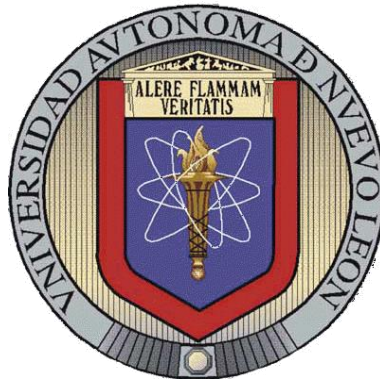


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS DE LA RESUPUESTA HUMORAL CONTRA LA
PROTEÍNA HspX DE *Mycobacterium tuberculosis* COMO
BIOMARCADOR DE TUBERCULOSIS LATENTE**

Por

PAOLA JANETH GARCÍA JACOBO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con acentuación en Inmunobiología**

Noviembre, 2012

**ANÁLISIS DE LA RESUPUESTA HUMORAL CONTRA LA
PROTEÍNA HspX DE *Mycobacterium tuberculosis* COMO
BIOMARCADOR DE TUBERCULOSIS LATENTE**

Comité de tesis

Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales
Director de Tesis

M.C. José Luis Méndez Vázquez
Secretario

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Primer vocal

Dr. Jorge Enrique Castro Garza
Segundo vocal

Dr. Lucio Vera Cabrera
Tercer vocal

Dra. Itza Eloisa Luna Cruz
Suplente

**ANÁLISIS DE LA RESUPUESTA HUMORAL CONTRA LA
PROTEÍNA HspX DE *Mycobacterium tuberculosis* COMO
BIOMARCADOR DE TUBERCULOSIS LATENTE**

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en la Unidad de Infectología Molecular, Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, así como en la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la dirección de la Dra. Lydia Rivera Morales y el Dr. Jorge Enrique Castro Garza respectivamente.

Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales
Directora Interna

Dr. Jorge Enrique Castro Garza
Director Externo

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar hasta el día de hoy y mostrarme todo lo bello de la vida.

Agradezco al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas y a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, jefa de este Laboratorio, por el apoyo financiero brindado para la realización del trabajo experimental.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Jorge E. Castro Garza asesor externo por su paciencia, valiosas observaciones y contribuciones durante el proceso de la tesis.

A la Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales asesora directa de tesis por permitirme ser parte de este proyecto y por el apoyo recibido durante la elaboración de la tesis.

A la Dra. Itza Eloisa Luna Cruz, por toda la ayuda, apoyo, valiosas sugerencias e interés en la revisión y elaboración tanto práctica como escrita de la tesis.

A la Dra. Lupita Martínez Ramírez por acompañarme en este proceso de mi vida, escucharme y dejarme aprender de ella muchos aspectos que jamás hubiera notado.

Al Dr. Adrián Rendón (Centro de Investigación, Prevención y Tratamiento de Infecciones Respiratorias(CIPTIR)del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”)por su apoyo en proporcionarnos las muestras empleadas para la determinación de anticuerpos.

Al Dr. Adrián G. Rosas Taraco, Dr. Pablo Zapata Benavides, Dr. José Luis Méndez Vázquez, Dr. Lucio Vera Cabrera y al Dr. Ricardo Gómez por sus sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A la Q.C.B. Mónica Sagástegui Munguía por su apoyo y confianza depositados.

Al M.C. Ismael Malagón por su invaluable y desinteresada ayuda en el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el proyecto de tesis.

A mi familia por el apoyo moral que siempre me ha brindado en todo este proceso de superación académica y personal.

Y a todos los integrantes del Laboratorio de Inmunología y Virología: el L.B.G. Jesús Montes por su entusiasmo y disponibilidad para mostrarme el empleo de técnicas de bioinformática, al M.C. José Manuel Vázquez Guillen por sus valiosos consejos y observaciones en el proyecto, a Víctor Don y al Q.B.P. Gustavo I. Amador Patiño por su apoyo en el laboratorio, a la Dra. Janeth E. Salinas por su ayuda y sugerencias, al Q.F.B. Felipe Olguín por su amistad, apoyo y por compartir sus conocimientos, así como a Leslie Cantú y Dinorah Gallardo por todo su apoyo durante el proceso de elaboración de la tesis.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Agente causal.....	4
2.2. Epidemiología.....	6
2.3. Tuberculosis en México.....	6
2.4. Transmisión.....	6
2.5. De la infección a la enfermedad.....	7
2.6. Patogenia e inmunidad.....	8
2.7. Características clínicas.....	11
2.8. Diagnóstico.....	13
2.8.1. Examen microscópico.....	13
2.8.2. Prueba de la tuberculina.....	13
2.8.3. Cultivo de micobacterias.....	14
2.8.4. Amplificación de ácidos nucleicos.....	15
2.8.5. Técnicas radiográficas.....	17
2.8.6. Análisis con liberación de INF- γ	17
2.9. Proteína HspX (Gen <i>Rv2031c</i>).....	18
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 Objetivo general.....	22

4.2	Objetivos particulares.....	22
5.	MÉTODOS.....	23
5.1.	Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen <i>Rv2031c</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
5.2.	Preparación de bacterias calcio competentes.....	25
5.3.	Ligación y transferencia del gen <i>Rv2031c</i> en el vector de expresión pET-23b(+)......	26
5.4.	Transformación de bacterias calcio-competentes BL21(DE3)pLysS con el plásmido pET-23b(+) conteniendo la secuencia <i>Rv2031c</i>	28
5.5.	Método rápido para identificación del piasmido.....	29
5.6.	Purificación del ADN plasmídico.....	30
5.7.	Secuenciación de la construcción pET-23b(+)-HspX.....	31
5.8.	Producción a mini escala de la proteína recombinante HspX.....	31
5.9.	Análisis electroforético de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE.....	32
5.10.	Tinción del gel de poliacrilamida.....	33
5.11.	Producción del antígeno recombinante HspX.....	33
5.12.	Purificación del antígeno recombinante HspX.....	34
5.13.	Diálisis de la proteína recombinante.....	35
5.14.	Liofilizado de las proteínas purificadas.....	37
5.15.	Inmunodetección de la proteína recombinante mediante Western Blot.....	37
5.16.	Análisis de interferencias por reacción cruzada con proteínas homólogas de micobacterias del complejo <i>M. tuberculosis</i> y micobacterias atípicas.....	39
5.17.	Obtención de lisados celulares totales.....	40
5.18.	Inmunodetección de la proteína HspX (<i>Rv2031c</i>) en lisados celulares de micobacterias del complejo <i>M. tuberculosis</i> y micobacterias atípicas.....	41
5.19.	Identificación de anticuerpos IgG e IgM contra el antígeno de 16-kDa mediante la técnica de ELISA.....	42
5.20.	Análisis estadístico.....	44
6.	RESULTADOS.....	45
6.1.	Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen <i>Rv2031c</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	45
6.2.	Clonación del fragmento codificante al gen <i>Rv2031c</i> en el vector de expresión pET-23b(+)......	46
6.3.	Secuenciación de la construcción recombinante pET-23b(+)-HspX.....	47
6.4.	Producción de la proteína recombinante HspX.....	47
6.5.	Purificación de la proteína recombinante HspX.....	49

6.6.	Diálisis y liofilización de la proteína recombinante HspX.....	50
6.7.	Inmunodetección de la proteína recombinante HspX.....	51
6.8.	Análisis electroforético de lisados celulares bacterianos mediante SDS-PAGE.....	52
6.9.	Inmunodetección de la proteína HspX (<i>Rv2031c</i>) en lisados celulares de micobacterias del complejo <i>M. tuberculosis</i> y micobacterias atípicas.....	54
6.10.	Identificación de anticuerpos IgG e IgM contra el antígeno de 16-kDa mediante la técnica de ELISA.....	55
7.	DISCUSIÓN.....	61
8.	CONCLUSIONES.....	68
9.	PERSPECTIVAS.....	69
	APÉNDICES.....	70
	SOLUCIONES.....	70
	LITERATURA CITADA.....	73
	RESUMEN BIOGRÁFICO.....	78

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Características de los oligonucleótidos.....	24
2.	Reacción de ligación vector-inserto.....	27
3.	Microorganismos incluidos en el porcentaje de identidad.....	37
4.	Lisados celulares.....	38
5.	Anticuerpos secundarios.....	44
6.	Criterios de selección para el diseño de oligonucleótidos.....	45
7.	Porcentaje de identidad obtenido en el programa DNASTar.....	53
8.	Datos clínicos y demográficos de personas clasificadas como TB activa y muestras problema.....	55
9.	Datos clínicos y demográficos de personas con diagnóstico presuntivo de tuberculosis latente.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Secuencia nucleotídica de ADN del gen <i>Rv2031c</i> (GB: AL123456) depositada en "TB database".....	24
2. Mapa del vector de expresión pET-23b(+).	27
3. Diálisis de la proteína recombinante.....	37
4. Diagrama para el ensamblaje de la transferencia de proteínas.....	38
5. Productos de amplificación.....	46
6. Método rápido para identificación de plásmido.....	47
7. Presencia del inserto en el vector pET-23b(+).	47
8. Alineamiento mediante Clustal W.....	48
9. Producción de la proteína recombinante.....	49
10. Purificación de la proteína recombinante.....	50
11. Corrida en gel de poliacrilamida de la proteína recombinante dializada.....	51
12. Detección de la proteína recombinante HspX mediante Western Blot...	51
13. Corrimiento electroforético de los lisados celulares.....	52
14. Inmunodetección de la proteína HspX (<i>Rv2031c</i>).....	54

15. Identificación de anticuerpos IgG e IgM contra la proteína HspX-His.....	56
16. Identificación de anticuerpos IgG e IgM contra la proteína HspX-His en individuos con nueva clasificación.....	57
17. Análisis de curvas ROC para Tuberculosis latente yTB activa.....	58
18. Valor de corte para Tuberculosis latente yTBactiva.....	58
19. Análisis de curvas ROC para Tuberculosis latente reciente yTBactiva	59
20. Valor de corte para Tuberculosis latente reciente yTBactiva.....	60

NOMENCLATURA

%GC	Porcentaje de guanina-citosina
ASB	Albúmina sérica bovina. Conocida por sus siglas en inglés BSA.
BAAR	Bacilo ácido alcohol resistente
CLR	Del inglés C-type lectin receptors (Receptores de lectina tipo C)
DO	Densidad óptica
DO ₆₀₀	Densidad óptica a una absorbancia de 600 nm
ELISA	Acrónimo del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).
g	Unidades de gravedad. Unidad de medida de la fuerza centrífuga relativa (RCF)
HSR	Hipersensibilidad tardía
IGRAs	Del inglés: Interferon-Gamma Release Assays (Ensayo de liberación de interferón gamma).
iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani
MDR	multidrogoresistente
min	minuto
μM	micromolar
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

NLR	Del inglés Nod-like receptors (receptores tipo Nod)
OPD	<i>o</i> -Phenylenediamine dihydrochloride
pADN	ADN plasmídico
pmol/ μ L	Picomoles por microlitro
PPD	Del inglés: Purified protein derivative (Derivado proteico purificado).
PRR	Del inglés: pathogen-associated molecular patterns (Patrones moleculares asociados a patógenos).
PSA	Persulfato de amonio
RFLP	Del inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción).
rLTBI	Del inglés: Recent latent tuberculosis (Infección latente reciente)
rpm	Revoluciones por minuto
TA	Temperatura ambiente
TB	Tuberculosis
TBVTRM	TB Vaccine Testing and Research Materials
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina
TLR	Del inglés Toll-like receptor (receptores de tipo Toll)
T _m	Temperatura media de alineamiento
TU	Del inglés: Tuberculin units (Unidades de tuberculina).
UV	Ultravioleta
XDR	Extremadamente drogo resistente
ZN	Tinción Ziehl-Neelsen

RESUMEN

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno multifacético capaz de causar tanto enfermedad crónica como enfermedad latente asintomática. En la enfermedad asintomática el bacilo reside en los tejidos donde permanece por años e incluso décadas antes de que se presente la reactivación (infección latente).

La población de individuos con infección latente constituye uno de los mayores impedimentos en el control de la tuberculosis, ya que está presente la posibilidad de reactivación de la enfermedad y ser una fuente de contaminación a otros individuos mientras que no se manifiesten los síntomas para un diagnóstico y tratamiento correcto.

Un punto clave para controlar la tuberculosis latente es la identificación de biomarcadores presentes en esta etapa de la enfermedad y el desarrollo de una prueba sensible y específica para su detección.

La proteína HspX (α -cristalina) de 16-kDa codificada en el gen *Rv2031c* es producida *in vitro* por *M. tuberculosis* durante la fase estacionaria y en condiciones de hipoxia pero no durante el crecimiento logarítmico. Esta proteína se expresa durante la infección en humanos y tanto la proteína como anticuerpos anti-HspX pueden ser detectados en el suero de pacientes. La producción de la proteína se incrementa durante la latencia de la bacteria y decrece cuando esta regresa a su crecimiento exponencial, por lo tanto este antígeno es un posible biomarcador en la identificación de tuberculosis latente.

En este estudio se examinó la presencia de anticuerpos contra el producto del gen *Rv2031c* en el suero de pacientes con distintos estadios de la enfermedad. Los valores séricos de anticuerpos IgG e IgM fueron similares entre individuos no infectados y con TB activa; sin embargo, los individuos clasificados con TB latente presentaron valores más altos de anticuerpos IgM anti-HspX ($p < 0.003$). Estos resultados sugieren que los anticuerpos contra la proteína HspX podrían ser empleados como un posible biomarcador que permita la detección de la tuberculosis latente.

