a -20 °C para su posterior análisis por SDS-PAGE.

ENSAYOS DE DTH

-Cultivos y Cepas bacterianas

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas: *M.tuberculosis* H37 Rv, y *M.avium* 8070 cedidas por el laboratorio de Micobacterias del INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, y BCG cepa Pasteur 1173 P2 Lote A Marzo 1973 (Staten Serum Institute, Dinamarca).

Las cepas de *M.tuberculosis* y *M. avium* fueron sembradas en medio Lowenstein-Jensen y crecidas a 37°C hasta la visualización de las colonias características.

Un ansa de cada cultivo se sembró sobre la superficie de erlenmeyers conteniendo 200 ml de medio líquido Sauton y se incubaron a 37°C durante 45 días.

Los cultivos de BCG se realizaron con los procedimientos recomendados por OMS para la producción de vacunas BCG (OMS 1987b).

-Preparación de antígenos y productos:

Al término de 45 días un frasco de cultivo de cada cepa (*M. tuberculosis*, *M. avium* y BCG) fue autoclavado a 121°C y 1atm por una hora. La masa bacilar fue separada del sobrenadante de los cultivos por centrifugación a 4000 rpm por 60 min. El pellet de *M.tuberculosis* y *M.avium* fue conservado a -20°C hasta su uso para la sensibilización de los animales. Los sobrenadantes de los cultivos de BCG y *M.avium* fueron filtrados a través de una membrana esterilizante (Millipore) de 0,22 µm de poro y las proteínas presentes en los mismos se precipitaron con el agregado de ácido tricloroacético (TCA) (Anedra, Argentina) a una concentración final de 4 %. Luego de una incubación a 4°C toda la noche, se centrifugaron a 4000 rpm, a 4°C, durante 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado obtenido se lavó 3 veces con

TCA 1 % y luego con NaCl 5 %. El pellet se resuspendió con 200 µl de buffer alcalino y 3 ml de buffer fosfato pH 7.2 (obtención de PPD avium y de BCG).

Al mismo tiempo (45 días) los sobrenadantes de otros dos frascos de cultivos de *M.tuberculosis* y *M.avium* fueron separados de la masa bacilar sin autoclavar. Las proteínas de los sobrenadantes fueron obtenidas de la misma manera detallada anteriormente.

La concentración de proteínas se determinó con el reactivo de Bradford (Bio-Rad) utilizando albúmina bovina (Sigma) como estándar.

El PPD 1-94 2UT/0,1 ml lote N°22, fue producido en el Servicio Derivados de Micobacterias del INPB de la A.N.L.I.S Dr. Carlos G. Malbrán de acuerdo a las normas de O.M.S para la producción de tuberculinas (OMS 1987a).

PPD RT-23 2 UT/0,1 ml lote N° 1546A fue obtenido de Biol Argentina.

rAgs: fueron preparados en una solución conteniendo 10 µg/ml para las pruebas cutáneas de ensayo de antígeno único, y en la misma concentración para la prueba de mezcla de ags. Las diluciones fueron realizadas con buffer fosfato conteniendo 0,3% de fenol y 0,01 % de Tween 80.

-Sensibilización de cobayos:

Todos los animales de experimentación fueron obtenidos del Bioterio Central del Instituto Nacional de Producción de Biológicos A.N.L.I.S Dr. Carlos G.Malbrán.

Se utilizaron para este estudio cobayos machos de la cepa Short Hair con un peso de 300-400g.

Todos los animales fueron sensibilizados vía intramuscular en la pata posterior derecha con 0,5 ml de una emulsión preparada para cada grupo de la siguiente manera:

Grupo 1: 2 mg de *M.tuberculosis* muertos por calor + 2 mg de proteínas obtenidas del filtrado de su cultivo (sin autoclavar) emulsionado con adyuvante de Freund incompleto.

Grupo 2: 2 mg de *M.avium* muertos+ 2 mg de proteínas obtenidas del filtrado de su cultivo (sin autoclavar) emulsionado con adyuvante de Freund incompleto.

Grupo 3: se sensibilizó también intramuscularmente con una suspensión de BCG viva cepa Pasteur 1173 P2 conteniendo 4×10^6 U.F.C/ml emulsionada en adyuvante de Freund incompleto.

-Test cutáneo:

Las respuestas de hipersensibilidad tardía fueron evaluadas 4 semanas después de la sensibilización de los cobayos.

Se rasuró el pelo de cada animal en prueba en ambos flancos sin producir abrasiones en la piel. Las inoculaciones de las diluciones se efectuaron según diseño de cuadrado latino, en un volumen de 0,1 ml por vía intradérmica utilizando 6 cobayos por experiencia. Se utilizaron 6 sitios por cada cobayo (3 en cada flanco). A las 24 hs. siguientes a las inoculaciones, se midieron con regla milimetrada los halos longitudinales y transversales de la reacción de induración. Los diámetros de las reacciones fueron obtenidos como promedio de ambas medidas \pm su desvío estándar.

El diseño de cuadrado latino es utilizado en este tipo de ensayos, controla la fuente de variación en dos direcciones, hileras y columnas. De esta manera nos aseguramos que cada inoculación se haga en un sitio distinto en cada cobayo.

-Ensayo de potencia relativa del PPD 1-94 frente al PPD RT-23:

Para este ensayo de prueba cutánea se utilizaron tres diluciones seriadas 1: 2 (a partir de 2 UT/0,1 ml, valor declarado por el productor) de cada uno de los productos tuberculínicos: PPD 1-94 y PPD RT-23, según diseño de cuadrado latino detallado en tabla III-1, de acuerdo al protocolo de prueba de potencia utilizado de rutina en el control de los lotes de PPD para uso humano (de Kantor 1980). Se aplicó un modelo de cálculo de líneas paralelas (Farmacopea.de.los.Estados.Unidos.Mexicanos. 1994).

	Cobayo 1	Cobayo 2	Cobayo 3	Cobayo 4	Cobayo 5	Cobayo 6
Flanco izquierdo	P1	M1	P2	M2	P3	M3
	M3	P1	M1	P2	M2	P3
	P3	M3	P1	M1	P2	M2
Flanco derecho	M2	P3	M3	P1	M1	P2
	P2	M2	P3	M3	P1	M1
	M1	P2	M2	P3	M3	P1

Tabla III-1. Ensayo de potencia relativa del PPD 1-94 frente al PPD RT-23 : diseño de cuadrado latino. P= Patrón (PPD-RT-23), M= Muestra (PPD 1-94). Los subíndices 1, 2 y corresponden a las dosis baja, media y alta respectivamente de cada PPD inoculados en cada cobayo (n=6).

-Ensayo de comparación de reactividad de cada rAgs frente al PPD 1-94

Se realizó de acuerdo a lo descrito en el test cutáneo utilizando el diseño de cuadrado latino detallado en tabla III-2.

El ensayo de rAgs simples se realizó utilizando una concentración de 1 µg/dosis para cada uno, y 0,03 µg/dosis de PPD 1-94 (2 UT). Se ensayó en los tres grupos de animales. En todos los grupos se inoculó 0,1 ml de PBS como control negativo.

	Cobayo 1	Cobayo 2	Cobayo 3	Cobayo 4	Cobayo 5	Cobayo 6
Flanco izquierdo	a	f	e	d	c	b
	b	a	f	e	d	c
	c	b	a	f	e	d
Flanco derecho	d	c	b	a	f	e
	e	d	c	b	a	f
	f	e	d	c	b	a

Tabla III-2. Ensayo de comparación de reactividad de cada rAgs frente al PPD 1-94: diseño de cuadrado latino. Cada letra representa un Antígeno a una determinada concentración, de manera tal que cada uno quede inoculado en un sitio distinto en cada cobayo.(a=85B, b=ESAT-6, c=CFP-10, d=MPT64, e=PPD 1-94, f=Buffer fosfato).

Para la prueba cutánea de la mezcla de rAgs, se utilizaron tres diluciones seriadas al medio de la mezcla (1, 0,5 y 0,25 μ g), y 3 diluciones seriadas al medio de PPD 1-94 (0,03, 0,015 y 0,0075 μ g, equivalentes a 2, 1 y 0,5 UT). El mismo ensayo se realizó en los tres grupos de animales. El esquema de inoculaciones se realizó igual que el detallado en la Tabla III-1, donde P corresponde al PPD 1-94 y M a la mezcla de antígenos (1,2, y 3 corresponden a las dosis baja, media y alta respectivamente).

Amplificación y clonado del gen del antígeno 85B

Conociendo la secuencia del gen RV1886c (denominado también MTB59 ó Ag 85B) (GenBank o Tuberculist) se diseñaron los oligonucléotidos con sitios de restricción para dos endonucleasas que sirvieron como adaptadores para facilitar el proceso de clonado direccional en el vector de expresión pRSET A. Este vector, que se muestra en la Figura IV-1, presenta un sitio múltiple de clonado, permitiendo que el fragmento de interés clonado quede en fase con la secuencia que codifica para 6 histidinas en la región N-terminal. Esto permite purificar a la proteína recombinante por una columna de afinidad de níquel quelado.

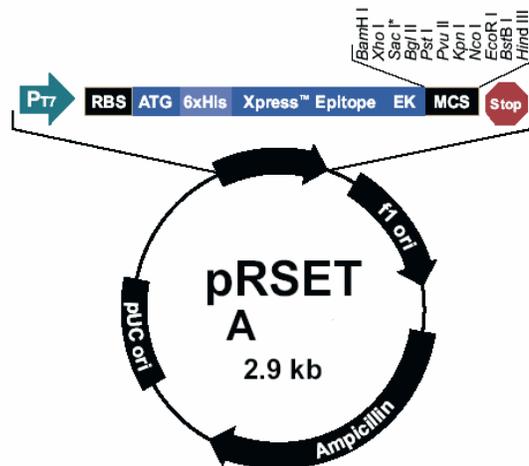


Figura IV-1. Mapa del vector de expresión pRSET A. Se señalan los sitios de restricción utilizados para el clonado.

El clonado del gen y el posterior subclonado para expresar la proteína recombinante se resume en el esquema mostrado en la Figura IV-2.