ABSTRACT

M. tuberculosis is a multifaceted pathogen capable of causing both: an acute disease and an asymptomatic latent infection. Latent *M. tuberculosis* bacilli can reside in the deep tissues and persist for years, even decades, before resulting in tuberculosis reactivation.

The population of latently infected individuals constitutes one of the most important impediments to tuberculosis control efforts. Because, it remains the possibility of disease reactivation and the patients may be a source of contamination for healthy people until symptoms are manifest for an accurate diagnosis and correct treatment.

The initial effort into the control of latent infection will thus require the identification of biomarkers related with latency of bacilli and the development of a sensitive and specific diagnostic test.

The HspX protein (α -crystalline) is coded in *Rv2031c* gene and is produced *in vitro* by *M. tuberculosis* during stationary growth phase and anoxic conditions but not during exponential growth. This protein is expressed in humans during infection and the protein as well as the anti-HspX antibodies can be detected in patient serum. The production of the protein is increased during bacteria latency and “down regulated” when it returns to exponential growth, therefore this protein may serve as a “latency-associated biomarker” identifying latent tuberculosis.

In this study we examine the presence of antibodies against the product of *Rv2031c* gene on serum from patients with different stages of tuberculosis. The levels of antibodies IgG and IgM were similar between non infected and active TB patients; however, individuals in the group of latent TB showed higher levels of IgM anti-HspX (p 0.003) than active TB patients. These results suggest that the antibodies against the HspX protein could be used as a possible biomarker allowing the detection of latent tuberculosis.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas de los seres humanos y es la segunda causa de muerte en todo el mundo por un solo agente infeccioso. Esta enfermedad es causada principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. El contagio ocurre por vía aérea, a través de “gotitas” que expulsan los pacientes con tuberculosis pulmonar contagiosa. Una vez que la bacteria alcanza el pulmón, pueden desencadenarse cuatro escenarios: 1) una respuesta inicial del hospedero que permite eliminar a todos los bacilos efectivamente, por lo tanto la persona no desarrolla tuberculosis; 2) el microorganismo comienza a multiplicarse inmediatamente después de la infección, causando una tuberculosis primaria; 3) el bacilo llega y se establece pero no causa enfermedad, (el paciente es considerado asintomático) alcanzando un “equilibrio” con el huésped; el bacilo reside en los tejidos por años e incluso décadas, tales pacientes presentan una enfermedad latente; 4) estos microorganismos latentes pueden eventualmente crecer y causar una tuberculosis reactiva cuando se rompe ese equilibrio. (Yuan, 1996).

La población de individuos con infección latente constituye uno de los mayores impedimentos en el control de la tuberculosis, ya que está presente la posibilidad de reactivación de la enfermedad y ser una fuente de infección a otros individuos mientras que no se manifiesten los síntomas para un diagnóstico y tratamiento correcto. La mayoría de los casos reportados de tuberculosis en los Estados Unidos son resultado de la reactivación de los bacilos y no de una infección primaria. En todo el mundo, el problema quizá sea aún más serio, ya que se estima que alrededor de una tercera parte de la población se encuentre infectada por el bacilo y éste se encuentre en forma latente (Yuan, 1996).

La prueba empleada comúnmente para determinar si la persona ha estado expuesta a la micobacteria es la prueba de la tuberculina (*tuberculin skin test: TST*). Esta

prueba es de bajo costo y simple de aplicar, sin embargo, entre los problemas de esta prueba están: el paciente tiene que regresar para que la prueba sea valorada, la variabilidad y subjetividad en la aplicación y lectura de la prueba, además de presentar reacción cruzada con la vacuna de la BCG (*Bacillus Calmette Guérin, 1921*) y con otro tipo de micobacterias (Rabahiet *al.*, 2007; Godreuillet *al.*, 2007).

En el 2005, la FDA aprobó dos ensayos de INF- γ para el diagnóstico de tuberculosis, estos ensayos están basados en una prueba de ELISA en donde se determina el INF- γ liberado por linfocitos de sangre periférica expuestos a los antígenos ESAT-6 (early secretory antigen target) y CFP-10 (culture filtrate protein 10). Sin embargo, aunque esta prueba sustituye bastante bien a la prueba de la tuberculina, no es capaz de distinguir entre infección activa o latente por *M. tuberculosis*. (Rabahi, 2007).

En estudios recientes, se han encontrado antígenos proteicos que han demostrado producir una respuesta inmunitaria humoral durante la infección de *M. tuberculosis* como el de la proteína HspX, EAST-6, CFP-10 el antígeno de 80-kDa (*Globo*), MPT64, PstS1 y TrxC (Rabahi et al., 2007; Sartain et al., 2009). La proteína HspX es inducida fuertemente durante la fase estacionaria de crecimiento y durante el crecimiento en cultivos sin agitación en los que el oxígeno se encuentra en cantidades limitadas, una situación semejante se presenta en los granulomas durante la infección, por lo que se ha propuesto que esta proteína sea un elemento importante en la latencia y persistencia de *M. tuberculosis*. (Florczyk, 2001).

Debido a que los análisis basados en la detección de anticuerpos son rápidos, sensibles, simples y de bajo costo, se ha visto que constituyen una alternativa a los métodos tradicionales para el diagnóstico y seguimiento epidemiológico de tuberculosis ya que detectan la respuesta inmunológica generada por el organismo a determinados antígenos. En base a lo anterior, el propósito de este proyecto consistió en evaluar la respuesta inmune humoral a la proteína HspX en pacientes con infección activa y presuntiva de latencia por *M. tuberculosis* con la finalidad de establecer la relevancia de

este antígeno para diferenciar diferentes etapas de la enfermedad y con ello definir nuevas estrategias que permitan el diagnóstico oportuno de tuberculosis latente.

2. ANTECEDENTES

2.1 Agente Causal de tuberculosis.

El género *Mycobacterium*, descrita por Lehman y Neuman en 1896 es una de las taxas más ampliamente estudiadas a nivel mundial. Su identificación tradicional está dada en base a características como la forma de las colonias, índice de crecimiento y pruebas bioquímicas (Godreuil, 2007).

La tuberculosis es ocasionada por un grupo de bacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis (MTBC)*, dentro de este, el agente causal más importante de la mayoría de los casos en seres humanos es *M. tuberculosis*. El complejo incluye *M. bovis* (bacilo tuberculoso bovino que en forma característica es resistente a pirazinamida, en alguna ocasión una causa importante de tuberculosis transmitida por leche no pasteurizada y que a la fecha causa un pequeño porcentaje de casos en humanos), *M. caprae* (relacionado con *M. bovis*), *M. africanum* (encontrado frecuentemente en África oriental, central y occidental), *M. microti* (el “bacilo campañol”, un microorganismo poco virulento encontrado en roedores y rara vez en humanos), *M. pinnipedii* (un bacilo que afecta focas y leones marinos en el hemisferio sur y que en fechas recientes se ha aislado de seres humanos), *M. canettii* (aislado ocasionalmente en el este africano, produce colonias lisas en medios sólidos)(Fauci *et al.*, 2009; Godreuil *et al.*, 2007).

A la fecha se han descrito 71 especies de micobacterias y se han subdividido en dos grupos principales basándose en su índice de crecimiento (rápido y lento crecimiento). Las especies de *Mycobacterium* con rápido crecimiento (colonias visibles en un transcurso de 7 días bajo condiciones óptimas en cultivo) son conocidas principalmente como saprófitas en hábitats naturales y solo unas pocas de ellas son consideradas patógenas en humanos o animales (p. ej., *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M.*

porcinum), mientras que la mayoría no son patógenas (p. ej., *M. smegmatis*). Por el contrario, la mayoría de las especies de *Mycobacterium* de lento crecimiento (colonias visibles al menos en ocho semanas en medio Lowenstein-Jensen) son patógenas en humanos y/o animales (p. ej., todas las especies del complejo *MTB* [*MTBC*], *M. leprae*, *M. ulcerans* *M. avium*)(Godreuil, 2007).

En general las micobacterias, no suelen captar el colorante Gram por lo que no pueden ser clasificadas como Gram positivas o Gramnegativas. Los bacilos tuberculosos se caracterizan por ser “ácido-alcohol resistentes” (*BAAR*). La mayoría de las bacterias al ser teñidas con fucsina se decoloran rápidamente con una solución de alcohol etílico al 95% con 3% ácido clorhídrico (alcohol-ácido) excepto las micobacterias. Esa resistencia a la coloración se debe principalmente a que estos microorganismos tienen en la pared celular gran cantidad de ácidos micólicos, ácidos grasos de cadena larga y enlaces cruzados con otros lípidos (Brooks, 2010). En la pared celular de las micobacterias, los arabinogalactanos están unidos a los peptidoglucanos subyacentes. Esta estructura es causa de la escasísima permeabilidad de la pared celular y, por tanto, de la ineficacia que muestran la mayor parte de los antibióticos contra este microorganismo. Otra molécula que forma parte de la pared de las micobacterias es el lipoarabinomano que interviene en la interacción agente patógeno-hospedador y favorece la supervivencia de *M. tuberculosis* en el interior de los macrófagos.

M. tuberculosis es una bacteria aerobia, no esporógena, cilíndrica, que mide 0.5 por 3 μm , puede ser detectada por microscopía óptica con una tinción de *Ziehl-Neelsen* (ZN) modificada o Kinyoun en esputo de una persona con TB activa. En la tinción puede observarse un bacilo delgado color rojo a rosado, mientras que el resto del material es teñido con un color azul (Godreuil, 2007).

En 1998 se logró obtener la secuencia genómica completa de *M. tuberculosis*, la cual comprende 4043 genes que codifican 3993 proteínas y 50 genes codificados en el ARN; tiene un alto contenido en guanina-citosina (65.6 %). Una gran proporción de los

genes codifican para enzimas que intervienen en el metabolismo de la pared celular (Cole *et al*, 1998).

2.2 Epidemiología

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se calcula que en el 2010 se detectó una incidencia de 8.8 millones de casos de TB en todo el mundo, equivalente a 128 casos por cada 100 000 habitantes. En el 2010 la mayoría de esos casos se registraron en Asia (59%) y África (26%). Los cinco países con mayor número de casos fueron la India (2.0-2.5 millones), China (0.9-1.2 millones), Sudáfrica (0.40-0.59 millones), Indonesia (0.37-0.54 millones) y Pakistán (0.33-0.48 millones). Se estimó que tan solo India presentó un cuarto de todos los casos de TB en el mundo (26%) (WHO, 2011).

De los 8.8 millones de casos incidentes en el 2010, entre 1.0-1.2 millones (12-14%) corresponde a personas co-infectadas con VIH. La proporción de tales casos es más alta en países de la región Africana (82%) (WHO, 2009).

2.3 Tuberculosis en México

De acuerdo al reporte de la Secretaría de Salud, para el año 2010 la información preliminar de la Plataforma Única de Tuberculosis en México señala que se registró una tasa de 13.7 por cada 100 mil habitantes de TB en todas sus formas (18,848 casos nuevos), de los cuales un 81.6% corresponde a tuberculosis pulmonar, 1.6% meníngea, 5.7% ganglionar y 11.1% corresponde a otras formas. Un 20% de casos nuevos de TB están asociados a diabetes, 4.9% de casos corresponden a pediatría (<15 años) y 5.9% correlación TB/SIDA (Secretaría de Salud, 2012).

2.4 Transmisión

Mycobacterium tuberculosis se trasmite de persona a persona por medio de gotitas en forma de aerosol (1 a 5 μ m) que contienen el bacilo; estas gotitas son producidas por personas con tuberculosis pulmonar o laríngea al toser, estornudar o

hablar. También pueden ser producidas por, inducción de esputo, broncoscopía y durante manipulación y procesamiento de tejidos o secreciones en hospitales o laboratorios. Las gotitas que contienen dos o tres bacilos son lo suficientemente pequeñas para permanecer en el aire durante largos periodos de tiempo y entrar por vía aérea y establecerse en los alveolos pulmonares donde los bacilos se replican una vez establecidos (American Thoracic Society, 2000).

La duración de contacto, la cantidad de bacilos que son expulsados, el grado de contagiosidad, la capacidad inmunológica de la persona y el ambiente que se comparte con la persona enferma son, todos ellos, factores importantes para la transmisión (American Thoracic Society, 2000). En varios estudios se ha demostrado claramente que los pacientes tuberculosos cuyos esputos contienen BAAR visibles al microscopio son los que más influyen en la propagación de la infección. Estos pacientes suelen padecer una tuberculosis pulmonar cavitaria, o una tuberculosis de las vías respiratorias (tuberculosis endobronquial o laríngea) y eliminan esputos que contienen entre 10^5 a 10^7 BAAR/mL. Los pacientes tuberculosos con frotis de esputo negativo y cultivo positivo son menos contagiosos, y los enfermos con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar con cultivos negativos carecen prácticamente de contagiosidad. Las personas que presentan infección por VIH tienen menos probabilidad de formar cavidades, y por tanto pueden ser menos infecciosas. Uno de los factores más importantes para la transmisión de los bacilos tuberculosos es el hacinamiento en espacios mal ventilados, porque intensifica el contacto con el enfermo (Fauci, 2009).

2.5 De la infección a la enfermedad

El contacto con *M. tuberculosis* dará lugar a tres escenarios: a) algunas personas que rápidamente desarrollarán TB activa y presentarán síntomas clínicos, b) la mayoría de las personas no mostrarán síntomas de la enfermedad pero desarrollarán una respuesta inmune adquirida eficiente y se denominará como tuberculosis latente y c) una parte de las personas que presentan tuberculosis latente presentarán reactivación y desarrollarán tuberculosis activa post-primaria.

El riesgo de enfermar después de infectarse con *M. tuberculosis* depende del balance de los factores bacterianos y de la respuesta del hospedador ante la infección. Dentro de los factores endógenos están la predisposición natural a la enfermedad y la eficacia funcional de la inmunidad celular (Kumar, 2008). Se calcula que después de la infección por MTB un 5 a 10% de los individuos (principalmente infantes o niños) desarrollarán tuberculosis primaria activa. La tuberculosis primaria ocurre usualmente en un transcurso de 1 a 2 años después de la infección inicial y da como resultado multiplicación bacilar en el pulmón y su diseminación en el mismo pulmón o hacia el torrente sanguíneo. La diseminación al torrente sanguíneo puede producir su crecimiento en varios tejidos y órganos (tuberculosis miliar). La tuberculosis post-primaria o secundaria puede ocurrir años después de la infección debido a la pérdida de control por el sistema inmune o reactivación del bacilo. Las lesiones características son daño tisular, cavitaciones, baciloscopia positiva, con compromiso de los lóbulos superiores del pulmón (Gideon, 2011).

Otro factor importante que influye en el riesgo de enfermar después de la infección es la edad. Entre las personas infectadas, la incidencia de tuberculosis es máxima al final de la adolescencia y comienzos de la edad adulta; las razones de esto no se conocen bien. En las mujeres se observa una incidencia máxima entre los 15 a 45 años de edad. En este grupo de edad, la incidencia es mayor en las mujeres que en los varones, pero a edades más avanzadas ocurren lo contrario. El riesgo de enfermar puede ser mayor en los ancianos debido posiblemente al deterioro de la inmunidad y a la coexistencia de otras enfermedades (Demissie, 2009).

Hay varias enfermedades y condiciones que favorecen el desarrollo de una tuberculosis activa como una co-infección con el VIH, diabetes no controlada, sepsis, falla renal, desnutrición, fumar, trasplante de órgano, administración de corticoesteroides (Knechel 2009).

2.6 Patogenia e inmunidad

La interacción de *M. tuberculosis* con el hospedero comienza cuando las gotitas infecciosas de los pacientes contagiados son inhaladas por alguna persona. La mayor

parte de los bacilos quedan atrapados en las vías respiratorias superiores y son expulsados por el barrido ciliar de las células de la mucosa, pero una parte de ellos, por lo general menos de 10%, llegan hasta los alvéolos. El establecimiento del bacilo en los pulmones dependerá de la virulencia del mismo y de la capacidad del sistema inmune para destruirlo (Fauci, 2009).

La inmunidad innata juega un papel importante en la defensa contra *M. tuberculosis* y el primer paso en este proceso es el reconocimiento del bacilo por células del sistema inmune, muchas clases de receptores de reconocimiento de patrón (PPRs) están involucrados en el reconocimiento de *M. tuberculosis*, incluyendo los receptores de tipo Toll (TLR), receptores de lectina tipo C (CLRs) y receptores de tipo Nod (NLRs). Entre la familia de los receptores de tipo Toll se encuentran los TLR2, TLR4, TLR9 y su molécula adaptadora MyD88 quienes juegan un papel importante en la iniciación de la respuesta inmune contra el bacilo. Se ha encontrado que también se encuentran involucrados receptores tipo NOD2, Dectina-1, receptores de manosa y DC-SIGN. La comprensión del reconocimiento de *M. tuberculosis* por estos receptores no solo contribuye a un mejor entendimiento de la patogénesis del bacilo sino también para el diseño de nuevas estrategias en inmunoterapia (Kleinnijenhuis, 2011).

Si el bacilo sobrevive a la destrucción por los macrófagos alveolares éste se puede multiplicar en el interior del macrófago creciendo lentamente y dividiéndose cada 25 a 32 horas por 2 a 12 semanas hasta alcanzar una cantidad de 10^3 a 10^4 bacilos, cantidad suficiente de microorganismos para generar una respuesta inmune que puede ser detectada mediante la prueba de hipersensibilidad retardada conocida como PPD (American Thoracic Society, 2000).

Los fagosomas que contienen *M. tuberculosis* presentan las siguientes características: limitada acidificación, disminuida fusión con vesículas lisosomales y un incremento en la acumulación de marcadores de endosomas tempranos. Asimismo, el fagosoma que contiene a MTB no adquiere Rab7, marcador específico para endosomas

tardíos, estas proteínas Rab son las responsables de controlar el tráfico de membrana entre los compartimentos endosomales (Bobadilla 2009).

Así pues, el estadio más precoz de la tuberculosis primaria (< 3 semanas), en el individuo no sensibilizado, se caracteriza por la proliferación de las bacterias en los macrófagos alveolares y en los espacios aéreos, con la consiguiente bacteremia y la siembra en localizaciones múltiples. A pesar de la bacteremia, la mayoría de los pacientes en este estadio están asintomáticos o tienen una enfermedad leve parecida a la gripe (Kumar, 2008).

Aproximadamente 3 semanas después de la infección se produce una respuesta T_H1 contra *M. tuberculosis* que activa los macrófagos haciéndolos bactericidas. Los linfocitos T_H1 son estimulados por antígenos micobacterianos drenados al ganglio linfático, que son presentados junto con las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II por las células presentadoras de antígeno. La diferenciación de los linfocitos T_H1 depende de la presencia de la IL-12, que se produce por las células presentadoras de antígeno que se han encontrado con la micobacteria. Los linfocitos T_H1 maduros, en los ganglios linfáticos y en el pulmón, producen INF- γ . El INF- γ es el mediador crítico que hace que los macrófagos se transformen en competentes para detener la infección por *M. tuberculosis*. El INF- γ estimula la formación del fagolisosoma en los macrófagos infectados, exponiendo a las bacterias a un ambiente ácido inhóspito, estimula también la expresión de sintasa inducible de óxido nítrico (*iNOS*), que produce óxido nítrico (*NO*). El óxido nítrico genera intermediarios de nitrógeno reactivos y otros radicales libres capaces de destrucción oxidativa de varios constituyentes bacterianos, desde la pared celular al ADN(Kumar, 2008).

Además de estimular a los macrófagos para destruir micobacterias, la respuesta T_H1 dirige la formación de granulomas y necrosis caseosa. Los macrófagos activados, estimulados por el INF- γ , producen TNF que recluta a los monocitos al sitio de infección primaria formándose lesiones granulomatosas (tubérculos). Estas lesiones consisten de acumulaciones de linfocitos y macrófagos activados que evolucionan en células

epitelioides gigantes. Al inicio, esta respuesta de daño a los tejidos puede limitar el crecimiento de las micobacterias en el interior de los macrófagos. Como se comentó antes, esta respuesta mediada por diversos productos bacterianos, no sólo destruye los macrófagos sino que también produce necrosis en el centro del tubérculo. Aunque *M. tuberculosis* puede sobrevivir, su crecimiento se ve inhibido en el interior del entorno necrótico con baja tensión de oxígeno y pH ácido. En este punto, algunas lesiones pueden cicatrizar a fibrosis, con calcificación subsecuente, en tanto que ocurren inflamación y necrosis en otras lesiones (Kumar, 2008).

En una menor parte de los casos, la respuesta de activación de los macrófagos es débil y la proliferación micobacteriana sólo puede ser inhibida si se intensifica la reacción de hipersensibilidad tardía (HSR), que provoca destrucción tisular. En este caso la lesión tiende a aumentar de tamaño y a extenderse cada vez más al tejido circundante. En el centro de la lesión, el material caseoso se licua. Se produce entonces la destrucción de las paredes bronquiales y de los vasos sanguíneos, seguido de la formación de cavidades. El material caseoso licuado, abundante en bacilos, se expulsa a través de los bronquios. En la cavidad, el bacilo tuberculoso se multiplica, se derrama hacia las vías respiratorias y se expele al exterior mediante la tos y al hablar. En etapas iniciales de la infección, los bacilos suelen ser transportados por macrófagos a los ganglios linfáticos regionales, donde obtienen acceso al torrente sanguíneo y se disemina a todo el cuerpo. Las lesiones resultantes pueden evolucionar de la misma forma que las pulmonares, aunque gran parte tiene tendencia a curar. En los niños pequeños, con escasa inmunidad natural, la diseminación hematógena puede acabar en una tuberculosis miliar letal o en una meningitis tuberculosa (Fauci, 2009).

2.7 Características clínicas

La tuberculosis suele dividirse en pulmonar (primaria y secundaria) y extrapulmonar (linfadenitis tuberculosa, de vías respiratorias superiores, genitourinaria, osteoarticular, meningitis tuberculosa, tuberculoma, pericárdica, miliar o diseminada), o ambas. Antes de que se conociera la infección por el VIH, alrededor del 80% de todos

los casos de tuberculosis se localizaban en los pulmones. Sin embargo, hasta dos tercios de los pacientes infectados por VIH y que enferman de tuberculosis pueden padecer una enfermedad tuberculosa pulmonar y extrapulmonar, o sólo extrapulmonar (Fauci, 2009).

La tuberculosis primaria es la forma de la enfermedad que se desarrolla en una persona no expuesta y, por lo tanto, no sensibilizada. El paciente anciano y las personas más inmunocomprometidas pueden perder su inmunidad al bacilo tuberculoso y de esta manera desarrollar tuberculosis primaria más de una vez. En la tuberculosis primaria el origen del organismo es exógeno. Mientras que la mayoría de los pacientes con tuberculosis primaria siguen teniendo una enfermedad latente, la infección progresiva, puede manifestarse en algunos. La tuberculosis primaria progresiva, se asemeja más a una neumonía bacteriana aguda, presenta consolidación en los lóbulos medio e inferior, adenopatía hiliar y derrame pleural; la cavitación es rara, especialmente en pacientes con inmunosupresión intensa. La diseminación linfohematógena es una enfermedad que puede dar lugar al desarrollo de meningitis tuberculosa y tuberculosis miliar (Knechel *et al.*, 2009; Kumaret *al.*, 2008).

La tuberculosis secundaria es el patrón de enfermedad que surge en un huésped previamente sensibilizado. Puede seguir al poco tiempo de una tuberculosis primaria pero, más habitualmente, se desarrolla por la reactivación de lesiones primarias varias décadas después de la infección inicial, particularmente cuando la resistencia del huésped se ha debilitado. También puede ser el resultado de la reinfección exógena por el decaimiento de la protección proporcionada por la enfermedad primaria o por inoculación de una gran cantidad de bacilos. El bacilo se localiza clásicamente en el vértice de los lóbulos superiores de uno o ambos pulmones. Esto puede deberse a la presión de oxígeno elevada en el vértice que favorece el crecimiento de las bacterias. Dada la preexistencia de hipersensibilidad, los bacilos suscitan una respuesta tisular rápida y marcada que tiende a aislar el foco de infección. La cavitación ocurre fácilmente, dando lugar a la diseminación de la bacteria por las vías aéreas. De hecho, la cavitación es casi siempre inevitable, y la erosión de la vía aérea constituye una fuente

importante de infección porque el paciente expulsa flemasque contienen bacilos. (Knechel *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2008).

2.8 Diagnóstico

2.8.1 Examen microscópico

Muchas veces el diagnóstico se plantea por vez primera ante el dato de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en un frotis realizado con una muestra de esputo o tejido (p. ej., la biopsia de un ganglio linfático) obtenido con fines diagnósticos. Aunque es rápida y poco costosa, la microscopía en busca de bacilos ácido-alcoholresistentes tiene baja sensibilidad (40 a 60%) en casos confirmados de tuberculosis pulmonar. Una de las técnicas más empleadas para teñir bacterias es la técnica de Ziehl-Neelsen una versión modificada llamada Kinyoun. Los laboratorios modernos que analizan muchas muestras utilizan la tinción de auramina-rodamina empleando el microscopio de fluorescencia. Cuando se sospecha de una tuberculosis pulmonar, el paciente debe recoger una muestra de esputo preferentemente por la mañana por tres días consecutivos, y enviarlas al laboratorio para realizar un frotis en busca de BAAR y un posterior cultivo microbiológico. También se pueden emplear muestras de tejido siendo esencial que la parte destinada al cultivo de micobacterias no se deposite en formaldehído. El empleo del microscopio óptico para investigar BAAR en la orina o el líquido de lavado gástrico tiene limitaciones porque estos líquidos contienen micobacterias comensales que pueden dar lugar a resultados positivos falsos (Knechel, 2009).

2.8.2 Prueba de tuberculina

Ya casi a un siglo de haberse utilizado, la prueba de tuberculina sigue siendo una de las pruebas más utilizadas en el diagnóstico inmunológico de la tuberculosis en todo el mundo. La tuberculina antigua era simplemente preparada de cultivos de *M. tuberculosis* inactivados y administrados por vía intradérmica. Mejoramientos subsecuentes dieron al desarrollo del *derivado proteico purificado* (PPD), sin embargo, se sabe que la mayoría de las proteínas en elPPD son compartidas entre especies de

micobacterias, así que individuos sensibilizados por micobacterias atípicas o que se les aplicó la vacuna de la BCG también pueden responder de la misma forma que individuos infectados por *M. tuberculosis* (Doherty, 2008).