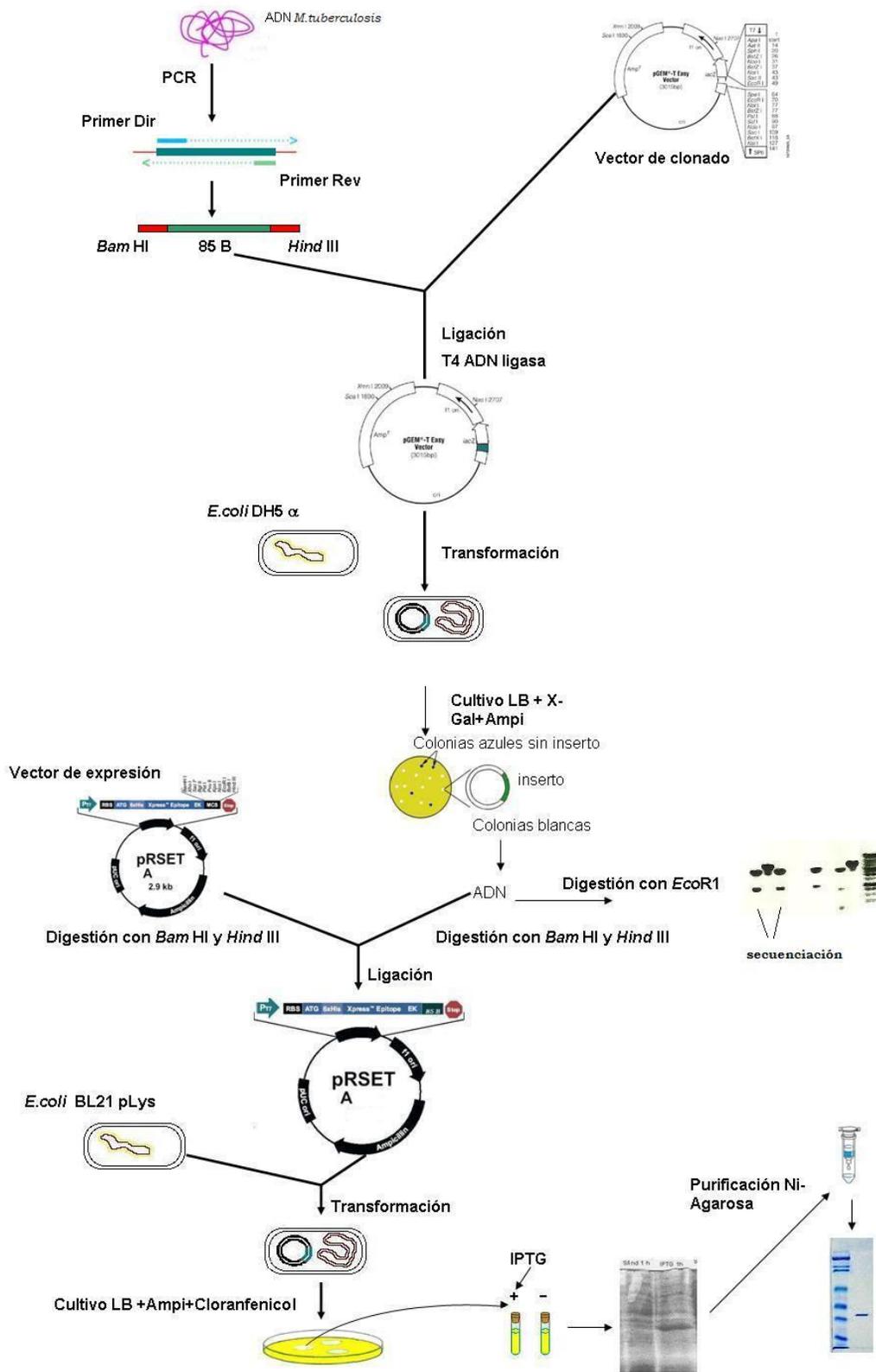


Figura IV-2. Estrategia de clonado en pGEM-T y subclonado en pRSET A para la obtención de la proteína recombinante.

Se diseñó un experimento de amplificación por PCR sobre ADN extraído de una cepa de *M.tuberculosis* (según materiales y métodos).

De esta forma se obtuvo un producto de tamaño esperado de 858 pb que carece de la porción amino terminal que codifica para el péptido señal de secreción (Figura IV-3).

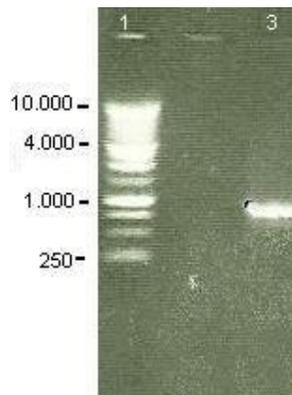


Figura IV-3. Gen Rv 1886c (Ag 85B) de 858 pb amplificado por PCR. Gel de agarosa 0,8 % teñido con bromuro de etidio. Calle 1: 1 Kb ladder Calle 2: control negativo (Primers) Calle 3: producto de PCR a partir de la cepa de *M.tuberculosis*.

Luego este fragmento fue ligado en un vector T (pGEM-T-Easy) aprovechando las adeninas que introduce la Taq polimerasa en los extremos de los fragmentos amplificados durante la extensión de cadenas. Esta construcción se utilizó para transformar bacterias competentes, *E.coli* DH 5 α , con el objetivo de amplificar el plásmido.

Las bacterias transformadas se detectaron por la actividad de la β -galactosidasa, una enzima codificada por el plásmido que usa como sustrato cromogénico X-gal presente en el agar LB suplementado con ampicilina. Cuando dicho compuesto es clivado se observa un color azul característico. El inserto interrumpe la secuencia codificante de la enzima en el plásmido, por lo tanto las bacterias que lo contenían se observaron de color blanco, mientras aquellas que poseían el plásmido sin inserto conservaron la actividad enzimática y se visualizaron de color azul.

Los clones positivos (colonias blancas) fueron cultivados en caldo LB a 37°C y después de crecimiento de toda la noche se extrajo el ADN. Se les realizó una digestión con la enzima *Eco* RI que libera el inserto del plásmido como control. (pGEM-T tiene 2 sitios de corte para esta enzima que flanquean el sitio de

clonado múltiple). Se visualizó en un gel de agarosa al 0,8 % con BE. De los 16 clones positivos, solo tres liberaron el inserto después de la digestión (Figura IV-4).

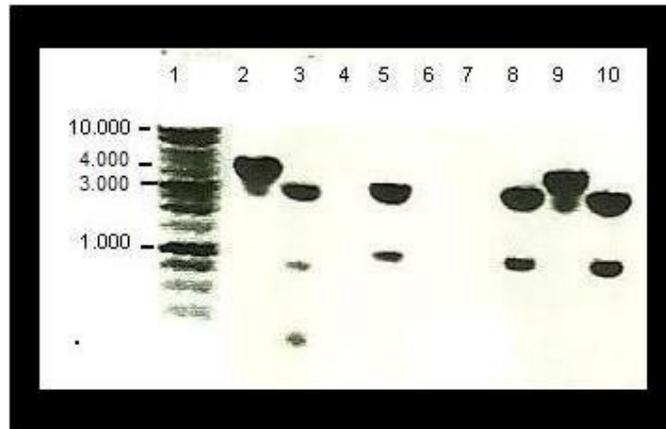


Figura IV-4. Digestión de ADN plasmídico (pGEM-T) con *Eco* RI. Calle 1: 1 Kb ladder. Calle 2 y 9 : ADN sin digerir (aprox. 4000 pb). Calle 3: digeridos con *Eco* RI. En las calles 5, 8 y 10 se observan las dos bandas: plásmido (aprox. 3000 pb) e inserto liberado por la digestión enzimática, banda aprox. en 1000 pb.

La secuenciación del DNA amplificado por PCR de esas dos colonias elegidas confirmó la identidad del gen clonado y verificó que no se introdujeron mutaciones en el paso de PCR.

El inserto de una de las colonias secuenciadas, posterior a la digestión con las dos enzimas de restricción elegidas (*Bam* HI y *Hind* III), fue recuperado del gel de agarosa.

Para subclonarlo en el vector pRSET A, previamente tratado con las mismas endonucleasas y desfosforilado, vector e inserto fueron ligados usando ligasa de fago T4 y ésta muestra fue usada para transformar bacterias competentes *E.coli* BL21pLys. Se utilizó como control negativo bacterias competentes transformadas con pRSET A sin inserto (wild type).

Las bacterias transformadas se plaquearon en agar LB suplementado con ampicilina+cloranfenicol. Se observó una diferencia marcada de crecimiento en las placas que contenían el inserto con respecto a las placas conteniendo bacterias solo con pRSET A.

Se eligieron al azar varios clones crecidos. Después de la purificación del ADN y digestión con las enzimas de restricción utilizadas previamente, las muestras fueron corridas en gel de agarosa. Tres clones fueron positivos (Figura IV-5).

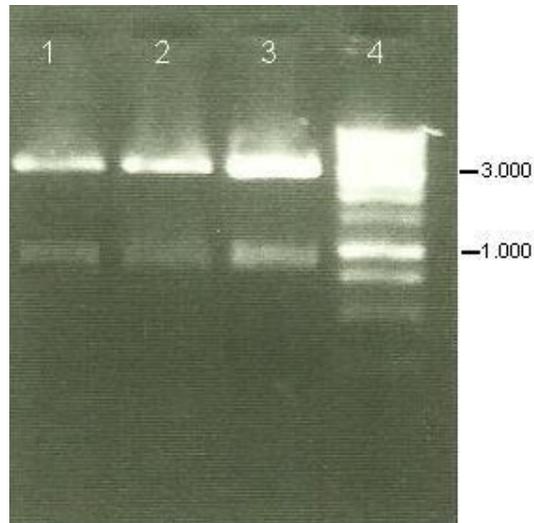


Figura IV-5. Digestión de ADN de clones crecido en LB con *Bam* HI y *Hind* III. Gel de agarosa de 0,8 % teñido con Bromuro de etidio. Calle 1, 2 y 3: se observan las dos bandas obtenidas posterior a la digestión enzimática, vector plasmídico (Aprox. 3000 pb) y gen de interés (aprox. 1000 pb) Calle 4: 1 Kb ladder

Uno de ellos fue elegido para preparar el cultivo para la expresión de la proteína recombinante.

Expresión de la proteína recombinante:

Para evaluar la expresión de la proteína recombinante se compararon dos cultivos: uno con el inserto y otro de células sin transformar. Ambos fueron crecidos en las mismas condiciones hasta la fase exponencial de crecimiento, ($DO_{600\text{ nm}} = 0,320$) posteriormente cada uno fue dividido en dos y solo a uno de ellos se le agregó el inductor para la expresión de la proteína.

Las bacterias fueron recolectadas por centrifugación, el pellet fue analizado por SDS-PAGE.

La figura IV-6 muestra los pellets de dichas células. Se destaca la presencia de una banda de 30 kDa que se sobreexpresa en el control con inducción (calle 2).

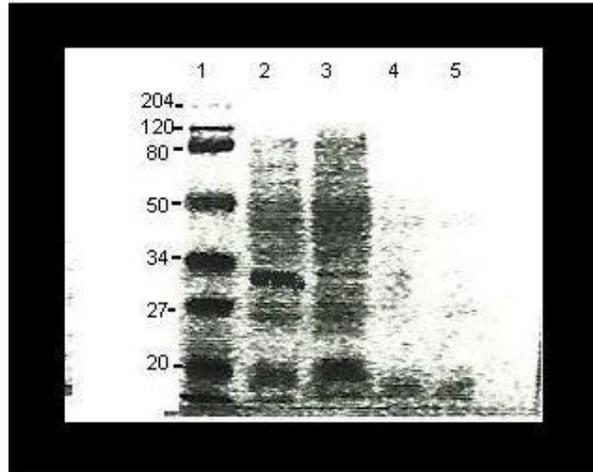
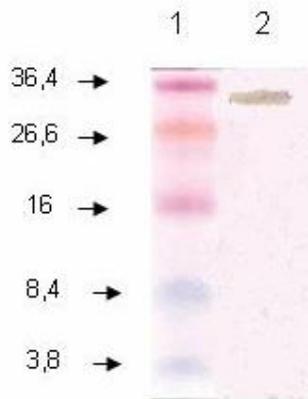
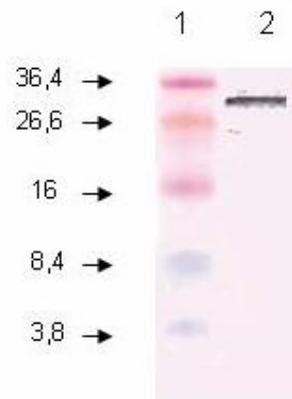


Figura IV-6. Evaluación de la expresión de la proteína recombinante. Corrida en gel SDS-PAGE 12 %. Calle 1: Marcador PM Calle 2: cultivo inducido 2 hs con IPTG Calle 3: Cultivo sin inducción Calle 4: BL21 pLys sin transformar inducida con IPTG Calle 5: BL21 Plys sin transformar, sin inducir.