La prueba de la tuberculina, también llamada Mantoux es aplicada vía intradérmica inyectando 0.1 mL de PPD que contiene 5 unidades de tuberculina. Se examina a las 24, 48 y 72 horas y se mide la induración presentada en el sitio de la aplicación de la prueba (Brooks, 2010).

2.8.3 Cultivo de micobacterias

Los medios para cultivo primario de las micobacterias deben incluir un medio no selectivo y un medio selectivo. El medio selectivo contiene antibióticos para evitar el crecimiento excesivo de bacterias y hongos contaminantes. Se conocen tres formulaciones generales:

1. Medio agar semisintético: Estos medios (p. ej., Middlebrook 7H10 y 7H11) contienen sales definidas, vitaminas, cofactores, ácido oleico, albúmina, catalasa, glicerol, glucosa y verde de malaquita; el medio 7H11 contiene también caseína hidrolizada. La albúmina neutraliza los efectos tóxicos e inhibidores de los ácidos grasos en la muestra o en el medio. Los inóculos grandes producen crecimiento sobre estos medios en varias semanas. Puesto que se requieren inóculos grandes, estos medios a veces son menos sensibles que otros para el aislamiento primario de las micobacterias.
2. Medio de huevo espesado: Estos medios (p. ej., Löwenstein-Jensen) contienen sales definidas, glicerol y sustancias orgánicas complejas (p. ej., huevo fresco o yema de huevo, harina de papa y otros ingredientes en combinaciones diversas). Se incluye verde de malaquita para inhibir otras bacterias. Los inóculos pequeños procedentes de las muestras de los pacientes pueden crecer sobre estos medios en 3 a 6 semanas. Estos medios con antibióticos agregados se emplean como medios selectivos.
3. Medios en caldo: Los medios en caldo (p. ej., Middlebrook 7H9 y 7H12) apoyan la proliferación de los inóculos pequeños. Ordinariamente, las micobacterias crecen en

grumos o masas debido al carácter hidrófobo de la superficie celular. Si se añade Tween (ésteres hidrosolubles de ácidos grasos) permite el crecimiento disperso en medio líquido. El crecimiento con frecuencia es más rápido sobre medios complejos (Brooks, 2010).

Los medios 7H12 con antibióticos, complementos y ácido C¹⁴-palmítico añadidos constituyen la base del sistema BACTEC para micobacterias. Durante el crecimiento las micobacterias utilizan el ácido C¹⁴-palmítico y liberan CO₂, que se detecta en el equipo. Los cultivos positivos se pueden detectar con este sistema en un promedio de casi dos semanas. Actualmente se utiliza también el medio MGIT un caldo de crecimiento líquido basado en el medio Middlebrook 7H9 enriquecido. Utiliza tecnología fluorescente basada en el consumo de O₂ (Brooks, 2010).

2.8.4 Amplificación de ácidos nucleídos

El desarrollo de técnicas moleculares basadas en la identificación y análisis de los ácidos nucleicos ha dado un gran impulso a la investigación epidemiológica de la tuberculosis humana y animal, al proporcionar herramientas que permiten identificar, comparar y trazar los patrones genómicos de cepas obtenidas en distintos escenarios epidemiológicos. Los métodos modernos de biología molecular, en particular los basados en la PCR, ofrecen una posibilidad de identificar de manera precisa a una gran diversidad de microorganismos, entre ellos las micobacterias, mediante el uso de oligonucleótidos para PCR dirigidos contra secuencias genómicas específicas de género y especie. La secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* y los primeros hallazgos de la genómica comparativa han permitido identificar grandes pérdidas de material genético (deleciones) que caracterizan las diferentes especies de micobacterias. Algunas de estas regiones de diferenciación están restringidas a las especies del complejo de *M. tuberculosis* y permiten diferenciarlas de las micobacterias no patógenas (Palma, 2007).

Entre los métodos de detección y genotipificación de estos microorganismos destaca por su utilidad epidemiológica el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP en sigla inglesa) con las secuencias de inserción

IS6110. Las secuencias de inserción IS6110 se encuentran exclusivamente en el MTBC y son regiones altamente conservadas, es decir carecen de intercambio genético con otras especies de micobacterias. El beneficio de esta característica es que se ha convertido en una herramienta de diagnóstico importante en la diferenciación de especies del MTBC respecto a otras micobacterias (Godreuil, 2007). La genotipificación por RFLP se basa en que las diferentes cepas o aislamientos clínicos presentan variaciones discretas en su material genético que pueden ponerse en evidencia al digerir el ADN con enzimas de restricción de corte frecuente, lo que genera patrones de digestión que permiten diferenciarlas. Las enzimas de restricción más frecuentemente empleadas (*BstEII* y *BclI*) generan múltiples bandas que dificultan el análisis, por lo que se ha generalizado el uso de sondas radiomarcadas derivadas de elementos repetitivos (secuencias de inserción) que varían en cuanto al número de copias y su distribución en los genomas de las micobacterias. Esta técnica requiere partir de cepas aisladas por cultivo, extraer el ADN de las micobacterias, digerirlo con una enzima de restricción que corte el elemento de inserción (generalmente *PvuII* para cortar IS6110), resolver el ADN digerido en agarosa o poliacrilamida, transferirlo a membranas de nitrocelulosa e hibridizar con una sonda para IS6110 marcada radiactivamente, aunque en la actualidad puede emplearse el marcado no radiactivo, con biotina o digoxigenina. Debido a que *M. tuberculosis* contiene generalmente de 8 a 20 copias de IS6110 (depende de la cepa), con este método se detectan de 16-40 bandas, que permiten hacer la diferenciación y clasificación de los aislamientos clínicos. Otra de las secuencias de inserción que se utilizan para la diferenciación de cepas de micobacterias es la IS1081 (1.324 pares de bases), que se encuentra en las cepas del complejo *M. tuberculosis*, pero, debido a que tiene un bajo número de copias, tiene un uso limitado en estudios epidemiológicos; también presenta el inconveniente de no poder diferenciar a *M. bovis*-BCG de otros miembros del complejo *M. tuberculosis* (Palma, 2007).

Espoligotipos (spoligotyping). En este método se aprovecha el alto grado de polimorfismo del locus DR de *M. tuberculosis*. Dicho locus contiene repeticiones directas de 36 pares de bases, separadas por secuencias no repetitivas de 34-41 pares de bases, y

las cepas varían tanto en el número de repeticiones directas como en la presencia o ausencia de algunos de los espaciadores. En el método de espoligotipos las secuencias conservadas de las repeticiones directas se emplean como diana para la amplificación por PCR, y se aprovecha la alta variabilidad en las regiones espaciadoras para obtener diferentes patrones de hibridación de dicho producto amplificado contra oligonucleótidos espaciadores sintéticos que se fijan covalentemente a una membrana de nitrocelulosa (Palma, 2007).

Número variable de repeticiones en tándem (VNTR). Al igual que los minisatélites descritos en genomas eucarióticos, en *M. tuberculosis* se han encontrado 41 regiones de 40-100 pares de bases de secuencias repetitivas dispuestas en tándem, llamadas MIRU (de *Mycobacterial interspersed repetitive units* - unidades repetitivas intergénicas dispersas de micobacterias). De éstas, 12 loci son lo suficientemente polimórficos en cuanto a su número de copias en los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* y ya han comenzado a aplicarse con éxito en estudios epidemiológicos. Además, el uso de MIRU-VNTR para la genotipificación de aislamientos clínicos tiene la ventaja de poder automatizarse (Palma, 2007).

2.8.5 Técnicas radiográficas

Tradicionalmente el diagnóstico de sospecha de tuberculosis pulmonar se establece en individuos con tos crónica y evidencia radiológica de lesiones pulmonares, que con frecuencia se presentan en la zona apical del pulmón derecho (Palma 2007). En la práctica puede verse desde un nódulo solitario pulmonar, infiltrados alveolares difusos, hasta cavitaciones pulmonares (Knechel, 2009).

2.8.6 Análisis con liberación de INF- γ (IGRA: INF- γ release assays)

En fechas recientes se encuentran disponibles en el comercio dos análisis *in vitro* que miden la liberación del INF- γ por las células T en respuesta a la estimulación con antígenos específicos para tuberculosis: QuanfiFERON-TB Gold[®] (Cellestis Ltd.,

Carnegie, Australia) y el T-SPOT.TB (*Oxford Immunotec, Oxford, Reino Unido*). El QuanfiFERON-TB Gold[®] es una prueba que se realiza a partir de sangre total y en la cual se cuantifica mediante ELISA el INF- γ liberado por los linfocitos en respuesta a los antígenos ESAT-6 y CFP-10. El T-SPOT.TB es un ensayo que cuantifica los puntos o manchas producidos por la inmuoabsorción de anticuerpos anti-INF- γ al INF- γ generado por las células mononucleares de sangre periférica del paciente en respuesta a la estimulación a los antígenos arriba mencionados (Fauci *et al.*, 2009; Knechel *et al.*, 2009), ambos ensayos se encuentran aprobados por la FDA.

Los análisis de liberación de INF- γ son más específicos que la reacción cutánea a la tuberculina porque producen menos reactividad cruzada por la vacunación con BCG y la sensibilización por micobacterias no tuberculosas. Otra ventaja potencial de los IGRAs incluye la conveniencia logística, la necesidad de menos consultas para completar la prueba, evitar medicaciones poco fiables y subjetivas, por ejemplo induración cutánea y la capacidad para realizar pruebas seriadas sin inducir fenómenos de reforzamiento como ocurre con el PPD (seroconversión de la prueba cutánea de tuberculina por el reforzamiento de la reactividad con pruebas subsiguientes en personas vacunadas con BCG y en aquellos infectados con otras micobacterias) (Knechel, 2009). A pesar de la ventaja clara de los IGRAs esta prueba no puede diferenciar entre un individuo sano que estuvo expuesto al bacilo y un individuo con infección latente con riesgo de desarrollar la enfermedad (Doherty, 2008). Hasta ahora no hay alguna prueba inmunodiagnóstica que nos dé un poco más de información de que tipo de pacientes tienen más riesgo de desarrollar la enfermedad.

2.9 Proteína HspX (GenRv2031c)

Las proteínas de choque térmico son una familia de proteínas ubicuas y diversas en la naturaleza, cuentan con un papel importante previniendo la agregación de proteínas desnaturalizadas y facilitando posteriormente su reensamblaje por otras proteínas chaperonas. Esta función es particularmente importante en *M. tuberculosis* ya que una vez que ingresa a los pulmones debe soportar ambientes extremos cuando es secuestrado

e ingresado a los fagosomas dentro de los macrófagos alveolares y la posterior formación del granuloma en los pulmones del ser humano (Kennaway, 2005).

La formación del granuloma con la finalidad de contener a *M. tuberculosis* y la subsecuente respuesta inmune conduce a un microambiente de hipoxia, bajo pH, niveles elevados de enzimas hidrolíticas y especies reactivas del oxígeno y nitrógeno; bajo estas condiciones extremas el bacilo responde expresando proteínas para sobrevivir en este ambiente hostil. El número preciso de genes inducidos y su función no se conoce al detalle pero se sabe que involucra la presencia de chaperoninas, transportadores asociados al control del pH, e importación de metabolitos al granuloma además de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos (Doherty, 2008).

Uno de los genes expresados por *M. tuberculosis* en estas condiciones es *Rv2031c* cuyo producto es conocido como α -cristalina, HspX o antígeno de 16 kDa. Este gen parece estar involucrado en el crecimiento de la bacteria en macrófagos y además puede ser expresado en altos niveles cuando la bacteria entra en un estado de latencia, así mismo su expresión se detiene cuando la bacteria entra en crecimiento exponencial (Doherty, 2008; Florczyk *et al.*, 2001).

M. tuberculosis tiene dos proteínas de choque térmico, Acr1 (HspX, proteína homóloga α -cristalina 1, HspX 16.3 o antígeno de 16-kDa/*Rv2031c*) y Acr2 (HrpA/*Rv0251c*). Ambas proteínas son altamente expresadas bajo diferentes condiciones de estrés. (Kennaway, 2005). La proteína Acr1 o HspX resulta de interés en nuestra investigación debido a que es producida por *M. tuberculosis* bajo condiciones en las que se encuentra en el granuloma (<pH, hipoxia y radicales libres) condiciones que lo ubican en el estado de latencia de la bacteria y por lo tanto tuberculosis latente en el individuo.

La expresión de la proteína HspX es controlada por el factor de transcripción DosR que a su vez es regulado por un sensor de cinasa unido a histidina. El factor de transcripción induce la producción de la proteína HspX bajo condiciones de hipoxia y

bajo condiciones de estrés como los generados por S-nitroglutation y etanol pero no bajo choque de calor (Kennaway *et al.*, 2005;Gideon *et al.*, 2011).

La proteína HspX también es uno de los principales antígenos de *M. tuberculosis* reconocidos en el suero de una gran cantidad de pacientes infectados con la bacteria. Se ha planteado, que esta proteína puede ser un elemento importante en el control de la latencia y persistencia de *M. tuberculosis* dado que la sobre-expresión de la proteína inhibe el crecimiento de la bacteria (Smith, 2003).

Basado en lo anterior, en este trabajo nos propusimos evaluar la respuesta inmune humoral específica contra HspX de *M. tuberculosis* como un posible biomarcador para identificar TB latente. Para ello, produjimos la proteína HspX recombinante y una vez obtenida, desarrollamos un método de ELISA para cuantificar los anticuerpos IgG e IgM anti-HspX en sueros de pacientes con TB activa y con presunta TB latente. Nuestros resultados muestran una posible aplicación de este método para el diagnóstico de TB latente, lo cual pudiera representar un avance muy relevante en el control de la tuberculosis.

3. HIPÓTESIS

La respuesta de anticuerpos contra la proteína HspX de *M. tuberculosis* puede ser utilizada como un importante biomarcador para el monitoreo de tuberculosis latente.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad de la respuesta inmune contra la proteína HspX de *M. tuberculosis* como biomarcador en la detección de tuberculosis latente.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Producir la proteína HspX recombinante mediante un sistema de expresión.
2. Purificar la proteína recombinante y analizar su reconocimiento por anticuerpos monoclonales anti-HspX
3. Desarrollar un ensayo de ELISA utilizando la proteína HspX recombinante producida en nuestro laboratorio.
4. Cuantificar anticuerpos IgG e IgM anti-HspX en sueros de pacientes expuestos a *M. tuberculosis*, mediante la técnica de ELISA.
5. Valorar una posible asociación entre la detección de anticuerpos contra la proteína HspX y la identificación de tuberculosis latente.
6. Determinar si la medición de anticuerpos contra la proteína HspX puede ser utilizada como un biomarcador predictivo de tuberculosis latente.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen *Rv2031c* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Para amplificar la secuencia nucleotídica que codifica al gen *Rv2031c* (Figura 1) se diseñaron los oligonucleótidos 5'PHspXF y 3'PHspXR (Tabla 1) tomando como referencia la secuencia nucleotídica depositada en TB database: GB:AL123456 (2010). Para lograr la inserción eficiente de la secuencia en el vector a usar, se incluyó en el diseño la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción HindIII(AAGCTT) para el extremo 5' del oligonucleótido 5'PHspXF, así como la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción XhoI(CTCGAG) en el extremo 5' del oligonucleótido 3'PHspXF. Adicionalmente, el codón de paro (TGA) para la proteína se eliminó en el oligonucleótido 3'PHspXF tomando en cuenta que una vez insertada en el vector esta secuencia evitaría la adición de histidinas a la proteína. Las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción fueron incluidas en el diseño de los oligonucleótidos tomando en cuenta los sitios de corte incluidos en el vector de expresión pET-23b(+) vector elegido por sus características para producir la proteína recombinante.

Los oligonucleótidos constan de 24 nucleótidos de longitud y sus temperaturas medias de alineamiento (T_m) corresponden a 63.5°C y 62.9°C respectivamente, la concentración, porcentaje de GC (%GC) y temperatura media de alineamiento se muestran en la Tabla 1. Para verificar que no se formaran estructuras secundarias, homodímeros y/o heterodímeros entre los oligonucleótidos se utilizó la herramienta SciTools OligoAnalyzer 3.1 de IDT.

5'ATGGCCACCACCCTTCCCGTTCAGCGCCACCCGCGGTCCCTCTTCCCC
 GAGTTTTCTGAGCTGTTTCGCGGCCTTCCCGTCATTCGCCGGACTCCGGCC
 CACCTTCGACACCCGGTTGATGCGGCTGGAAGACGAGATGAAAGAGGG
 GCGCTACGAGGTACGCGCGGAGCTTCCCGGGTTCGACCCCGACAAGGA
 CGTCGACATTATGGTCCGCGATGGTCAGCTGACCATCAAGGCCGAGCGC
 ACCGAGCAGAAGGACTTCGACGGTCGCTCGGAATTCGCGTACGGTTCCT
 TCGTTCGCACGGTGTGCTGCCGGTAGGTGCTGACGAGGACGACATTAA
 GGCCACCTACGACAAGGGCATTCTTACTGTGTGCGGTGGCGGTTTCGGAA
 GGGAAGCCAACCGAAAAGCACATTCAGATCCGGTCCACCAACTGA 3'

Figura 1. Secuencia nucleotídica de ADN del gen *Rv2031c* (GB:AL123456) depositada en el sitio de red TB database. Codifica al antígeno de 16kDa (HspX). Los codones de inicio y de paro se encuentran marcados en **negritas**.

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos					
Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Longitud	nmol	Tm	%GC
PHspXF	AAGCTT ATGGCCACCACCCTTCCC	24	258.7	63.5°C	53.3%
PHspXR	CTCGAG GTTGGTGGACCGGATCTG	24	176.4	62.9°C	62.5%

En rojo se muestran los sitios de restricción agregados a los oligonucleótidos.
nmol corresponde a los nanomoles del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos se resuspendieron a una concentración de 100 μ M empleando agua MilliQ estéril y posteriormente se prepararon soluciones de trabajo a 10 (pmol/ μ L) para las reacciones de PCR. En la mezcla de reacción de PCR se emplearon 12.5 μ L de GoTaq® Colorless Master Mix 2X (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 1 μ L de cada uno de los oligonucleótidos, 1 μ L de templado y finalmente se ajustó la reacción a un volumen final de 25 μ L con agua estéril libre de nucleasas. Se optimizó la reacción de PCR en un gradiente de temperatura de alineamiento entre 60.1-70.2°C. La reacción se llevó a cabo en el termociclador (PCRExPRESS2, Hybaid, U.K) empleando el siguiente programa: 94°C (2 min), 94°C (30 seg), 70.2°C (30 seg), 72°C (45 seg) y 72°C (10 min) por 35 ciclos. El producto de amplificación se almacenó a 4°C hasta su uso. La visualización del producto de amplificación se llevó a cabo empleando un equipo de electroforesis horizontal (Owl B1A EasyCast Thermo Scientific, Portsmouth, NH, USA) en gel de agarosa al 2 % y solución TBE 1X como solución

decorrida. El peso molecular del amplicón se determinó empleando como referencia un marcador de 100pb (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

5.2 Preparación de bacterias calcio-competentes.

Utilizamos las cepas DH5 α y BL21(DE3)pLysS (Promega Corporation, Madison, WI, USA) de *Escherichia coli*. La cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS es ampliamente usada para expresión de proteínas recombinantes en vectores pET y tienen la ventaja de ser deficientes de las proteasas Ion y ompT que pueden degradar proteínas durante la purificación. Presenta altos niveles de expresión y la expresión de la proteína recombinante es fácilmente inducida por IPTG. La T7 ARN polimerasa es altamente selectiva y activa, cuando se induce fuertemente casi todos los recursos de la célula se dirigen hacia la producción de la proteína recombinante.

La cepa de *E. coli* DH5 α es comúnmente empleada para clonación. La mutación endA1 inactiva las endonucleasas intracelulares que degradan el plásmido en los métodos de minipreps. El gen *recA* evita recombinaciones homólogas, el gen Δ (lacZ)M15 es necesario para selección de colonias blancas o azules.

Para la obtención de células competentes se inocularon las bacterias en un tubo con 3 ml de medio LB y se incubaron toda la noche a 37°C. Posteriormente, se tomó 1 mL del cultivo y se inoculó en 100 mL de medio LB y se incubó en las mismas condiciones hasta obtener una densidad óptica (DO) de 0.4 a una absorbancia de 600 nm (Abs₆₀₀). El cultivo se centrifugó a 2,500Xg por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y el paquete bacteriano se resuspendió suavemente en 10 mL de CaCl₂ 0.1 M frío y estéril, cuidando de homogeneizar la suspensión, dejándose en hielo por 30 min. Posteriormente, se centrifugó por 10 min a 2,500Xg y 4°C, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 2 mL de CaCl₂ 0.1 M frío. Las bacterias calcio competentes se diluyeron 1:10 en glicerol estéril frío al 80% y se almacenaron a -70°C en alícuotas de 50 μ L hasta su uso.

5.3 Ligación y transformación del gen *Rv2031c* en el vector de expresión pET-23b(+).

El vector pET-23b(+) (Novagen-Merck KGaA, Darmstadt, Germany) se emplea como un sistema de clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Cuenta con un promotor T7 y una secuencia adicional de seis histidinas que se agregan a la proteína de interés en el extremo C-terminal, lo que permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad usando una columna con Ni²⁺(Fig. 2)

La digestión del vector (preparación para ligación) se realizó agregando 0.1 µL y 0.3 µL de enzimas de restricción *Hind III* y *Xho I* respectivamente, posteriormente se incubó 1 h a 37°C. Una vez preparado el vector se llevó a cabo la ligación realizando la mezcla de reacción dada en la tabla 2.

Tabla 2. Reacción de ligación vector-inserto	
Componentes de la mezcla de reacción	Cantidad
Solución para Ligasa10X (Tris-HCl 200 mM, MgCl ₂ 100 mM, 250 µg/mL de ASB acetilado, pH 7.6	1 µL
DTT 100 mM	1 µL
ATP 10 mM	0.5 µL
50 ng/µL Vector pET preparado	0.5 µL
Inserto	4 µL
Agua libre de nucleasas a un volumen de	2µL
T4 ADN-ligasa, diluída con solución de dilución a 0.2-0.4 Weiss U/µL	1 µL

Para la transformación de las bacterias *E. coli* cepa DH5α calcio-competentes se agregaron 5 µL de cada reacción de ligación a 50 µL de suspensión bacteriana. Los tubos se incubaron por 20 min en hielo y se les dio un choque térmico a 42°C por 50 seg. Inmediatamente, se colocaron los tubos en hielo por 2 min y se añadieron 450 µL de medio LB a cada tubo y se incubó por 1.5 h a 37°C en agitación constante a 250 rpm. Al término de la incubación se tomaron 100 µL de la mezcla de transformación y se sembraron en placas con agar LB con ampicilina (100 µg/mL). Como control positivo de

transformación, utilizamos el vector pNFκB-luc 1 μg/μL en 50 μL de la cepa DH5α. Se sembraron 100 μL de una dilución 1:10 de la mezcla control en placas de agar LB con ampicilina a la concentración antes mencionada. Las placas se incubaron toda la noche (16-24 horas) a 37°C.

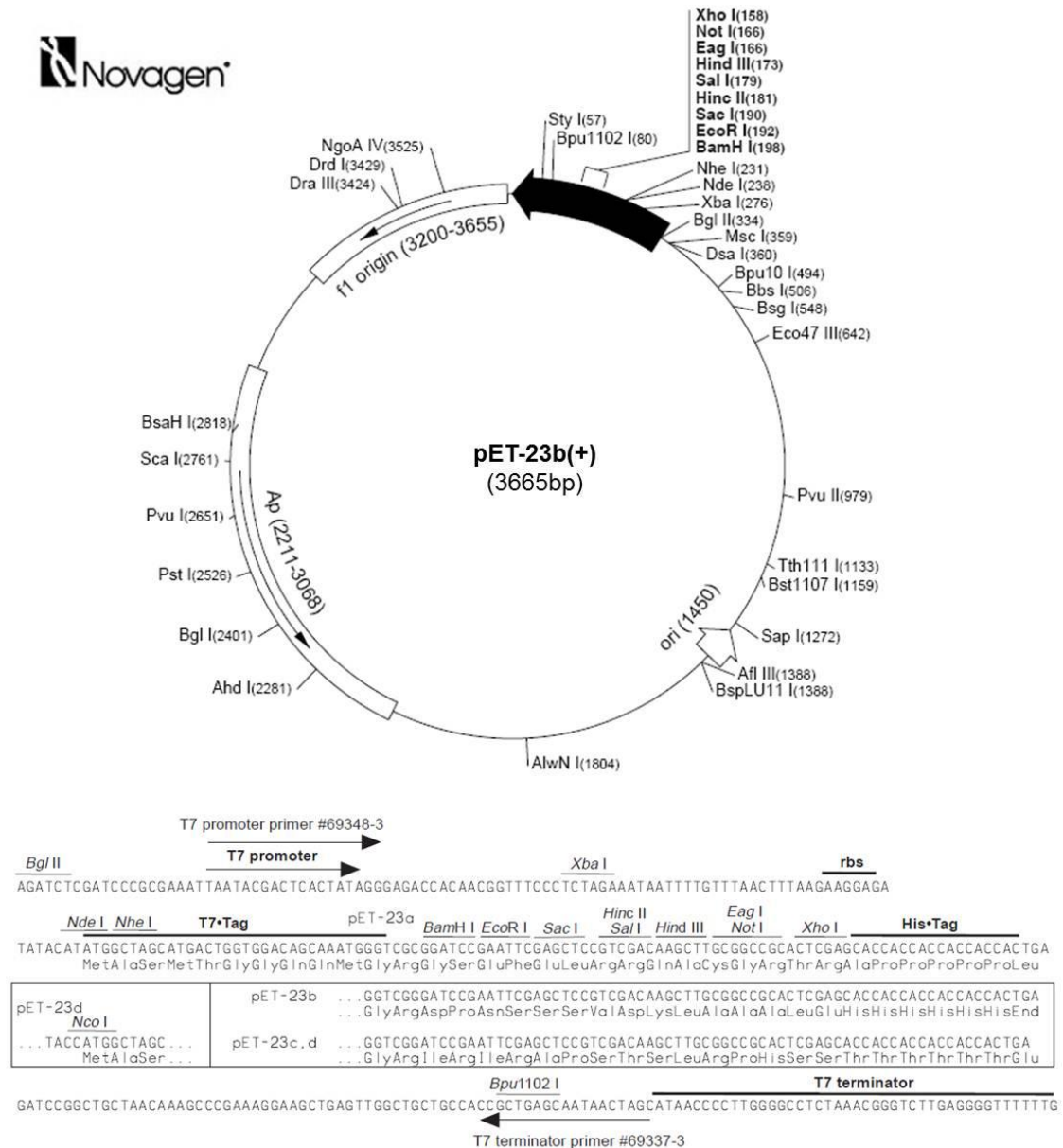


Figura 2. Mapa del vector de expresión pET-23b(+). En él se muestran los sitios múltiples de corte (BamH I – Xho I), una cola N-terminal T7 (T7•Tag), promotor y sitio de transcripción T7, en C-terminal una cola de histidinas (His•Tag), resistencia a ampicilina.