Para corroborar que se trate de la proteína 85 B, se realizó un Western blot con suero policlonal de conejo anti 85B. y un suero monoclonal de ratón anti histidina. En la figura IV.7 y IV-8 se observa una banda de 30 kDa que es reconocida por ambos anticuerpos y que correspondería efectivamente a la proteína sobreexpresada 85B .



**Figura IV-7. Westernblot revelado con Suero monoclonal anti His.
Calle 1: Marcador PM (Bio.Rad 161.0325)
Calle 2: cultivo inducido 2 hs con IPTG**



**Figura IV-8. Western blot revelado con suero policlonal anti 85B
Calle 1: Marcador PM(Bio.Rad 161.0325)
Calle 2: cultivo inducido 2 hs con IPTG**

Con el fin de obtener una buena cantidad de proteína recombinante se pusieron a punto las condiciones de inducción. Se optimizó la cantidad de IPTG y el tiempo de inducción. La mayor cantidad de proteína fue hallada cuando se agregó IPTG a una concentración de 1 mM y después de dos horas de inducción (Figura IV-9, calle 5).



Figura IV-9. Puesta a punto de la condiciones de inducción de la proteína recombinante. Gel SDS-PAGE 12,5 % teñido con Coomassie-Blue. Calle1: cultivo control basal no inducido Calle 2: cultivo sin inducción 1 hora Calle 3: cultivo inducido con IPTG 1 h Calle 4: Cultivo sin inducción 2 horas Calle 5: cultivo inducido con IPTG 2 horas Calle 6: cultivo sin inducción toda la noche Calle 7: cultivo inducido con IPTG toda la noche. Calle 8 y 9: Marcador de Peso Molecular.

Purificación de la proteína:

Una muestra del pellet de un cultivo de 200 ml con inducción de 2 hs con IPTG 1mM fue disuelta en PBS y buffer de lisis para determinar la solubilidad de la proteína de interés. Después de la sonicación, los sobrenadantes y los pellets fueron analizados por SDS-PAGE. La banda proteica de interés fue observada en el pellet.

Con el objeto de solubilizar la proteína recombinante del pellet y facilitar su posterior purificación, se decidió agregarle urea 8M al buffer de lisis. El polipéptido se purificó mediante cromatografía de afinidad con quelatos metálicos níquel-ácido nitrilotriacético tal como se explicó en materiales y métodos.

Las fracciones eluídas obtenidas de la columna fueron analizadas en un SDS-PAGE al 12,5 % para visualizar la pureza de la proteína obtenida. La proteína fue visualizada en la fracción 6 eluída con Imidazol 250 mM y en las seis fracciones eluídas con Imidazol 500 mM. No fue visualizada en los tubos

conteniendo las eluciones con Imidazol 1000 mM (Figura IV-10). Las fracciones que contenían la proteína de interés fueron dializadas frente a PBS para eliminar el imidazol antes de ser utilizada en las pruebas en animales. La producción de proteína recombinante cuantificada por el método de Bradford fue de 4,5 µg/ml de cultivo.

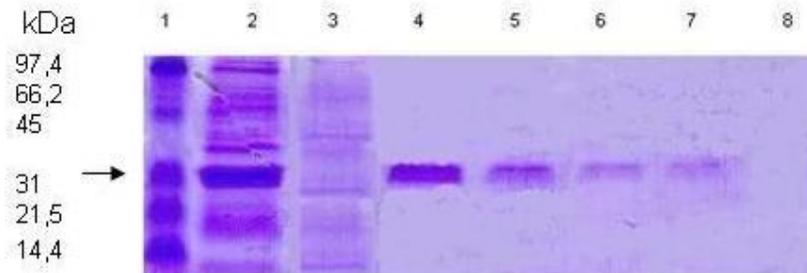


Figura IV-10. Purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad con quelatos metálicos Niquel ácido nitrilotriacético. Gel de poliacrilamida de 12,5 % teñido con Coomassie-Blue. Calle 1: Marcador de PM. Calle2: Pellet disuelto en buffer de extracción con urea 8M antes de pasar por la columna de purificación. Calle 3: lavado antes de eluir con imidazol. Calle 4: última fracción eluída con imidazol 250 mM. Calles 5 a 7: fracciones eluídas con imidazol 500 mM. Calle 8: fracciones eluídas con imidazol 1000 mM.

Ensayos de DTH en modelo animal: Pruebas cutáneas

El PPD RT-23, referencia de OMS desde 1960, ha sido extensamente estandarizado en cobayos y en el hombre mediante la PCT. El resultado se expresa en la medida de la induración producida (diámetro en mm del halo) por la inoculación intradérmica de una dosis de 20 UT/ml de PPD. Cuando esta induración es menor a 5 mm se considera “no reactivo”.

-Potencia relativa de PPD 1-94 frente a PPD RT-23

Para corroborar la bioequivalencia del PPD 1-94, en UT/ml, con respecto al producto de referencia PPD RT-23 se realizó una prueba de potencia relativa en animales previamente sensibilizados con *M.tuberculosis*.

El valor hallado fue 117,6 % (LI: 89,9 LS: 153,7) %. En forma gráfica se observa que idénticas dosis de ambos productos producen la misma respuesta (Figura IV-11).

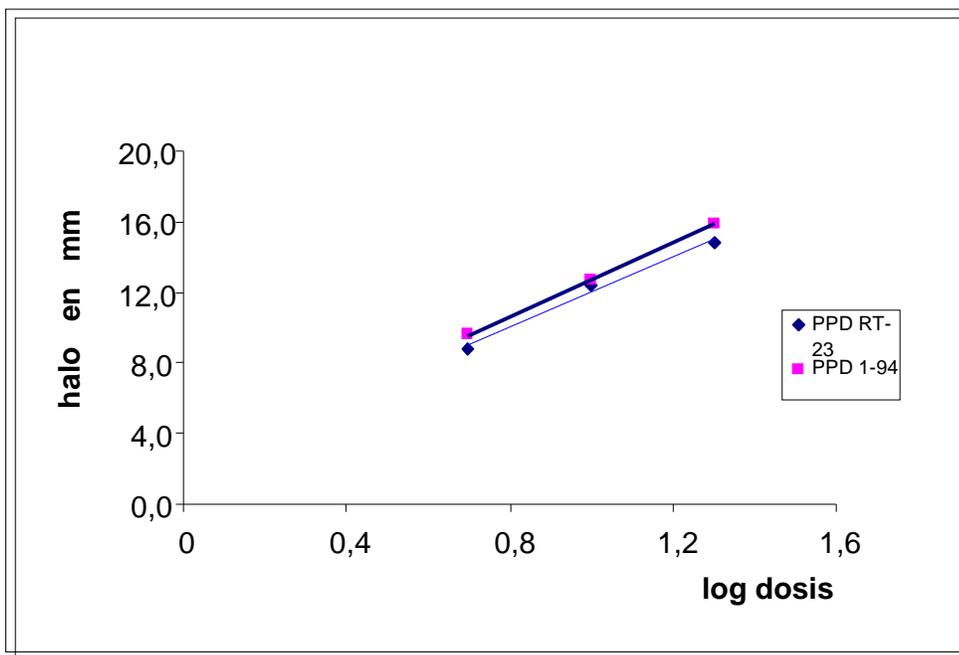


Figura IV-11. Potencia relativa de PPD 1-94 frente al PPD RT-23. La prueba cutánea fue realizada en 6 cobayos sensibilizados con *M.tuberculosis* según materiales y métodos. Los animales fueron desafiados con 3 diluciones seriadas de ambos PPDs (2; 1 y 0,5 UT/dosis). La potencia relativa del PPD 1-94 resultó 117,6% (LI: 89,9 LS: 153,7) % respecto del PPD RT-23 determinada por el modelo de líneas paralelas.

-Reactividad de los Antígenos recombinantes de *M.tuberculosis*

La actividad “tuberculínica” y la especificidad a *M.tuberculosis* de las cuatro proteínas recombinantes del complejo *M.tuberculosis* (tabla IV-1, Figura VI-12) fueron evaluadas usando tres grupos de cobayos sensibilizados de la siguiente forma:

Grupo 1: sensibilizado con *M.tuberculosis* muerto por calor + proteínas secretadas al medio de cultivo.

Grupo 2: sensibilizado con *M.avium* muerto + proteínas de secreción de cultivo.

Grupo 3: sensibilizados con 2×10^6 UFC de BCG cepa Pasteur 1173 P2.

En todas las pruebas se utilizaron cobayos sin sensibilización previa como control negativo del ensayo.

rAntígeno	Masa molecular kDa
ESAT-6	6
CFP-10	10
MPT 64	23
Ag 85 B	30

Tabla IV-1- rAgs utilizados en el ensayo y su masa molecular expresada en kDa.

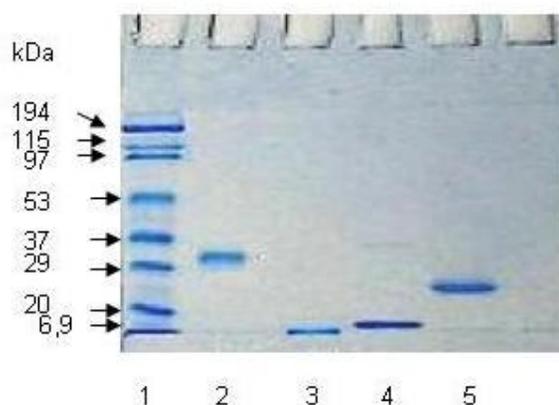


Figura IV-12- Corrida en SDS-PAGE 12,5 % de los rAgs utilizados en la prueba cutánea. Calle1: Marcador PM. Calle 2: Ag 85B. Calle 3: ESAT-6. Calle 4: CFP-10. Calle 5:MPT64

Para evaluar la sensibilización de los animales, cada grupo fue desafiado con los tres productos PPD de los distintos microorganismos (1-94, de BCG y de *M. avium*, estas dos últimas producidas según materiales y métodos) en una concentración de 0,03 ug/0,1 ml. Los valores promedios \pm sus D.S de los diámetros de induración hallados se resumen en la tabla IV-2 y son representados en la Figura IV-13.

	Diámetro (mm) de induración en cobayos sensibilizados con		
Tuberculina	<i>M. tuberculosis</i>	BCG	<i>M. avium</i>
<i>M. tuberculosis</i>	15,3 ± 1,3	11,7 ± 2,8	11,1 ± 1,1
BCG	10,7 ± 1,3	14,3 ± 1,6	9,5 ± 1,6
<i>M. avium</i>	8,1 ± 0,5	9,7 ± 1,1	13,4 ± 1,4

Tabla IV-2-Respuesta de DTH de las distintas tuberculinas desafiadas en los 3 grupos de animales (6 animales por grupo) sensibilizados con *M. tuberculosis*, BCG y *M. avium*.