Para obtener el ADN plasmídico con el inserto contenido en las cepas DH5 α se seleccionaron varias colonias crecidas en las placas de agar LB y tomando una porción pequeña de la colonia con un asa bacteriológica en punta y se depositaron individualmente en tubos para microcentrífuga conteniendo cada uno 1 mL de medio LB con ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los tubos inoculados se incubaron toda la noche a 37°C en agitación constante (300 rpm). Al siguiente día, el cultivo se centrifugó por 2 min a 15,982 x g, se descartó el sobrenadante y posteriormente la pastilla se resuspendió en 150 μL de solución I (EDTA 10 mM pH8, Tris-HCl 25 mM pH 8.0), se mezcló en vortex hasta que se homogeneizó la suspensión y se incubó durante 5 min en hielo. Al término de la incubación, se agregaron 150 μL de la solución II (NaOH 0.2N, SDS 1%) y se mezcló por inversión 5 veces. En seguida, se agregaron 150 μL de solución III (KOAc 5M, Ácido acético 11.5 mL), se mezcló por inversión 5 veces y se incubó durante 5 min a -20°C. Posteriormente, se centrifugó durante 5 min a 15,982 x g, el sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril de microcentrífuga, se le agregaron 500 μL de isopropanol al 100%, se mezcló por inversión 5 veces y se incubó por 10 min a -20°C. Al término de la incubación, se centrifugó la muestra por 5 min a 15,982 x g, se descartó el sobrenadante, se agregaron 400 μL de etanol al 70% y se mezcló por inversión. En seguida, se centrifugó por 5 min a 15,982 x g, se retiró el etanol empleando micropipeta y se dejó secar la pastilla incubando a 37°C por 5-10 min o hasta observar que no quedaran restos de etanol. Finalmente se resuspendió la pastilla en 20 μL de agua MilliQ con ribonucleasa [10 mg/mL] (*Promega Corporation, Madison, WI, USA*) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

5.4 Transformación de bacterias calcio-competentes BL21(DE3)pLysS con el plásmido pET-23b(+) conteniendo la secuencia del gen *Rv2031c*.

Debido a capacidad de las bacterias *E. Coli* BL21(DE3)pLysS para producir grandes cantidades de proteínas recombinantes el ADN plasmídico con el inserto contenido en las cepas DH5 α se extrajo para introducirlo en bacterias calcio-competentes BL21(DE3)pLysS, para ello 10 μL de ADN plasmídico con el inserto se

colocaron en 50 μL de una suspensión de bacterias calcio-competentes BL21(DE3)pLysS previamente preparadas como se describe en la sección 5.2. La mezcla se incubó por 20 min en hielo y enseguida se le dio un choque térmico a 42°C por 50 seg. Inmediatamente, los tubos se incubaron por 2 min en hielo y se añadieron 450 μL de medio LB a cada tubo y se incubaron por 1.5 horas a 37°C en agitación constante a 250 rpm. Al término del tiempo de incubación, 100 μL de la mezcla de transformación fueron sembrados en placas con agar LB adicionado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cloranfenicol (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La mezcla de transformación (10 μL) del control positivo se diluyó 1:10 en medio LB y posteriormente fue sembrada en placas con agar LB con ampicilina/cloranfenicol a las concentraciones antes mencionadas. Los cultivos se incubaron toda la noche (16-24 horas) a 37°C. La eficiencia de transformación se verificó mediante la utilización del vector pNF κ B-luc 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (control positivo) obteniendo 1×10^6 colonias transformadas por μg de ADN.

5.5 Método rápido para identificación de plásmido.

Antes de realizar la purificación de ADN plasmídico se realizó un método rápido para confirmar la presencia del plásmido vector con el inserto. Para ello se seleccionaron varias colonias crecidas en las placas de agar LB con ampicilina y cloranfenicol y tomando una porción pequeña de cada colonia con un asa bacteriológica en punta se depositó en tubos individuales conteniendo cada uno 5 mL de medio LB con ampicilina y cloranfenicol. Los tubos inoculados con las colonias se incubaron toda la noche (12-16 horas) a 37°C con una agitación constante de 300 rpm. Posteriormente, el cultivo fue distribuido en alícuotas de volúmenes iguales en tubos para centrífuga de 1.5 mL y se centrifugó a 16,000Xg por 2 min a TA, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se agregaron 20 μL de Fenol y 20 μL de solución DAE (sucrosa y azul de bromofenol). Se mezcló con vortex 1 min aproximadamente y se centrifugó a 16,000Xg por 2 min a TA. Al término de la centrifugación se observan 3 fases: una fase inferior color azul/negro, una intermedia color blanca y una superior azul traslúcida, se tomó la fase superior y se cargaron 15-20 mL en un gel de agarosa al 1%.

5.6 Purificación del ADN plasmídico.

Una vez que se confirmó la presencia del plásmido transformado, el ADN plasmídico fue purificado utilizando el kit de purificación Wizard[®]Plus SV Minipreps ADN Purification System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Para ello se seleccionaron varias colonias crecidas en las placas de agar LB con ampicilina y cloranfenicol y tomando una porción pequeña de cada colonia con un asa bacteriológica en punta se depositó en tubos individuales conteniendo cada uno 5 mL de medio LB con ampicilina y cloranfenicol. Los tubos inoculados con las colonias se incubaron toda la noche (12-16 horas) a 37°C con una agitación constante de 300 rpm. Posteriormente, el cultivo fue distribuido en alícuotas de volúmenes iguales en tubos para centrifuga de 1.5 mL y centrifugados a 9,800Xg, el sobrenadante fue eliminado y posteriormente los tubos para microcentrifuga fueron invertidos sobre una toalla de papel absorbente para remover el exceso de medio; una vez retirado el exceso de medio fueron añadidos 250 µL de solución de resuspendido celular y se mezcló por pipeteo hasta observar que el contenido se resuspendió por completo. Posteriormente, se agregaron 250 µL de solución de lisis celular, se incubó por no más de 5 minutos, en seguida se agregaron 10 µL de solución de fosfatasa alcalina, se mezcló por inversión y se incubó por no más de 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se agregaron 350 µL de solución de neutralización, se mezcló 4 veces por inversión y se llevó a centrifugación por 10 minutos a 13,800Xg a temperatura ambiente. La fase clara del lisado celular fue transferida a una columna de separado y colocada sobre un tubo colector, se centrifugó por un minuto a temperatura ambiente a la máxima velocidad de la microcentrifuga (16,000Xg). Posteriormente, la columna se retiró e insertó en un tubo colector nuevo, mientras que el tubo colector anterior se desechó, se agregaron 750 µL de solución de lavado y se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente. En seguida, se repitió el mismo proceso agregando esta vez 250 µL de solución de lavado a la columna y se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambiente. Para eluir el ADN plasmídico, se agregaron a la columna colocada en un tubo para microcentrifuga estéril, 30 µL de agua libre de nucleasas y posteriormente se centrifugó

1 minuto a temperatura ambiente a velocidad máxima. En seguida, se repitió el mismo procedimiento. Los tubos conteniendo el ADN plasmídico fueron etiquetados conforme al orden de extracción y almacenados a -20°C.

5.7 Secuenciación de la construcción recombinante pET-23b(+)-HspX.

La correcta orientación y presencia del gen *Rv2031c* en el vector de expresión pET-23b(+) (Novagen-Merck KGaA, Darmstadt, Germany) fue comprobada por secuenciación. El ADN plasmídico purificado fue cuantificado en un Nanodrop (ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, DE, USA) y enviado a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología en la UNAM. El equipo empleado para la secuenciación fue Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730 mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing

5.8 Producción a miniescala de la proteína recombinante HspX.

Para la expresión del antígeno recombinante HspX se siguieron las recomendaciones descritas en la sección de Materiales de Producción y SOPs (Production Manuals & SOPs) de la sección de TBVTRM (TB Vaccine Testing and Research Materials Contract) de la Universidad de Colorado (Colorado State University). Se tomaron varias colonias transformadas y una sin transformar, y se inocularon de manera individual en tubos para microcentrífuga con 1.5 mL medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/mL), posteriormente se incubó toda la noche a 37°C con una velocidad de agitación de 200 rpm. Al término de la incubación se tomó 1 mL de cada cultivo y se inocularon en 10 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/mL), y se incubaron a 37°C con una velocidad de agitación de 200 rpm por 2 a 3 horas hasta que los cultivos alcanzaron una densidad óptica (DO) de 0.5 a una absorbancia de 600 nm (DO₆₀₀ 0.5). De los cultivos se tomó 1 mL de muestra y se centrifugó por 2 min a 16,000Xg. Se decantó el sobrenadante

y a los paquetes celulares se les añadió 900 μL de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cloranfenicol (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) más 100 μL de glicerol al 80% y se congelaron a -80°C para su posterior activación. Los cultivos que alcanzaron una DO_{600} de 0.5 se les añadió isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y se incubaron a 37°C con una velocidad de agitación de 200 rpm. Posteriormente, dentro de una campana de flujo laminar se tomaron alícuotas de 1 mL a la 1, 2, 2.5 y 3 horas de incubación. Conforme fueron tomadas las alícuotas éstas fueron centrifugadas a 8,100Xg por 2 min a temperatura ambiente, posteriormente se retiró el sobrenadante, se resuspendió en 100 μL de agua inyectable estéril y se centrifugó a 8,100Xg por 2 min a temperatura ambiente. Nuevamente se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 70 μL de agua inyectable estéril más 70 μL de SDS 4X y se congelaron a -20°C para su posterior análisis mediante electroforesis SDS-PAGE.

5.9 Análisis electroforético de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE.

Para el análisis y visualización de la proteína inicialmente se ensambló el cassette del gel conforme a las especificaciones de la compañía (Owl P8DS Thermo Scientific, Portsmouth, NH, USA), y se procedió a preparar un gel separador a 14% con una mezcla de 2.7 mL de agua MilliQ, 4.7 mL de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 2.5 mL de solución Tris-HCl 1.5 M pH8.8, 0.1 mL de SDS al 10%, 100 μL de persulfato de amonio (PSA) al 10% y 10 μL de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilediamina), inmediatamente empleando una micropipeta se aplicaron 4.5 mL de la mezcla del gel separador al cassette con un separador de 1mm, en seguida se tomaron 500 μL de isopropanol absoluto y se agregaron sobre la mezcla del gel separador. Después de 15 minutos se invirtió el gel para remover el isopropanol. Posteriormente se preparó la mezcla correspondiente al gel concentrador al 10% en la cual se mezclaron 4.1 mL de agua MilliQ, 3.3 mL de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 2.5 mL de solución Tris-HCl 0.5M pH6.8, 0.1 mL de SDS al 10%, 100 μL de PSA al 10% y 10 μL de TEMED; la mezcla se vació hasta el límite del vidrio empleando una micropipeta e inmediatamente

con mucho cuidado se colocó el peine. Una vez polimerizado el gel se colocó dentro de la cámara vertical de electroforesis (Owl P8DS Thermo Scientific, Portsmouth, NH, USA) y se ensambló. Ya ensamblado, se retiró el peine y se lavaron los pocillos con solución de corrida 1X para eliminar la acrilamida que no haya polimerizado. Posteriormente se agregó la solución de corrida 1X hasta cubrir el gel para después cargar en los carriles las muestras que previamente fueron preparadas mezclando en una proporción 1:1 la muestra con solución de desnaturalización 2X y calentadas a 95°C por 10 min. Las muestras depositadas en los carriles del gel de poliacrilamida se corrieron a 80V por aproximadamente 2.5 horas.

5.10 Tinción del gel de poliacrilamida.

Una vez concluida la electroforesis, el gel se sacó con cuidado y se colocó en solución de azul de coomassie (0.05%) durante toda la noche y posteriormente se depositó en solución decolorante I (400 mL metanol, 70 mL ácido acético glacial, aforando a 1 L) durante un par de horas o hasta detectar las bandas, en seguida se transfirió el gel a la solución decolorante II (30 mL metanol, 70 mL ácido acético glacial, aforando a 1L) hasta observar las bandas de interés bien definidas. Una vez decolorado el gel se colocó dentro del papel celofán dulce previamente humedecido con agua de la llave y se colocó entre dos marcos de acrílico para secarlo a temperatura ambiente durante toda la noche y posteriormente escanearlo para su análisis.