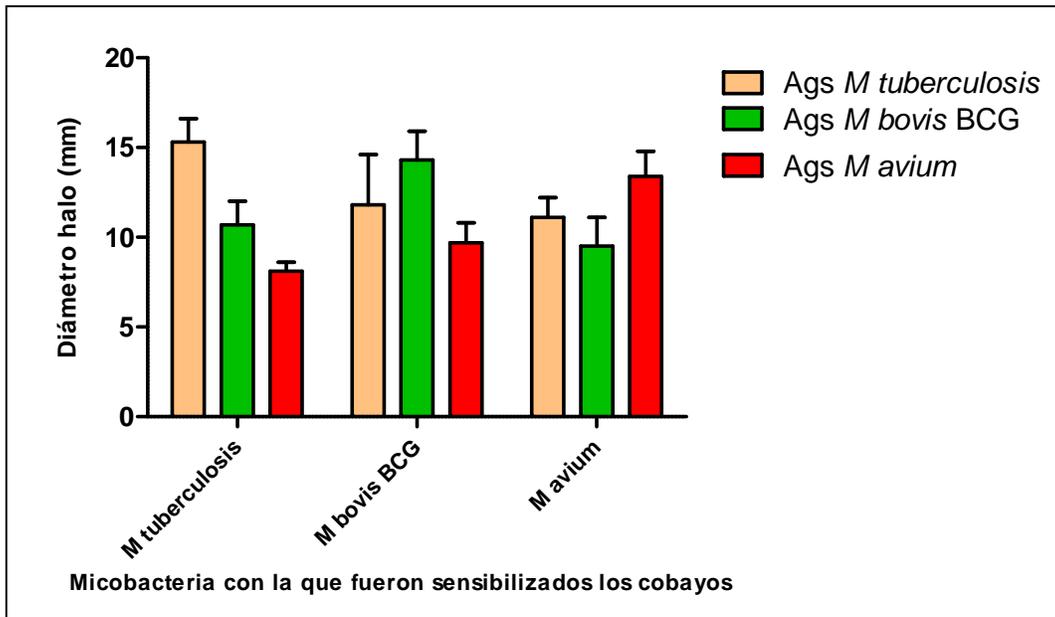


Figura IV-13- Medida de la reacción cutánea 24 hs después de la inyección i.d de 0,03 µg de PPD 1-94, PPD de BCG y PPD de *M. avium* en grupos de 3 animales sensibilizados con las distintas micobacterias descritas en materiales y métodos. Los datos están expresados como la media ± su DS de 3 cobayos por grupo inoculados en ambos flancos con cada dosis de PPD.

Las medidas de las reacciones cutáneas indicaron una sensibilización adecuada en los tres grupos.

Este dato es importante para evaluar los resultados de los antígenos recombinantes cuando son inoculados individualmente.

La DTH producida por cada antígeno fue comparada con la producida con el PPD 1-94 en todos los grupos de animales. Se tomó como medida de corte de la prueba 5 mm, siendo interpretado como “no reactivo” un valor menor y como “reactivo” uno superior.

La tabla IV-3 muestra los valores promedios de los halos hallados para cada antígeno en los distintos grupos de animales:

rAntígenos	<i>M.tuberculosis</i>	BCG	<i>M.avium</i>
CFP-10	6,8 ± 0,7	1,7 ± 1,4	1,1 ± 1,7
MPT- 64	8,8 ± 4,2	2,2 ± 1,5	3,2 ± 1,3
ESAT-6	10,2 ± 0,8	2,3 ± 2,0	2,0 ± 1,6
Ag 85 B	10,2 ± 0,8	11,8 ± 2,5	5,8 ± 0,3
PPD 1-94	10,4 ± 2,0	11,6 ± 1,0	7,3 ± 2,0

Tabla IV-3- Medias ± sus D.S del diámetro de halo producido por 1 µg de los distintos rAgs y 0,03 µg de PPD 1-94 (2 UT) en 6 cobayos por grupo sensibilizados con *M.tuberculosis*, BCG y *M.avium* según se describe en materiales y métodos.

Los valores en mm de los diámetros de induración producidos por 1 µg de cada antígeno y por 0,03 µg de PPD 1-94 (2 UT) en los 3 grupos de animales se muestran en la Figura IV-14; el valor promedio con sus correspondientes desvíos estándares se puede observar en la Figura IV-15.

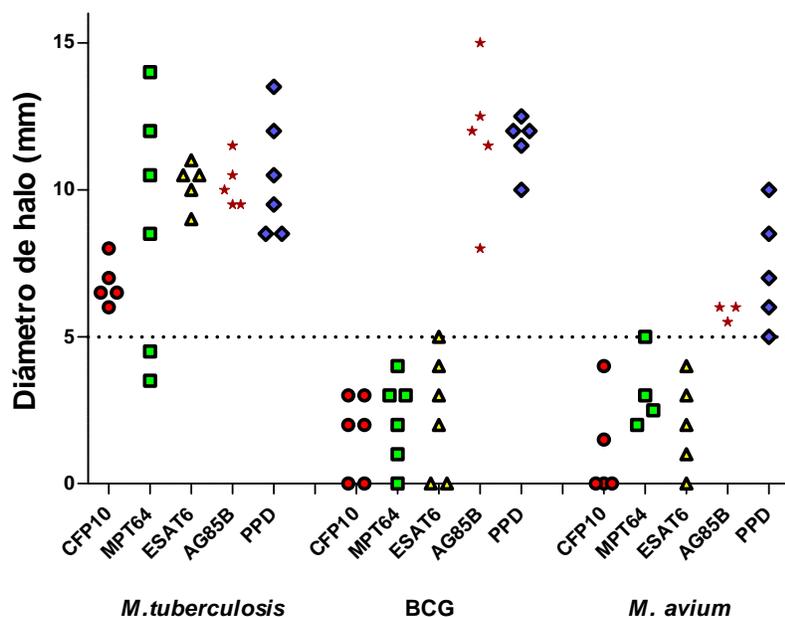


Figura IV-14 : Medidas de los diámetros de los halos producidos por 1 µg de los diferentes rAgs y 0,03 µg de PPD 1-94 (2 UT) en 6 cobayos por grupo sensibilizados con *M.tuberculosis*, BCG y *M.avium*

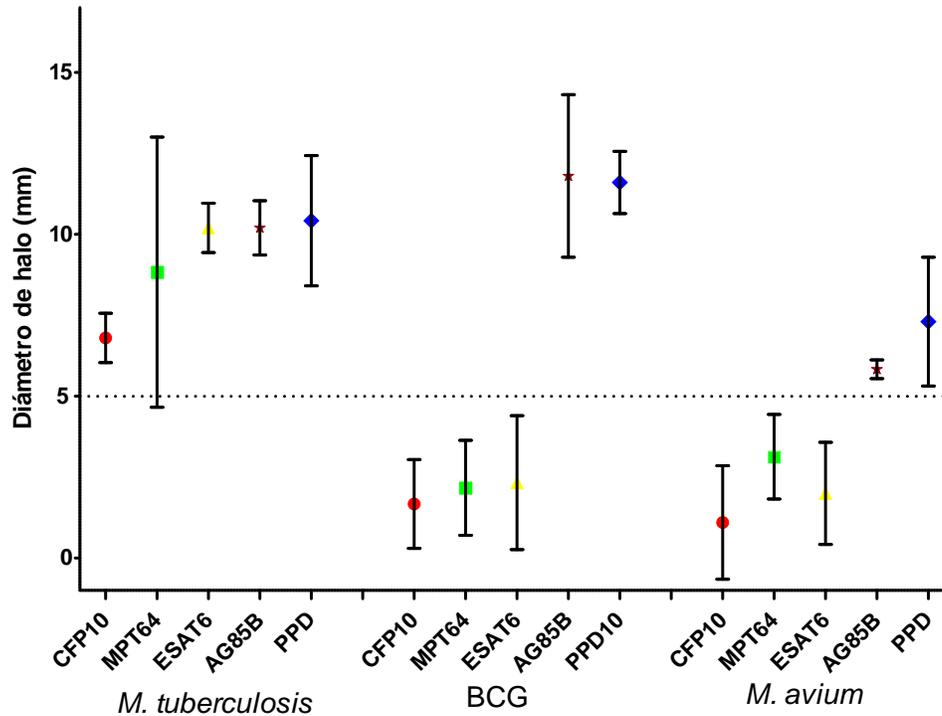


Figura IV-15: Representación del diámetro de halo promedio \pm su D.S de 1 μ g de rAgs. y 0,03 μ g de PPD 1-94 en 6 cobayos por grupo sensibilizados con *M.tuberculosis*, BCG y *M.avium*.

Los cuatro antígenos evaluados respondieron con una induración superior a 5 mm (reactivo) en el grupo de cobayos sensibilizados con *M.tuberculosis*, a diferencia de lo observado en los otros grupos de cobayos donde difiere de antígeno a antígeno.

85 B es reactivo en los tres grupos de cobayos, al igual que PPD 1-94, sin embargo ambos responden con halos más pequeños comparados con la respuesta obtenida con el PPD específico de cada especie (Tabla IV-2). Esto indicaría que PPD y 85 B no serían específicos para *M.tuberculosis* (Tabla IV-3).

En cambio, ESAT-6, CFP-10 y MPT64 presentan baja actividad (menor a 5 mm) en los grupos inmunizados con BCG y *M.avium*.

-Reactividad de una mezcla de Antígenos recombinantes frente al PPD 1-94

De acuerdo a los resultados obtenidos con los antígenos de forma individual se realizó una mezcla de los tres antígenos que presentaron especificidad para *M.tuberculosis* (ESAT-6, CFP 10 y MPT64). La misma fue evaluada en 3 concentraciones: dosis baja, media y alta (0,25; 0,5 y 1 µg) frente a 3 diluciones seriadas de PPD 1-94: dosis baja, media y alta (0,0075; 0,015 y 0,03, µg correspondientes a 0,5; 1 y 2 UT respectivamente) en los 3 grupos de animales sensibilizados.

Los tres grupos responden al PPD 1-94 de manera similar (Tablas IV.4, IV.5 y IV-6, Figuras IV-16, IV-17, IV-18), a diferencia de la mezcla de antígenos que solamente produce una reacción de DTH comparable (con diámetros de induración similares) al PPD en el grupo de animales sensibilizados con *M.tuberculosis*, mientras que en los animales sensibilizados con *M.avium* o BCG esto no ocurre.

Estos resultados muestran que esta mezcla de antígenos es específica para *M. tuberculosis* y que al igual que para el PPD mostró una respuesta lineal proporcional a la concentración de las dosis en un rango de 1 a 0,25 µg/dosis.

Producto	Dosis	Halo en mm					Promedio	D.S
		Cobayo 1	Cobayo 2	Cobayo 3	Cobayo 4	Cobayo 5		
PPD 1-94	1	5	10	10	8	8,5	8,3	1,83
	2	8	11	13	8,5	12	10,5	1,95
	3	10	13,5	14	12,5	10,5	12,1	1,59
Mezcla rAgs	1	5	7,5	8	8	5,5	6,8	1,29
	2	9	8,5	7	8	8,5	8,2	0,68
	3	11,5	12	11	14,5	9	11,6	1,77

Tabla IV.4: Medida de los halos en mm de las dosis baja, media y alta (1, 2 y 3 respectivamente) de PPD 1-94 y mezcla de rAgs ensayada en cobayos previamente sensibilizados con *M.tuberculosis*.

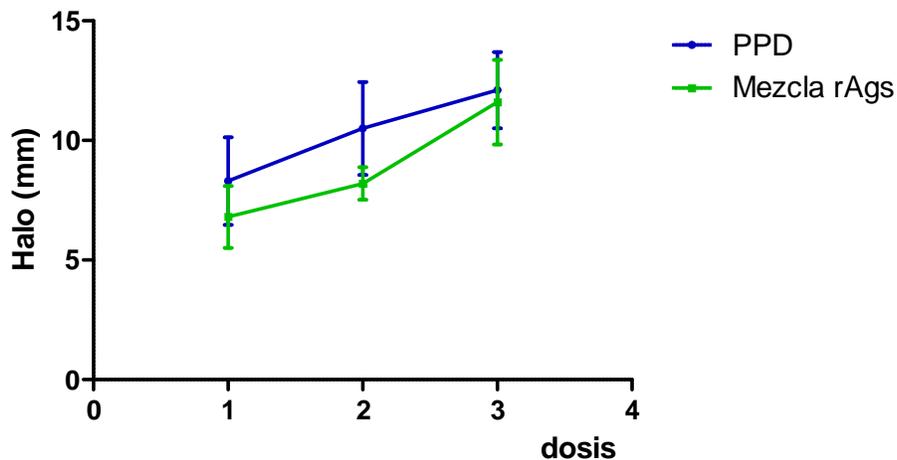


Figura IV-16: Respuesta de dosis crecientes de mezcla de rAgs. comparada con dosis crecientes de PPD 1-94 en cobayos sensibilizados con *M.tuberculosis*. 1, 2 y 3 corresponden a las dosis baja, media y alta respectivamente. Las reacciones cutáneas son expresadas como el promedio del halo \pm su D.S obtenido en un grupo de 6 animales. El valor de potencia relativa de los rAgs con respecto al PPD es 65,5 % (LI:42,5 LS: 101)

Producto	Dosis	Halo en mm					Promedio	D.S
		Cobayo1	Cobayo2	Cobayo3	Cobayo4	Cobayo5		
PPD 1-94	1	7,5	6,5	7	8	8,5	7,5	0,71
	2	8	8,5	7,5	8,5	8	8,1	0,37
	3	9	11	10,5	11	10,5	10,4	0,73
Mezcla rAgs	1	2	1	2	1,5	2,5	1,8	0,51
	2	3	2	2,5	1	2	2,1	0,66
	3	2	2	1	3	2	2	0,63

Tabla IV.5: Medida de los halos en mm de las dosis baja, media y alta (1, 2 y 3 respectivamente) de PPD 1-94 y mezcla de rAgs ensayada en cobayos previamente sensibilizados con BCG.

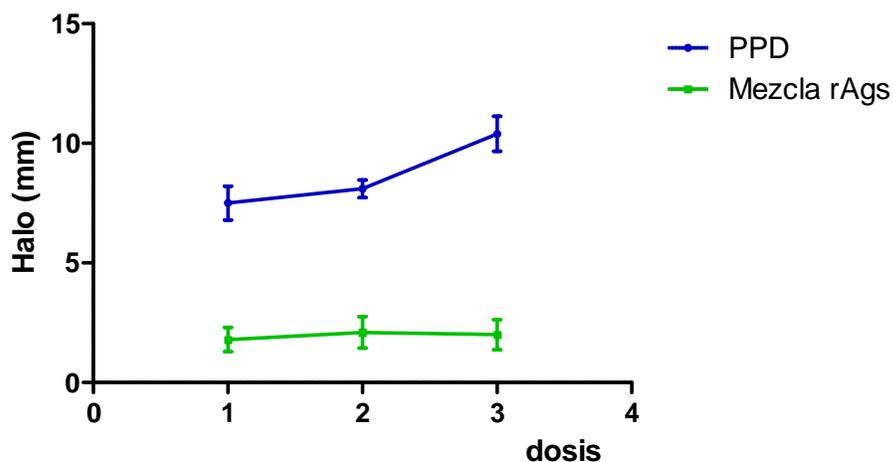


Figura IV-17: Respuesta cutánea de dosis crecientes de mezcla de rAgs. comparada con dosis crecientes de PPD 1-94 en grupo de 6 animales sensibilizados con BCG. Las reacciones cutáneas están expresadas como el promedio \pm su D.S de la medida en mm del halo observado.

Producto	Dosis	Halo en mm					Promedio	D.S
		Cobayo 1	Cobayo 2	Cobayo 3	Cobayo 4	Cobayo 5		
PPD 1-94	1	6,5	6	5	6,5	7	6,2	0,68
	2	7,5	7	6,5	7	8,5	7,3	0,68
	3	8,5	9,5	8,5	9	9	8,9	0,37
Mezcla rAgs	1	1,5	2,5	2	1	2,5	1,9	0,58
	2	2	1,5	1	2	2	1,7	0,40
	3	2,5	3	1,5	2	1,5	2,1	0,58

Tabla IV.6: Medida de los halos en mm de las dosis baja, media y alta (1, 2 y 3 respectivamente) de PPD 1-94 y mezcla de rAgs ensayada en cobayos previamente sensibilizados con *M.avium*

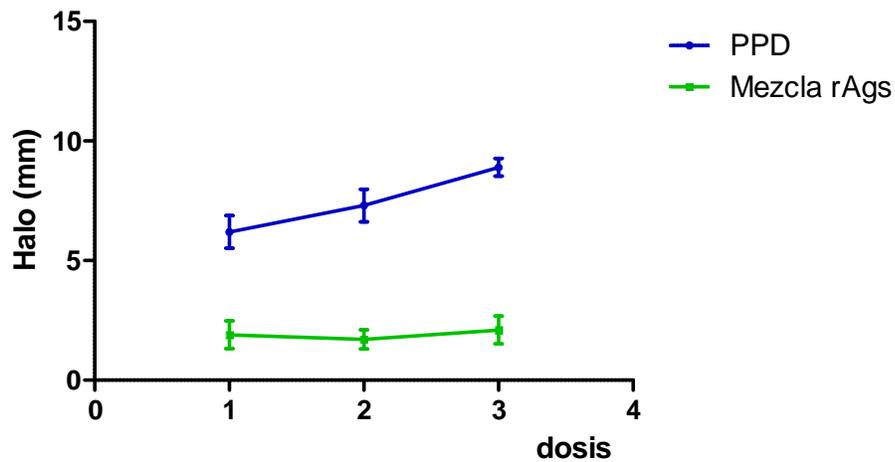


Figura IV-18: Respuesta de dosis crecientes de mezcla de rAgs. comparada con dosis crecientes de PPD 1-94 en grupo de 6 animales sensibilizados con *M.avium*. Las reacciones cutáneas están expresadas como el promedio \pm su D.S de la medida en mm del halo observado.

La PCT ha sido usada por casi 100 años como herramienta diagnóstica y epidemiológica para detectar casos de TB. El PPD utilizado como reactivo diagnóstico en esta prueba in vivo está compuesto por cientos de antígenos desnaturalizados predominantemente proteicos (Klausen et al. 1994; Borsuk et al. 2009) y contiene en menor proporción polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos (Harboe 1981). Seibert y Munday demostraron en 1932 que las proteínas eran el principio activo de las tuberculinas (Huebner et al. 1993).

La mayoría de los antígenos más inmunogénicos (Ag 85, ESAT-6, CFP-10, MPT70) fueron encontrados en el sobrenadante de cultivos del complejo *M.tuberculosis*. Andersen y colaboradores comprobaron que proteínas de secreción purificadas de cultivos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* menores a 10 kDa y en el intervalo de 25-33 kDa eran moléculas que inducían una fuerte respuesta inmune en animales (ratón y cobayo) infectados con *M.tuberculosis* (Andersen et al. 1993).

La identificación de regiones del genoma *M.tuberculosis* que no están presentes en BCG o en micobacterias no tuberculosas dieron la oportunidad del desarrollo de nuevos reactivos de diagnóstico más específicos. Una gran variedad de antígenos han sido usados, tanto en pruebas serológicas como de DTH, intentando reemplazar esta prueba, pero solamente los IGRAs (Ensayos de producción de Interferón gamma) han sido aprobados hasta ahora. Aunque estas pruebas parecen ser más sensibles y específicas, su costo elevado no permite un uso masivo, sobre todo en países como el nuestro.

Para realizar este estudio comparativo con el PPD 1-94 de producción nacional se han elegido cuatro antígenos recombinantes (ESAT-6, CFP-10, MPT64 y Ag 85B) que han sido ampliamente estudiados por su capacidad inmunogénica, y han demostrado inducir respuesta de DTH en cobayos previamente sensibilizados con *M.tuberculosis* vivo o muerto o con BCG (Oettinger et al. 1997; Elhay et al. 1998; Lyashchenko et al. 1998; van Pinxteren et al. 2000; Weldingh et al. 2008; Kalra et al. 2010b). Dos de ellos: ESAT-6 y CFP-10, productos de dos genes localizados en la región RD1, si bien no son exclusivos de *M.tuberculosis*, están ausentes en todas las subcepas de BCG y en la

mayoría de las micobacterias ambientales, y son utilizados en las pruebas “ex vivo” (IGRAs) (Pai et al. 2008). MPT64, producto del gen Rv 1980c, localizado en la región RD2 del genoma de *M.tuberculosis*, está ausente en la mayoría de las subcepas de BCG (excepto en BCG Tokio, Moreau y Rusa). Este antígeno ha sido propuesto como principio activo de una prueba cutánea con parches (Nakamura et al. 2001). Por último el Ag 85B, un integrante del complejo 85 que son las proteínas secretadas más abundantes en los sobrenadantes de cultivos (Nagai et al. 1991).

Para determinar la dosis de rAgs (μg) que produjeran una respuesta de DTH concordante con la producida por 2 UT de PPD 1-94 en el desafío del modelo animal se inoculó una serie de diluciones de los mismos (datos no mostrados). Se encontró que la dosis de 1 μg de rAg producía una reacción cutánea del orden a la producida por el PPD (0,03 $\mu\text{g}/\text{dosis} = 2 \text{ UT}$). Los resultados de DTH obtenidos así con los rAgs individuales presentaron una sensibilidad similar al PPD 1-94 (reacción superior a 5 mm) en los animales sensibilizados con *M.tuberculosis*, que resultan comparables con los datos publicados de comparación de rAgs de *M.tuberculosis* con PPD RT-23 (Elhay et al. 1998) o PPD-S (Lyashchenko et al. 1998).

Existen discrepancias en la bibliografía en cuanto a la cantidad (μg) de rAg utilizada para los estudios de DTH en cobayos. Haga (Haga et al. 1995) o Aggerbeck (Aggerbeck et al. 2006) utilizaron cantidades ínfimas, entre 0.01 y 0,2 μg (similar a la dosis de PPD) mientras que Hanif (Hanif et al. 2010) y Lyashchenko (Lyashchenko et al. 1998) emplean 1 μg y 2 μg por rAg respectivamente. Estas diferencias pueden deberse al tipo de sensibilización (*M.tuberculosis* o BCG vivo o muerto) y/o la vía utilizada (i.v. o intramuscular) de los animales utilizados para las pruebas inmunológicas.

El PPD 1-94 no es un reactivo específico para *M.tuberculosis* (reacción positiva en los tres grupos de animales: halos superiores a 5 mm), en cambio ESAT-6 y CFP-10 resultan específicos para *M.tuberculosis* (halos superiores a 5 mm), no dando respuesta positiva (halo menor o igual a 5 mm) en animales sensibilizados con *M.avium* y BCG. Esto concuerda con los datos publicados por van Pinxteren y Hanif (van Pinxteren et al. 2000; Hanif et al. 2010).

MPT64 resulta también específico para *M.tuberculosis* en este estudio dado que la cepa de BCG utilizada para la sensibilización previa de los cobayos es la cepa Pasteur 1173P2 (cepa vacunal utilizada en la producción en nuestro país), que tiene deleteada la región RD2. Elhay y colaboradores también obtienen una respuesta específica a *M. tuberculosis* para MPT64 utilizando cobayos sensibilizados con BCG Danesa 1331, a diferencia de los resultados de Oettinger y colaboradores (Oettinger et al. 1997) que utilizan además de ésta última subcepa de BCG , la BCG Tokio que no tienen deleteada esta región.

El Ag 85B presenta una reacción de la misma magnitud que el PPD en los cobayos sensibilizados con *M.tuberculosis*, *M.avium* y BCG: Estos últimos concuerdan con los obtenidos por Lyashchenko y colaboradores. (Lyashchenko et al. 1998).