5.11 Producción del antígeno recombinante HspX.

De las clonas positivas (conteniendo el inserto) que fueron almacenadas en glicerol a -80°C (sección 5.8) se eligió una clona para activarla en 3.5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/mL), se incubó toda la noche a 37°C a una velocidad de agitación de 200 rpm. Se tomaron 3 mL del cultivo y se inocularon en 300 mL de medio LB más ampicilina (100µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/mL), en seguida, se incubaron a 37°C con una velocidad de agitación de 200 rpm. El

cultivo fue detenido hasta alcanzar una DO_{600} 0.5. Una vez alcanzada la densidad óptima deseada se les añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se llevó a incubar a 37°C con una velocidad de agitación de 200 rpm por 3 horas. Posteriormente, el cultivo fue distribuido en cantidades iguales en tubos cónicos de 50 mL y centrifugado a 8,100Xg por 10 min. El sobrenadante se almacenó para analizar posible presencia de proteínas; el botón celular se resuspendió en 15 mL de solución de unión 1X (Novagen-A Brand of EMD Biosciences, Inc, Darmstadt, Germany), DNAasa en una proporción de 30 µL por cada 50 mL, lisozima a una concentración final de 200 µg/mL, se mezcló por inversión y se almacenó a -20°C para continuar con el proceso de purificación.

5.12 Purificación del antígeno recombinante HspX.

La purificación de la proteína se realizó empleando el kit His•Bind (Novagen-A Brand of EMD Biosciences, Inc, Darmstadt, Germany). La resina His•Bind es empleada para purificar mediante cromatografía de quelación proteínas que presentan cola de histidinas. La cola de histidinas presente en las proteínas se une a cationes de Ni^{2+} que han sido inmovilizados en la resina His•Bind.

La muestra almacenada a -20°C en el paso anterior se retiró de congelación y se incubó a 30°C por 2 horas. Una vez descongelada la muestra se rompió el contenido celular empleando el sonicador Ultratip Labsonic System (Lab-Line Instruments, Inc, Melrose Park, IL).

El proceso de sonicación se llevó a cabo en baño de etanol frío con ciclos de 60 seg con una amplitud de 80 y un tono entre 40-100, seguidos de intervalos de 90 seg en hielo, este procedimiento se repitió hasta observar que la viscosidad del lisado cambió a una consistencia más líquida.

El paquete celular sonicado se centrifugó a 16,000 Xg por 60 min a 4°C empleando una ultracentrífuga Avanti™ J-25I (Beckman Instruments, Inc, Palo Alto, California, U.S.A). Posteriormente, el sobrenadante post-centrifugación se filtró a través de una membrana con poro de 0.45 µM (Nalgene-Thermo Fisher Scientific, Inc), se

vació en un tubo cónico de 50 mL. Del filtrado se tomó una alícuota de 1 mL para determinar concentración de proteínas y el resto se almacenó a -20°C. Al día siguiente la muestra se descongeló mientras se prepararon las columnas para purificar la proteína.

Para preparar la columna, la resina His•Bind se mezcló por inversión hasta obtener una suspensión homogénea, en seguida empleando una micropipeta se transfirió a la columna la cantidad de resina necesaria (2mL) para purificar la concentración de proteínas presentes en la muestra tomado en cuenta que 2.5 mL de resina sedimentada puede ser empleada para purificar hasta 20 mg de proteínas. Una vez aplicada la resina en la columna se dejó sedimentar por gravedad y se eliminó la solución de almacenamiento, quedando 1 mL de resina empaquetada. Después, se procedió a realizar una secuencia de 3 lavados con 1 volumen de agua desionizada estéril, para posteriormente cargar la resina con 5 volúmenes de solución de carga 1X y equilibrar con 3 volúmenes de solución de unión 1X. Al terminar la elución de la solución de unión se colocó en la columna la muestra y se dejó fluir hasta que la cantidad total de muestra pasó por la columna, tomando en cuenta que el flujo de corrida es aproximadamente de 1 hora por cada 10 volúmenes en una purificación eficiente. Cuando la muestra pasó por completo por la columna ésta se lavó con 10 volúmenes de solución de unión 1X seguido de 6 volúmenes de solución de lavado 1X. Para coleccionar la proteína el tubo de recolección se cambió por un tubo cónico nuevo y estéril de 15 mL y se procedió a añadir 6 volúmenes de solución de elución 1X. Finalmente, se agregaron 6 volúmenes de solución de remoción 1X para el lavado de la columna y se selló con parafilm para almacenamiento. La proteína purificada se almacenó a -20°C hasta su uso.

El análisis y visualización de las proteínas en cada paso del proceso de purificación se realizaron de la misma forma al procedimiento mencionado en el paso 5.9. Para lo anterior, se tomaron 10 µL de las alícuotas tomadas durante el proceso de purificación del antígeno recombinante HspX y se prepararon mezclando en una proporción 1:1 de muestra con solución de desnaturalización, posteriormente fueron calentadas a 95°C por 10 min y depositadas en los carriles del gel de poliacrilamida y se corrió a 80V por aproximadamente 2.5 horas. Una vez concluida la electroforesis, el gel se sacó con

cuidado y se realizó la tinción del gel de poliacrilamida como se describe en el paso 5.10.

5.13 Diálisis de la proteína recombinante.

La proteína recombinante purificada mediante cromatografía de quelación se dializó empleando el cassette Slide-A-Lyzer® G2 (Thermo Scientific Rockford, USA) con un tamaño de poro de 3,500 MWCO. Durante todo el proceso es importante utilizar guantes para la manipulación de los cassettes. Para hidratar la membrana el cassette fue sumergido en agua MilliQ estéril por 2 min, para luego sacarlo del agua y retirar el exceso de líquido con sanitas teniendo cuidado de no tocar la membrana. Posteriormente el cassette fue abierto girando la tapa en sentido contrario a las manecillas del reloj y sacándola hacia arriba. La proteína recombinante se agregó empleando una pipeta lineal estéril de 10 mL, se eliminó el aire presionando cuidadosamente la membrana y se colocó la tapa ahora en sentido de las manecillas del reloj. El cassette fue insertado verticalmente en un vaso de precipitado de 2 L conteniendo bicarbonato de amonio a 10 mM, la diálisis se efectuó durante 12 horas a 4°C con recambio de solución de diálisis con un mínimo de tres veces para asegurar la remoción completa de contaminante. Posteriormente, el cassette fue retirado, se removió la tapa y se recuperó la proteína recombinante utilizando una pipeta lineal estéril de 10 mL. Los remanentes de dializado se recuperaron con jeringa de 10 mL mediante punción en uno de los extremos laterales del cassette (Figura 3).

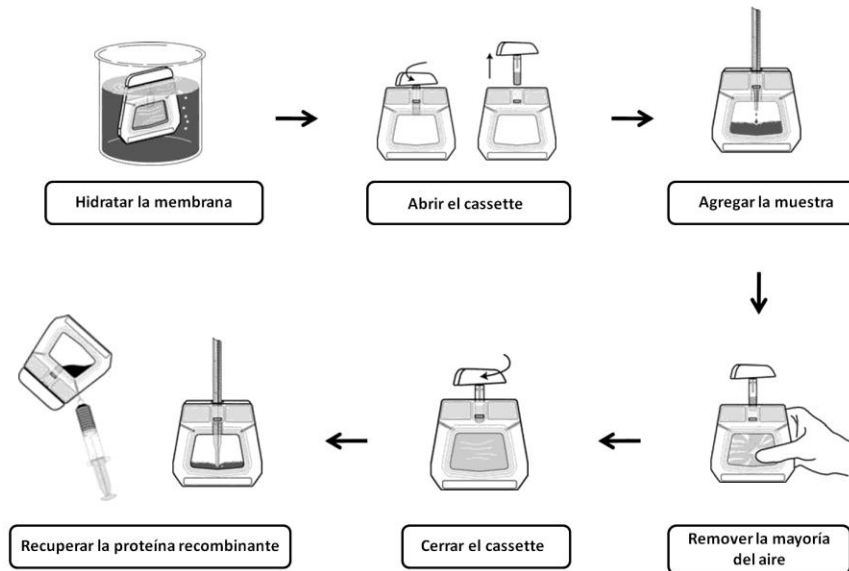


Figura 3. Diálisis de la proteína recombinante. La proteína purificada mediante cromatografía de quelación se dializó en un cassette Slide-A-Lyzer® G2 (Thermo Scientific Rockford, USA) con un tamaño de poro de 3,500 MWCO.

5.14 Liofilizado de las proteínas purificadas.

Para el proceso de liofilización el volumen de muestra obtenida en el proceso de dializado se depositó en alícuotas iguales en viales de vidrio estériles previamente pesados. Antes de liofilizar la muestra se congeló con un baño de acetona al 100% con hielo seco en donde las muestras fueron sumergidas y agitadas hasta observar que se encuentren completamente congeladas. Una vez congeladas las muestras rápidamente se introdujeron en las bandejas del liofilizador Freezone 4.5 (Labconco) donde permanecieron un tiempo aproximado de 3-6 horas hasta observar que el contenido se encuentre completamente seco. Finalmente se pesaron nuevamente los viales para obtener el peso seco de la proteína y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

5.15 Inmunodetección de la proteína recombinante mediante Western Blot.

La proteína recombinante fue corrida mediante electroforesis SDS-PAGE como se describe en el paso 5.8. Terminada la electroforesis, el gel de poliacrilamida fue retirado y sumergido en solución de transferencia por 10-30 min a temperatura ambiente. La membrana de transferencia (Immobilion™-Millipore Corporation, MA, USA) fue

recortada con las dimensiones de ancho y largo que corresponden al gel. Mientras tanto, los filtros de transferencia fueron sumergidos en solución de transferencia por 30 seg y la membrana se sumergió en metanol por 5 min, seguido de 2 min en agua Milli-Q y 10 min en solución de transferencia. Los componentes de la transferencia fueron ordenados comenzando con el ánodo: una esponja, seguido de un papel filtro previamente humedecido, posteriormente la membrana de transferencia, gel de poliacrilamida, un segundo papel filtro sobre el gel y en seguida una esponja (Fig. 4). El sándwich se cerró y se colocó en la cámara, posteriormente la cámara de electroforesis fue llenada con solución de transferencia hasta cubrirla totalmente y se dejó correr la electroforesis bajo la condiciones de corrida de 35V a 4°C toda la noche.

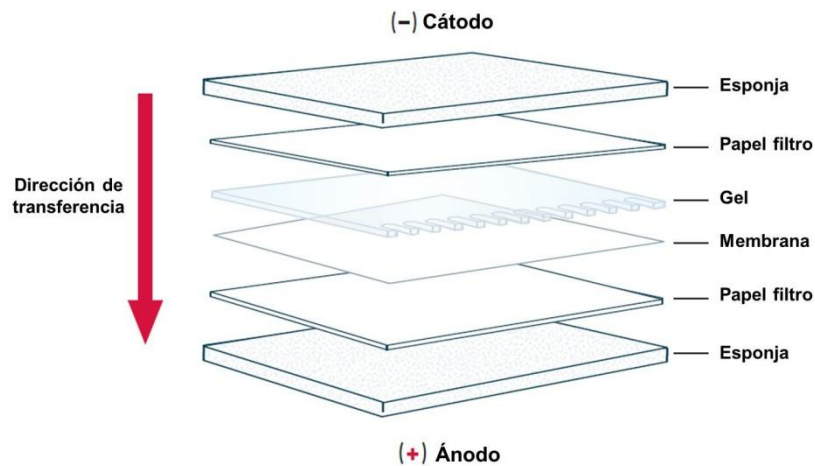


Figura 4. Diagrama para el ensamblaje de la transferencia de proteínas. El diagrama muestra el acomodo y el orden de cada uno de los componentes con respecto a los electrodos en la cámara húmeda de transferencia para realizar la inmunodetección mediante Western-Blot (Millipore-Protein blotting handbook).

Terminando la transferencia, la membrana fue retirada y lavada 5 veces con PBST 1X por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fue bloqueada con solución PBST 1X con leche descremada al 5% y Tween 20 al 0.1% e incubada toda la noche a 4°C con agitación constante a 150 rpm aproximadamente. Terminando el bloqueo se lavó 5 veces con PBST 1X por 10 minutos a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo primario anti-HspX (NIH biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository, NIAID, NIH: Monoclonal Anti-*M.tuberculosis* HspX

Gene *Rv2031c*, Clone IT-20, TB68, produced *in vitro*, NR-13607) disuelto en PBST 1X a una dilución 1:100 toda la noche a 4°C con agitación constante a 150 rpm. Al término de la incubación se realizaron 5 lavados de 10 min con TBS-T 1X. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón (abcam-Goat polyclonal Secondary Antibody to Mouse IgG-H&L HRP) disuelto 1:1,500 en PBS-T 2 horas a 4°C en agitación constante a 150 rpm. Al término de la incubación se dieron 5 lavados de 10 min cada uno con PBS-T 1X. En seguida la membrana se puso en contacto con 500 µL (V/V) de los sustratos de quimioluminiscencia (solución 1 y 2) (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) por 3 min aproximadamente. El exceso del reactivo fue eliminado tomando la membrana con cuidado con las pinzas y colocándola sobre una servilleta y se colocó la membrana con las proteínas hacia abajo sobre plástico adherente. La membrana se expuso dentro del cassette por varios tiempos (15 y 30 segundos) hasta detectar las bandas de interés sobre la película fotográfica (Daigger, IL, USA). La película fue secada con cuidado y colocada por 1 min en solución reveladora (Estman Kodak Company, NY, USA) agitando suavemente, después fue enjuagada con agua corriente por 1 min.