El PPD contiene cientos de antígenos desnaturalizados (epitopes) esto explicaría la sensibilidad del reactivo. Para producir una reacción concordante con la reacción obtenida con 2 UT del PPD 1-94 con los rAgs es necesario una cantidad de proteína 33 veces mayor que la del PPD (1 µg de rAgs vs 0,03 µg de PPD 1-94).

De acuerdo a los resultados obtenidos con los rAgs individualmente se decidió hacer una mezcla de los 3 rAgs que resultaron específicos para *M. tuberculosis* en una concentración idéntica a la ensayada para cada uno en particular (1 µg por dosis de 0,1 ml). 1 µg de la mezcla de rAgs tiende a dar como resultado un halo en mm superior al máximo producido por un rAg simple (mezcla rAgs: 11,6 mm tabla IV-4, ESAT-6: 10,2 mm tabla IV-3). El aumento de la respuesta de la mezcla de rAgs, podría deberse a un mayor número de epitopes presentados.

Con la mezcla de rAgs producidos en este trabajo se logra mantener la especificidad al *M.tuberculosis*, aunque a expensas de la pérdida de sensibilidad, dado que para obtener un resultado concordante con el PPD es preciso aumentar considerablemente la concentración proteica.

Al igual que el PPD 1-94 la respuesta aumenta a medida con el logaritmo de la dosis. Utilizando los datos obtenidos de comparar la mezcla de rAgs con el PPD 1-94 en cobayos sensibilizados con *M.tuberculosis* se calculó la potencia

relativa obteniéndose un valor del 65,5 % (LI: 42,5 LS: 101) % con respecto a ese producto.

La potencia del PPD es dependiente de la distribución de las moléculas de tuberculoproteínas de distinto peso molecular, ya que todas no son igualmente inmunogénicas (Landi et al. 1975). La variación en la cantidad y calidad de estas proteínas de un lote a otro, complican su estandarización y hacen que su potencia sea diferente a igual concentración proteica. En vista de que resulta difícil una estandarización química de los preparados comerciales de PPD, la OMS recomienda una estandarización biológica mediante la comparación de los distintos preparados con un patrón (estándar) de esa organización.

Nuestro Servicio produce tuberculina PPD 2UT a partir del lote PPD 1-94 2 mg/ml, producido en 1994 (Convenio OPS, ANLIS ex Instituto Dr. Carlos G. Malbrán y el Laboratorio Central de Salud Pública de La Plata), que ha sido extensamente estandarizado en animales frente a la tuberculina PPD RT-23 referencia de OMS.

El PPD 1-94 fue producido en nuestro país para suplir la falta de suministro de PPD RT-23 por parte del SSI. La cantidad de proteína obtenida a partir de 43 litros de medio de cultivo fue de 6000 mg (140 µg de proteínas por ml de medio). En términos de potencia relativa presentó una actividad de 70.000 UT/mg de proteína (Potencia relativa del PPD 1-94: 140 % (LI: 120,8 LS168 %, última valoración realizada por el CNCCB de A.N.L.I.S en 2010) con respecto al estándar PPD RT-23. De esta manera se estableció que una dosis de PPD 1-94 (2UT) es de 0,03 µg de proteína, siendo el rendimiento en términos de dosis de 4666 dosis por ml de medio de cultivo.

Comparando estos resultados con los obtenidos en la producción de rAg 85B en el presente trabajo (4,5 µg de proteína /ml de cultivo; 1 dosis= 1 µg) se observó un rendimiento en dosis aproximadamente 1000 veces menor.

Para salvar estas diferencias sería necesario diseñar y optimizar un sistema de producción a gran escala de recombinantes, tal como propone Geisbrecht y colaboradores para la obtención del recombinante MPT64 (Geisbrecht et al. 2006), dado que los requerimientos de reactivo para pruebas cutáneas (cerca de 2.000.000 dosis anuales para todo el país) no es compatible con la

purificación de las proteínas nativas de las células de *M.tuberculosis*. También otros rAgs específicos, tal como la proteína derivada del gen Rv3619c (localizado en la región RD9) propuesta por Hanif y colaboradores, podrían ser agregados a la mezcla (Hanif et al. 2010) para que esta mantuviera la especificidad a *M.tuberculosis*. De esta manera utilizando mayor cantidad de rAgs, tal vez se podría disminuir la concentración proteica de la dosis (presentación de más epitopes) tal como sugiere Lyashchenko y colaboradores con la utilización de un cóctel de rAgs (Lyashchenko et al. 1998).

Es posible que en los próximos 10 años en los países desarrollados la PCT sea totalmente remplazada por las pruebas ex vivo (IGRAs). Sin embargo en muchas partes del mundo no hay disponibles laboratorios con las instalaciones requeridas para realizar este tipo de pruebas. Es por esto que en los países no desarrollados o en vías de desarrollo la PCT resulta sencilla y de bajo costo económico. Además de esta PCT, un procedimiento de “baja tecnología” que puede ser realizada por personal de salud entrenado, hay una gran experiencia ya que fue estandarizada por la OMS desde 1951.

Ya existen algunos antecedentes de utilización de PPD recombinantes en humanos con resultados prometedores: Campos-Neto y colaboradores han evaluado un PPD recombinante en humanos, en un estudio de 26 pacientes con TB y 25 personas sanas con PPD negativo (Campos-Neto et al. 2001). El SSI ha producido dos reactivos recombinantes bajo normas de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) para utilización en pruebas de Mantoux : un dímero de ESAT-6 (Aggerbeck et al. 2006) y CFP-10 . Ambos han sido estudiados en ensayos clínicos pilotos recientemente (Arend et al. 2008; Bergstedt et al. 2010), pero aún no se producen como reactivos para uso masivo.

La introducción de esta técnica molecular en nuestro laboratorio nos permitiría en un futuro producir un reactivo de antígenos recombinantes que pueda reemplazar al PPD.

VI-CONCLUSIONES

- ❖ ESAT-6, CFP -10 y MPT64 podrían ser candidatos para el desarrollo de nuevas tuberculinas más específicas que permita la diferenciación de individuos infectados con *M.tuberculosis*, de individuos infectados con otras micobacterias o vacunados con BCG.

- ❖ La utilización de antígenos simples aumenta la especificidad pero disminuye la sensibilidad, dado que se necesita mayor cantidad de proteína para obtener la misma respuesta, por lo que la formulación de una mezcla de antígenos específicos serían óptimos para el inmunodiagnóstico en humanos.

- ❖ El uso de antígenos recombinantes purificados permitiría también estandarizar la producción y el control de calidad de los reactivos utilizados para los tests cutáneos.

VII-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggerbeck, H. and S. M. Madsen (2006). "Safety of ESAT-6." Tuberculosis (Edinb) **86**: 363-373.
- Ahmad, S. (2011). "Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection." Clin Dev Immunol **2011**: 814943.
- Amicosante, M., M. Ciccozzi and R. Markova (2010). "Rational use of immunodiagnostic tools for tuberculosis infection: guidelines and cost effectiveness studies." New Microbiol **33**(2): 93-107.
- Andersen, P., A. B. Andersen, A. L. Sorensen and S. Nagai (1995). "Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice." J Immunol **154**(7): 3359-3372.
- Andersen, P. and L. Heron (1993). "Specificity of a protective memory response against *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Immun **61**: 841-851.
- Andersen, P., M. E. Munk, J. M. Pollock and T. M. Doherty (2000). "Specific immune-based diagnosis of tuberculosis." Lancet **356**(9235): 1099-1104.
- Arend, S. M., P. Andersen, K. E. van Meijgaarden, R. L. Skjot, Y. W. Subronto, J. T. van Dissel and T. H. Ottenhoff (2000). "Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10." J Infect Dis **181**(5): 1850-1854.
- Arend, S. M., W. P. Franken, H. Aggerbeck, C. Prins, J. T. van Dissel, B. Thierry-Carstensen, P. N. Tingskov, K. Weldingh and P. Andersen (2008). "Double-blind randomized Phase I study comparing rdESAT-6 to tuberculin as skin test reagent in the diagnosis of tuberculosis infection." Tuberculosis (Edinb) **88**(3): 249-261.
- Bass, J. B., Jr. (1993). "The tuberculin skin test." In: L.B. Reichmann and E.S.Hershfield(ed), Tuberculosis. A comprehensive international approach. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.: 139-148.
- Bass, J. B., Jr. (2001). "The tuberculin skin test." In: Field, M.J,ed. Tuberculosis in the Workplace. Washington, DC: National Academies Press: 179-188.
- Bass, J. B., Jr. (2003). "How good is the tuberculin skin test?" Infect Control Hosp Epidemiol **24**(11): 797-798.
- Behr, M. A. and P. M. Small (1999a). "A historical and molecular phylogeny of BCG strains." Vaccine **17**(7-8): 915-922.
- Behr, M. A., M. A. Wilson, W. P. Gill, H. Salamon, G. K. Schoolnik, S. Rane and P. M. Small (1999b). "Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray." Science **284**(5419): 1520-1523.
- Bergstedt, W., P. N. Tingskov, B. Thierry-Carstensen, S. T. Hoff, H. Aggerbeck, V. O. Thomsen, P. Andersen and A. B. Andersen (2010). "First-in-man open clinical trial of a combined rdESAT-6 and rCFP-10 tuberculosis specific skin test reagent." PLoS One **5**(6): e11277.
- Boon, C. and T. Dick (2002). "*Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy." J Bacteriol **184**(24): 6760-6767.

- Borsuk, S., J. Newcombe, T. A. Mendum, O. A. Dellagostin and J. McFadden (2009). "Identification of proteins from tuberculin purified protein derivative (PPD) by LC-MS/MS." Tuberculosis (Edinb) **89**(6): 423-430.
- Brock, I., M. E. Munk, A. Kok-Jensen and P. Andersen (2001). "Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10." Int J Tuberc Lung Dis **5**(5): 462-467.
- Brock, I., K. Weldingh, E. M. Leyten, S. M. Arend, P. Ravn and P. Andersen (2004). "Specific T-cell epitopes for immunoassay-based diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection." J Clin Microbiol **42**(6): 2379-2387.
- Brosch, R., S. V. Gordon, A. Billault, T. Garnier, K. Eiglmeier, C. Soravito, B. G. Barrell and S. T. Cole (1998). "Use of a Mycobacterium tuberculosis H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics." Infect Immun **66**(5): 2221-2229.
- Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen and S. T. Cole (2002). "A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3684-3689.
- Caminero, J. (2007). "[The old battle between the human species and Koch's bacillae. Can one dream of eradicating tuberculosis?]." An Sist Sanit Navar **30 Suppl 2**: 163-180.
- Caminero, J. A. (2003). "Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas." Internacional Union Against Tuberculosis and Lung Disease. París.
- Campos-Neto, A., V. Rodrigues-Junior, D. B. Pedral-Sampaio, E. M. Netto, P. J. Owendale, R. N. Coler, Y. A. Skeiky, R. Badaro and S. G. Reed (2001). "Evaluation of DPPD, a single recombinant Mycobacterium tuberculosis protein as an alternative antigen for the Mantoux test." Tuberculosis (Edinb) **81**(5-6): 353-358.
- Camus, J. C., M. J. Pryor, C. Medigue and S. T. Cole (2002). "Re-annotation of the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv." Microbiology **148**(Pt 10): 2967-2973.
- Cardona, P. J. (2006). "[Robert Koch was right. Towards a new interpretation of tuberculin therapy]." Enferm Infecc Microbiol Clin **24**(6): 385-391.
- Colditz, G. A., T. F. Brewer, C. S. Berkey, M. E. Wilson, E. Burdick, H. V. Fineberg and F. Mosteller (1994). "Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature." JAMA **271**(9): 698-702.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead and B. G. Barrell (1998). "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence." Nature **393**(6685): 537-544.
- Collins, H. L. and S. H. Kaufmann (2001). "The many faces of host responses to tuberculosis." Immunology **103**(1): 1-9.

- Comstock, G. W., L. B. Edwards, R. N. Philip and W. A. Winn (1964). "A comparison in the United States of America of two Tuberculins, PPD-S and RT 23." Bull World Health Organ **31**: 161-170.
- Connell, T. G., N. Ritz, G. A. Paxton, J. P. Buttery, N. Curtis and S. C. Ranganathan (2008). "A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children." PLoS One **3**(7): e2624.
- Consenso.Sociedad.Argentina.de.Pediatría (2002). "Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil." Archivos Argentinos de Pediatría **100**(2): 159-178.
- Chan, J. and J. Flynn (2004). "The immunological aspects of latency in tuberculosis." Clin Immunol **110**(1): 2-12.
- Daniel, T. M. and B. W. Janicki (1978). "Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties." Microbiol Rev **42**(1): 84-113.
- Dayal, R., A. Singh, V. M. Katoch, B. Joshi, D. S. Chauhan, P. Singh, G. Kumar and V. D. Sharma (2008). "Serological diagnosis of tuberculosis." Indian J Pediatr **75**(12): 1219-1221.
- de Kantor, I. N. (1980). Preparación y estandarización de Tuberculinas PPD. C. P. d. Zoonosis. Buenos Aires, Organización Mundial de la Salud. **Nota técnica Nº17**: 1-28.
- de Kantor, I. N. and V. Ritacco (2009). "[Is the tuberculin skin test still suitable to diagnose tuberculosis infection?]." Medicina (B Aires) **69**(3): 359-369.
- Dominguez, J. and J. Ruiz-Manzano (2006). "[The tuberculin skin test: time for a change?]." Arch Bronconeumol **42**(2): 47-48.
- Edwards, P. Q. and L. B. Edwards (1960). "Story of the tuberculin test from an epidemiologic viewpoint." Am Rev Respir Dis **81**(1)Pt 2: 1-47.
- Elhay, M. J., T. Oettinger and P. Andersen (1998). "Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig." Infect Immun **66**: 3454-3456.
- Ellner, J. J. (1997). "Review: the immune response in human tuberculosis--implications for tuberculosis control." J Infect Dis **176**(5): 1351-1359.
- Farmacopea.de.los.Estados.Unidos.Mexicanos. (1994). "Estadística para ensayos biológicos." **Sexta Edición**(1636): 1522-1624
- Flynn, J. L. and J. Chan (2001). "Immunology of tuberculosis." Annu Rev Immunol **19**: 93-129.
- García, L. F. and L. F. Barrera (2004). "Perspectivas para nuevas vacunas antituberculosas en la era posgenómica." Biomédica **24**(Supl): 228-238.
- García, M. (2009). "La inmunidad antituberculosa y su aplicación en el desarrollo de candidatos vacunales." VacciMonitor Año **18**(1): 25-34.
- Gay Ducati, R., A. Ruffino-Netto, L. A. Basso and D. S. Santos (2006). "The resumption of consumption-A review on tuberculosis." Mem Inst Oswaldo Cruz **101** (7): 697-714.
- Geisbrecht, B. V., B. Nikonenko, R. Samala, R. Nakamura, C. A. Nancy and K. A. Sacksteder (2006). "Design and optimization of a recombinant system for large-scale production of the MPT64 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*." Protein Expr Purif **46**(1): 64-72.

- Glatman-Freedman, A. (2006). "The role of antibody-mediated immunity in defense against *Mycobacterium tuberculosis*: advances toward a novel vaccine strategy." Tuberculosis (Edinb) **86**(3-4): 191-197.
- Glickman, M. S. and W. R. Jacobs, Jr. (2001). "Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline." Cell **104**(4): 477-485.
- Gonzalez-Martin, J., J. M. Garcia-Garcia, L. Anibarro, R. Vidal, J. Esteban, R. Blanquer, S. Moreno and J. Ruiz-Manzano (2010). "[Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis]." Arch Bronconeumol **46**(5): 255-274.
- Gordon, S. V., R. Brosch, A. Billault, T. Garnier, K. Eiglmeier and S. T. Cole (1999). "Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays." Mol Microbiol **32**(3): 643-655.
- Gradmann, C. (2001). "Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin." Med Hist **45**(1): 1-32.
- Guld, J., M. W. Bentzon, M. A. Bleiker, W. A. Griep, M. Magnusson and H. Waaler (1958). "Standardization of a new batch of purified tuberculin (PPD) intended for international use." Bull World Health Organ **19**(5): 845-951.
- Gutierrez, M. C., S. Brisse, R. Brosch, M. Fabre, B. Omais, M. Marmiesse, P. Supply and V. Vincent (2005). "Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*." PLoS Pathog **1**(1): e5.
- Haga, S., R. Yamaguchi, S. Nagai, K. Matsuo, A. Yamazaki and R. Nakamura (1995). "Delayed-type hypersensitivity to a recombinant mycobacterial antigen, MPB64, in guinea pigs sensitized to *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium bovis* BCG." Journal of Leukocyte Biology **57**: 221-225.
- Hanif, S. N., R. Al-Attayah and A. S. Mustafa (2010). "Species-specific antigenic *Mycobacterium tuberculosis* proteins tested by delayed-type hypersensitivity response." Int J Tuberc Lung Dis **14**(4): 489-494.
- Harboe, M. (1981). "Antigens of PPD, old tuberculin, and autoclaved *Mycobacterium bovis* BCG studied by crossed immunoelectrophoresis." Am Rev Respir Dis **124**(1): 80-87.
- Haslov, K., A. Andersen, S. Nagai, A. Gottschau, T. Sorensen and P. Andersen (1995). "Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Immun **63**(3): 804-810.
- Hsu, T., S. M. Hingley-Wilson, B. Chen, M. Chen, A. Z. Dai, P. M. Morin, C. B. Marks, J. Padiyar, C. Goulding, M. Gingery, D. Eisenberg, R. G. Russell, S. C. Derrick, F. M. Collins, S. L. Morris, C. H. King and W. R. Jacobs, Jr. (2003). "The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12420-12425.
- Huebner, R. E., M. F. Schein and J. B. Bass, Jr. (1993). "The tuberculin skin test." Clin Infect Dis **17**(6): 968-975.
- Johnson, C. M., A. M. Cooper, A. A. Frank, C. B. Bonorino, L. J. Wysoki and I. M. Orme (1997). "*Mycobacterium tuberculosis* aerogenic rechallenge infections in B cell-deficient mice." Tuber Lung Dis **78**(5-6): 257-261.
- Kalra, M., G. K. Khuller, A. Grover, D. Behera, A. Wanchu and I. Verma (2010a). "Utility of a combination of RD1 and RD2 antigens as a

- diagnostic marker for tuberculosis." Diagn Microbiol Infect Dis **66**(2): 153-161.
- Kalra, M., G. K. Khuller, J. A. Sheikh and I. Verma (2010b). "Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* specific RD antigens for delayed type hypersensitivity responses in guinea pig." Indian Journal of Experimental Biology **48**: 117-123.
- Kashyap, R. S., A. N. Rajan, S. S. Ramteke, V. S. Agrawal, S. S. Kelkar, H. J. Purohit, G. M. Taori and H. F. Dagainawala (2007). "Diagnosis of tuberculosis in an Indian population by an indirect ELISA protocol based on detection of Antigen 85 complex: a prospective cohort study." BMC Infect Dis **7**: 74.
- Kashyap, R. S., S. M. Saha, K. J. Nagdev, S. S. Kelkar, H. J. Purohit, G. M. Taori and H. F. Dagainawala (2010). "Diagnostic markers for tuberculosis ascites: a preliminary study." Biomark Insights **5**: 87-94.
- Kaufmann, S. H. (2001). "How can immunology contribute to the control of tuberculosis?" Nat Rev Immunol **1**(1): 20-30.
- Kaufmann, S. H. (2004). "New issues in tuberculosis." Ann Rheum Dis **63 Suppl 2**: ii50-ii56.
- Kaufmann, S. H. (2005). "Robert Koch, the Nobel Prize, and the ongoing threat of tuberculosis." N Engl J Med **353**(23): 2423-2426.
- Kaufmann, S. H. and A. J. McMichael (2005a). "Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis." Nat Med **11**(4 Suppl): S33-44.
- Kaufmann, S. H. and U. E. Schaible (2005b). "100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus." Trends Microbiol **13**(10): 469-475.
- Klausen, J., M. Magnusson, A. B. Andersen and C. Koch (1994). "Characterization of purified protein derivative of tuberculin by use of monoclonal antibodies: isolation of a delayed-type hypersensitivity reactive component from *M. tuberculosis* culture filtrate." Scand J Immunol **40**(3): 345-349.
- Kobashi, Y., H. Shimizu, Y. Ohue, K. Mouri, Y. Obase, N. Miyashita and M. Oka (2010). "Comparison of T-cell interferon-gamma release assays for *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in patients with active and latent tuberculosis." Lung **188**(4): 283-287.
- Kumar, V. G., T. A. Urs and R. R. Ranganath (2011). "MPT 64 Antigen detection for Rapid confirmation of *M. tuberculosis* isolates." BMC Res Notes **4**: 79.
- Landi, S., H. Held and G. K.C. (1975). "The multi-facets of tuberculin standardization." Dev. Biol. Stand. **29**: 393-411.
- Lee, E. and R. S. Holzman (2002). "Evolution and current use of the tuberculin test." Clin Infect Dis **34**(3): 365-370.
- Lewinsohn, D. M., J. E. Grotzke, A. S. Heinzl, L. Zhu, P. J. Owendale, M. Johnson and M. R. Alderson (2006). "Secreted proteins from *Mycobacterium tuberculosis* gain access to the cytosolic MHC class-I antigen-processing pathway." J Immunol **177**(1): 437-442.
- Lewis, K. N., R. Liao, K. M. Guinn, M. J. Hickey, S. Smith, M. A. Behr and D. R. Sherman (2003). "Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation." J Infect Dis **187**(1): 117-123.

- LoBue, P. A., D. A. Enarson and T. C. Thoen (2010). "Tuberculosis in humans and its epidemiology, diagnosis and treatment in the United States." Int J Tuberc Lung Dis **14**(10): 1226-1232.
- Lyashchenko, K., C. Manca, R. Colangeli, A. Heijbel, A. Williams and M. L. Gennaro (1998). "Use of Mycobacterium tuberculosis complex-specific antigen cocktails for a skin test specific for tuberculosis." Infect Immun **66**(8): 3606-3610.
- Mack, U., G. B. Migliori, M. Sester, H. L. Rieder, S. Ehlers, D. Goletti, A. Bossink, K. Magdorf, C. Holscher, B. Kampmann, S. M. Arend, A. Detjen, G. Bothamley, J. P. Zellweger, H. Milburn, R. Diel, P. Ravn, F. Cobelens, P. J. Cardona, B. Kan, I. Solovic, R. Duarte and D. M. Cirillo (2009). "LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement." Eur Respir J **33**(5): 956-973.
- Mackness, G. B. (1964). "The immunological basis of acquired cellular resistance." J Exp Med **120**: 105-120.
- Magnusson, M. and M. W. Bentzon (1958). "Preparation of purified tuberculin RT 23." Bull World Health Organ **19**(5): 829-843.
- Mahairas, G. G., P. J. Sabo, M. J. Hickey, D. C. Singh and C. K. Stover (1996). "Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis." J Bacteriol **178**(5): 1274-1282.
- Malaga, W., P. Constant, D. Euphrasie, A. Cataldi, M. Daffe, J. M. Reytrat and C. Guilhot (2008). "Deciphering the genetic bases of the structural diversity of phenolic glycolipids in strains of the Mycobacterium tuberculosis complex." J Biol Chem **283**(22): 15177-15184.
- Manca, C., K. Lyashchenko, R. Colangeli and M. L. Gennaro (1997a). "MTC28, a novel 28-kilodalton proline-rich secreted antigen specific for the Mycobacterium tuberculosis complex." Infect Immun **65**(12): 4951-4957.
- Manca, C., K. Lyashchenko, H. G. Wiker, D. Usai, R. Colangeli and M. L. Gennaro (1997b). "Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun **65**(1): 16-23.
- Mazana, J. S. (2009). "La Tuberculosis y sus epónimos. Charles Mantoux (1877-1947)." Rev.Esp.Sanid.Penit. **11**: 27-33.
- Ministerio.de.Salud (2010). "Notificación de casos de Tuberculosis en la República Argentina- Período 1980-2009." Presidencia de la Nación.(PRO.TB.DOC.TEC.07/10).
- Miranda, C., J. W. Tomford and S. M. Gordon (2010). "Interferon-gamma-release assays: Better than tuberculin skin testing?" Cleve Clin J Med **77**(9): 606-611.
- Munk, M. E., S. M. Arend, I. Brock, T. H. Ottenhoff and P. Andersen (2001). "Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis." J Infect Dis **183**(1): 175-176.
- Nagai, S., J. Matsumoto and T. Nagasuga (1981). "Specific skin-reactive protein from culture filtrate of Mycobacterium bovis BCG." Infect Immun **31**(3): 1152-1160.
- Nagai, S., H. G. Wiker, M. Harboe and M. Kinomoto (1991). "Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun **59**(1): 372-382.

- Nagdev, K. J., R. S. Kashyap, P. S. Deshpande, H. J. Purohit, G. M. Taori and H. F. Dagainawala (2010). "Comparative evaluation of a PCR assay with an in-house ELISA method for diagnosis of Tuberculous meningitis." Med Sci Monit **16**(6): CR289-295.
- Nakamura, R. M., L. Einck, M. A. Velmonte, K. Kawajiri, C. F. Ang, C. E. Delasllagas and C. A. Nacy (2001). "Detection of Active Tuberculosis by an MPB-64 Transdermal Patch: A Field Study." Scand J Infect Dis **33**: 405-407.
- Nakamura, R. M., M. A. Velmonte, K. Kawajiri, C. F. Ang, R. A. Frias, M. T. Mendoza, J. C. Montoya, I. Honda, S. Haga and I. Toida (1998). "MPB64 mycobacterial antigen: a new skin-test reagent through patch method for rapid diagnosis of active tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis **2**(7): 541-546.
- Oettinger, T., A. Holm and Haslov.K. (1997). "Characterization of the Delayed Type Hypersensitivity-Inducing Epitope of MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis*." Scand J Immunol **45**: 499-503.
- Oettinger, T., A. Holm, I. M. Mtoni, A. B. Andersen and K. Hasloov (1995). "Mapping of the delayed-type hypersensitivity-inducing epitope of secreted protein MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Immun **63**(12): 4613-4618.
- OMS (1987a). "Requerimientos para Tuberculinas." TRS 745(Annex 1): 31-59.
- OMS (1987b). "Requerimientos para vacunas BCG liofilizadas." TRS 745(Annex 2): 60-92.
- Pai, M., A. Zwerling and D. Menzies (2008). "Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update." Ann Intern Med **149**(3): 177-184.
- Pym, A. S., P. Brodin, R. Brosch, M. Huerre and S. T. Cole (2002). "Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*." Mol Microbiol **46**(3): 709-717.
- Ravn, P., A. Demissie, T. Eguale, H. Wondwosson, D. Lein, H. A. Amoudy, A. S. Mustafa, A. K. Jensen, A. Holm, I. Rosenkrands, F. Oftung, J. Olobo, F. von Reyn and P. Andersen (1999). "Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*." J Infect Dis **179**(3): 637-645.
- Ravn, P., M. E. Munk, A. B. Andersen, B. Lundgren, J. D. Lundgren, L. N. Nielsen, A. Kok-Jensen, P. Andersen and K. Weldingh (2005). "Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis." Clin Diagn Lab Immunol **12**(4): 491-496.
- Rieder, H. L. (1999). "Bases epidemiológicas para el control de la Tuberculosis."
- Rivas-Santiago, B., P. Vieyra-Reyes and Z. Araujo (2005). "[Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis. Review]." Invest Clin **46**(4): 391-412.
- Sakula, A. (1982). "Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882." Thorax **37**(4): 246-251.
- Seibert, F. B. and J.-T. Glenn (1941). "Tuberculin purified protein derivative: preparation and analyses of a large quantity for standard." Amer. Rev. Tuberc. **41**: 9-25.

- Simsek, H., S. Alpar, N. Ucar, F. Aksu, I. Ceyhan, A. Gozalan, S. Cesur and M. Ertek (2010). "Comparison of tuberculin skin testing and T-SPOT.TB for diagnosis of latent and active tuberculosis." *Jpn J Infect Dis* **63**(2): 99-102.
- Smith, S. M. and H. M. Dockrell (2000). "Role of CD8 T cells in mycobacterial infections." *Immunol Cell Biol* **78**(4): 325-333.
- Sorensen, A. L., S. Nagai, G. Houen, P. Andersen and A. B. Andersen (1995). "Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis." *Infect Immun* **63**(5): 1710-1717.
- Tavares, R. C., J. Salgado, V. B. Moreira, M. A. Ferreira, F. C. Mello, J. W. Leung, S. Fonseca Lde, R. Spallek, M. Singh and M. H. Saad (2007). "Interferon gamma response to combinations 38 kDa/CFP-10, 38 kDa/MPT-64, ESAT-6/MPT-64 and ESAT-6/CFP-10, each related to a single recombinant protein of Mycobacterium tuberculosis in individuals from tuberculosis endemic areas." *Microbiol Immunol* **51**(3): 289-296.
- Tufariello, J. M., J. Chan and J. L. Flynn (2003). "Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection." *Lancet Infect Dis* **3**(9): 578-590.
- van Crevel, R., T. H. Ottenhoff and J. W. van der Meer (2002). "Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis." *Clin Microbiol Rev* **15**(2): 294-309.
- van Pinxteren, L. A., P. Ravn, E. M. Agger, J. Pollock and P. Andersen (2000). "Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10." *Clin Diagn Lab Immunol* **7**(2): 155-160.
- van Soolingen, D., P. E. de Haas and K. Kremer (2001). "Restriction fragment length polymorphism typing of mycobacteria." *Methods Mol Med* **54**: 165-203.
- Vilaplana, C. and P. J. Cardona (2010). "Tuberculin immunotherapy: its history and lessons to be learned." *Microbes Infect* **12**(2): 99-105.
- Weldingh, K. and P. Andersen (2008). "ESAT-6/CFP10 skin test predicts disease in M. tuberculosis-infected guinea pigs." *PLoS One* **3**(4): e1978.
- Welsh, M. D., R. T. Cunningham, D. M. Corbett, R. M. Girvin, J. McNair, R. A. Skuce, D. G. Bryson and J. M. Pollock (2005). "Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis." *Immunology* **114**(1): 101-111.
- WHO (2010). "Global Tuberculosis Control report 2010." http://www.who.int/publications/global_report/2010/en/index.html
Genova, Switzerland.
- Young, D. B., S. H. Kaufmann, P. W. Hermans and J. E. Thole (1992). "Mycobacterial protein antigens: a compilation." *Mol Microbiol* **6**(2): 133-145.
- Zúñiga Ramos, J. A., L. E. Pérez, V. Quiroz, G. Vargas-Alarcón and M. e. a. Selman (2000). "Aspectos inmunogenéticos de la tuberculosis pulmonar." *Rev.Inst. Nal.Enf. Resp. Mex.* **13**(4): 240-247.

SOLUCIONES Y BUFFERS

Solución de Buffer TAE 50 X

Tris base	24,2 g
Ácido acético glacial	5,71 ml
EDTA 50 mM pH 8	10 ml
Agua destilada tipo I c.s.p	100 ml

Buffer de siembra (electroforesis en gel de agarosa)

Azul de bromofenol	25 mg
Glicerol	3 ml
Agua destilada tipo I	7 ml

Gel de poliacrilamida (Concentrador)

Acrilamida/Bisacrilamida	650 μ l
Buffer Tris pH 6,8	1,25 ml
Persulfato de amonio (APS)	50 μ l
Temed	10 μ l
Agua destilada tipo I csp	5 ml

Gel de poliacrilamida 12,5 % (Separador)

Acrilamida/Bisacrilamida	3,113 ml
--------------------------	----------

Buffer Tris pH 6,8	1,875	ml
Persulfato de amonio (APS)	50	μl
Temed	10	μl
Agua destilada tipo I csp	7,5	ml

Buffer reservorio (5x)

Tris	32,2	g
Glicina	144	g
SDS	10	g
Agua destilada tipo I csp	2000	ml

Solución salina de buffer fosfato pH 7,2 + 0,2

NaCl	8	g
KCl	0,2	g
Na ₂ PO ₄ H	1,42	g
KH ₂ PO ₄	0,2	g
H ₂ O dest. Tipo I c.s.p	1000	ml

PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES

Plaques células E.coli en Agar LB. Dejar crecer toda la noche a 37°C. Picar una colonia aislada e inocular en 5 ml de caldo LB. Dejar crecer a 37°C toda la noche.

Diluir 1:100 el cultivo crecido en 100 ml de caldo LB y hacer crecer a 37°C con agitación hasta una $DO_{600\text{ nm}} = 0,5$ (aproximadamente 3 horas). Enfriar 5 minutos sobre hielo granizado y centrifugar 10 minutos a 4000 rpm a 4 °C. Resuspender el sedimento con 100 ml de MgCl₂ 0,1 M.

Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante y resuspender en CaCl₂ 0,1 M. Incubar 20-30 minutos sobre hielo. Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm. Resuspender en 22 ml de ClCa₂ 0,1 M + 3,5 ml de

Glicerina 86%. Alicuotar rápidamente en frío (250 µl por criotubo) y almacenar a -70°C.

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Medio de Cultivo Sauton

Asparagina monohidrato	4,54 g
Acido cítrico monohidrato	2,19 g
Fosfato bipotásico	0,50 g
Sulfato de magnesio heptahidrato	0,50 g
Citrato de hierro amoniacal	0,05 g
Glicerina	60 ml
Sulfato de zinc (1.4mg/ml)	1 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Medio de Cultivo Lowenstein-Jensen

Medio base para 1000ml de huevos frescos:

Fosfato monopotásico	2.40 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,24 g
Citrato de magnesio monohidrato	0,60 g
Asparagina monohidrato	3,60 g
Sulfato de zinc (1.4mg/ml)	1,6 ml
Verde de malaquita	0,4 g
Agua destilada c.s.p.	600 ml

Caldo Luria Bertani (LB)

Contiene por litro de agua destilada:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	5 g

Se fracciona en frascos tipo Schott y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Agar Luria Bertani (LB)

Tiene la misma composición por litro de agua destilada que el caldo LB más 15 g de agar . Se fracciona en erlenmeyers de 250 cc y se esteriliza a 121 °C durante 20 minutos.