5.16 Análisis de interferencias por reacción cruzada con proteínas homólogas de micobacterias del complejo tuberculosis y micobacterias atípicas.

Debido a que las proteínas de choque térmico (alfa-cristalinas) pueden encontrarse en la naturaleza y en otros microorganismos o células eucariotas (Kennaway, 2005), se realizó inicialmente un análisis de “*protein blast*” para identificar proteínas homólogas a la proteína HspX (*Rv2031c*). Posteriormente empleando el programa *DNAstarse* compararon las secuencias de proteínas seleccionadas y se obtuvieron porcentaje de similitud y divergencia con respecto a la proteína HspX en estudio. Los microorganismos incluidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Microorganismos incluidos en el porcentaje de identidad

1	NP_216547.1	HspX gene product [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv]
2	NP_855707.1	Heat shock protein hspX [<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97]
3	YP_978140.1	Heat shock protein hspX [<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Pasteur 1173P2]
4	YP_003031913.1	Heat shock protein hspX [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN 1435]
5	ZP_04749296.1	Heat shock protein [<i>Mycobacterium kansasii</i> ATCC 12478]
6	YP_001851758.1	Heat shock protein HspX [<i>Mycobacterium marinum</i> M]
7	ZP_06852440.1	Heat shock protein hspX [<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i> ATCC BAA-614]
8	ZP_04750177.1	Heat shock protein [<i>Mycobacterium kansasii</i> ATCC 12478]
9	YP_888221.1	Hypothetical protein [<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155]
10	YP_954724.1	Heat shock protein Hsp20 [<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1]
11	NP_962635.1	Hsp [<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> K-10]
12	ZP_05218861.1	Hsp20/alpha crystallin family protein [<i>Mycobacterium avium subsp. avium</i> ATCC 25291]
13	ZP_05225418.1	Hsp20/alpha crystallin family protein [<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950]
14	NP_000385.1	Alpha-crystallin A chain [<i>Homo sapiens</i>]
15	NP_001876.1	Alpha-crystallin B chain [<i>Homo sapiens</i>]
16	NP_653218.1	Heat shock protein beta-6 [<i>Homo sapiens</i>]
17	YP_002503848.1	Hypothetical protein MLBr_01795 [<i>Mycobacterium leprae</i> Br4923]
18	Q57733.1	RecName: Full=Small heat shock protein HSP16.5
19	AAB85357.1	Heat shock protein, class I [<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> str. Delta H]
20	NP_143673.1	Hypothetical protein PH1842 [<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3]
21	NP_148279.2	Small heat shock protein [<i>Aeropyrum pernix</i> K1]
22	NP_070125.1	Heat shock protein 20 [<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304]
23	NP_070795.1	Heat shock protein 20 [<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304]
24	CAC11613.1	Small heat shock protein (hsp20) related protein [<i>Thermoplasma acidophilum</i>]
25	CAC11993.1	Small heat shock protein (hsp20) related protein [<i>Thermoplasma acidophilum</i>]
26	AAG20020.1	Small heat shock protein [<i>Halobacterium sp.</i> NRC-1]
27	AAG20865.1	Heat shock protease protein [<i>Halobacterium sp.</i> NRC-1]
28	NP_213880.1	Small heat shock protein (class I) [<i>Aquifex aeolicus</i> VF5]
29	BAB13269.1	16 kDa heat shock protein A [<i>Buchnera aphidicola</i> str. APS (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)]
30	CAA46374.1	Heat shock protein [<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824]
31	P12809.1	RecName: Full=18 kDa antigen; AltName: Full=HSP 16.7
32	AAG06514.1	Heat-shock protein IbpA [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]
33	CAA14735.1	Heat shock protein (hsp22) [<i>Rickettsia prowazekii</i> str. Madrid E]
34	BAA16996.1	16.6 kDa small heat shock protein, molecular chaperon [<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803]
35	NP_228185.1	Heat shock protein, class I [<i>Thermotoga maritima</i> MSB8]
36	AAF93196.1	16 kDa heat shock protein A [<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar El Tor str. N16961]
37	AAF85033.1	Low molecular weight heat shock protein [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]
38	P96193.1	RecName: Full=16 kDa heat shock protein B
39	S49042	Global stress protein gspA - <i>Legionella pneumophila</i>
40	CAA67831.1	Heat shock protein [<i>Oenococcus oeni</i>]
41	CAB99442.1	HspA protein [<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1]
42	Q53595.1	RecName: Full=18 kDa heat shock protein; AltName: Full=HSP 18
43	BAA32501.1	HspA [<i>Thermosynechococcus vulcanus</i>]

5.17 Obtención de lisados totales de micobacterias.

En base a los resultados obtenidos por bioinformática, empleando el programa DNAsar, se identificaron los microorganismos con más alto porcentaje de identidad y se

procuró conseguir la mayor cantidad de las cepas seleccionadas, así mismo, se agregaron cepas de micobacterias atípicas para ser incluidas en la evaluación (Tabla 4).

Una vez que se consiguieron las cepas de micobacterias se cosecharon e incubaron en frascos de cultivo totalmente cerrados en 30 mL de medio Middlebrook 7H9 con OADC por un tiempo aproximado de 20 días a 37°C. Al término de la incubación se homogenizó la suspensión en vórtex y se dividió en alícuotas iguales en tubos cónicos para posteriormente centrifugar a 8,100Xg por 5 min a TA. Al término de la centrifugación los botones celulares fueron lavados con aproximadamente 10 mL de PBS centrifugando 5 min a 8,100Xg, se resuspendieron en 1 mL de TBS 100 mM pH 7.4, 0.5% de Tritón X-100 e inhibidor de proteasas libre de EDTA (Boehringer Mannheim, Alemania), finalmente se transfirió a un tubo con perlas FastPrep. La suspensión celular se sometió a 3 ciclos de agitación de 45 seg a una velocidad de 5 en el FastPrep, dejando reposar el tubo en hielo por al menos 2 min entre cada ciclo, posteriormente, la muestra fue centrifugada a 15,900Xg por 8 min a TA. El sobrenadante fue dividido en alícuotas de 200 µL y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Tabla 4. Lisados celulares

1	<i>M. tuberculosis H37Rv</i>
2	<i>M. bovis</i>
3	<i>M. bovis 2296</i>
4	<i>M. scrofulaceum</i>
5	<i>M. kansasii</i>
6	<i>M. intracellulare</i>
7	<i>M. smegmatis</i>
8	<i>M. avium</i>
9	<i>BL21(DE3)pLysS</i>
10	<i>M. tuberculosis genotipo Beijing</i>

5.18 Inmunodetección de la proteína HspX en lisados celulares de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* y micobacterias atípicas.

Los lisados totales de micobacterias se corrieron en gel de poliacrilamida de acuerdo a las condiciones mencionadas en el paso 5.9, posteriormente se realizó la

transferencia de las proteínas de los lisados celulares a una membrana de PVDF para posteriormente realizar los pasos para la inmunodetección de la proteína HspX como se menciona en el paso 5.15. Para ello se emplearon el anticuerpo primario anti-HspX (NIH biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository, NIAID, NIH: Monoclonal Anti-*Mycobacterium tuberculosis* HspX Gene *Rv2031c*, Clone IT-20, TB68, produced *in vitro*, NR-13607) y el anticuerpo secundario anti-ratón (abcam-Goat polyclonal Secondary Antibody to Mouse IgG-H&L HRP). Los microorganismos incluidos se muestran en la Tabla 4.

5.19 Identificación de anticuerpos IgG e IgM contra el antígeno de 16-kDa mediante la técnica de ELISA.

Las muestras de suero empleadas para la determinación de anticuerpos fueron proporcionadas por el Centro de Investigación, Prevención y Tratamiento de Infecciones Respiratorias(CIPTIR) del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”. Las muestras obtenidas fueron obtenidas previo a una carta de consentimiento informado firmada por los individuos incluidos. La información respecto a los aspectos éticos y formatos empleados se encuentran en poder del CIPTIR.

En el estudio se incluyeron 101 muestras de individuos mayores de 18 años que fueron clasificadas en tres diferentes grupos basándonos principalmente en la prueba de tuberculina (PPD). Los tres grupos clasificados se identificaron como no infectados, TB activa y TB latente. Cabe mencionar que la TB latente pudiera ser clasificada como TB latente previa o TB latente reciente.

La prueba de tuberculina se tomó como positiva a partir de una induración mayor a 10 mm. En algunos grupos de estudio se pudo obtener información adicional como resultados de BAAR, cultivo, QuantiFERON[®], uso de drogas, TB familiar, diabetes mellitus, transfusiones, alcoholismo, cáncer pulmonar, neumonía, IL-10 y COMBE (contacto con personas con TB activa). El cultivo, BAAR y QuantiFERON[®] positivos ayudó a establecer el grupo identificado como TB activa. Las personas con PPD negativa, ausencia de tos persistente por más de dos semanas o ausencia de signos y síntomas de tuberculosis fueron agrupadas como no infectados. Las personas con PPD

positiva, COMBE positivo, con o sin antecedentes de TB familiar fueron agrupadas en la clasificación de TB latente.

Empleando microplacas recubiertas con níquel (Thermo Scientific Nunc-Immobilizer Nickel-Chelate) y la proteína recombinante HspX-His producida en el laboratorio se estandarizó una prueba de ELISA para la identificación de anticuerpos de tipo IgG e IgM en muestras de suero de individuos con y sin tuberculosis. Las microplacas fueron pre lavadas con PBST (PBS + Tween[®] 20 0.05%) tres veces con 300 μ L/pozo, posteriormente se agregaron a cada pozo 50 μ L de proteína recombinante HspX-His disuelta en KCl 0.01 M y ajustada a una concentración de 10 μ g/mL, dejándolas en incubación a 4°C toda la noche y en agitación constante (450 rpm). Al siguiente día se descartó el contenido de la placa, se lavaron los pozos 3 veces con 300 μ L de PBST y se agregaron 300 μ L de solución de bloqueo al 5% y se dejó incubar por 2 horas a TA. Al término de la incubación se lavaron los pozos 3 veces con 300 μ L de PBST y se agregaron 100 μ L de anticuerpo primario (suero de paciente dilución 1:50 en solución de bloqueo 1%) a cada pozo, una vez aplicada la muestra y controles (IgM o IgG adherida a la placa) la placa se incubó a 37°C por 90 min. Al término de la incubación se descartó el contenido de la placa, se lavó 3 veces cada pozo con 300 μ L de PBST y se agregaron 100 μ L de anticuerpo secundario (Tabla 5) en solución de bloqueo al 1% y se incubó 1 hora a 37°C. Al término de la incubación se desechó el contenido y se lavó la placa 3 veces con 300 μ L de PBST. Antes de comenzar el siguiente paso se disolvió una pastilla OPD-Urea-H₂O (Sigma Fast[™] OPD) en 20 mL de agua desionizada y de esta solución se agregaron 100 μ L a cada pozo y se incubó 30 min a TA en oscuridad. Al término de los 30 minutos se detuvo la reacción agregando 50 μ L de H₂SO₄ 3M a cada pozo y se procedió a leer la placa a una longitud de onda de 492 nm.

Cada muestra fue analizada por triplicado. El coeficiente de variación entre las réplicas fue menor al 10%. Cada muestra fue pre-diluida en solución de bloqueo 1%) para evitar reacción cruzada o adherencia inespecífica de proteínas a la placa.

Tabla 5. Anticuerpos secundarios					
Anticuerpo	Dilución	Clona	Origen	Conjugado	Compañía
Anti-human IgM (μ chain specific)	1:10000	Policlonal	Cabra	Peroxidasa	Sigma-Aldrich
Anti-human IgG (whole molecule)	1:30000	Policlonal	Cabra	Peroxidasa	Sigma-Aldrich

5.20 Análisis estadístico

A partir de los valores de densidad óptica obtenidos en las pruebas de ELISA se calcularon las medidas de tendencia central y de variabilidad. Para evaluar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de K^2 de D'Agostino-Pearson. La diferencia entre los grupos se analizó empleando la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn. Para diferenciar entre tuberculosis latente, activa y no infección en pacientes expuestos a *M. tuberculosis* se determinó un valor de corte utilizando la técnica ROC. En todas las pruebas de hipótesis se consideró un nivel de significancia de 0.05 que posteriormente fue corregido utilizando el método de Bonferroni (0.0083).

6. RESULTADOS

6.1 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen *Rv2031c* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Para el diseño de los oligonucleótidos se tomó en cuenta que cumplieran con los criterios mostrados en la tabla 7. El diseño y análisis de los oligonucleótidos diseñados se realizaron con el programa SciTools OligoAnalyzer 3.1 de IDT. Una vez confirmadas las características de los oligonucleótidos se realizó una evaluación preliminar haciendo una PCR virtual empleando el programa *AmplifiX 1.5.4*.

Tabla 6. Criterios de selección para el diseño de oligonucleótidos

Tamaño de oligonucleótido	23-30 pb
Tamaño de amplicón resultante	250-1200 pb
Temperatura de alineamiento (T _m : melting point)	35-65°C
Apareamiento en horquilla (hairpin)	$\Delta G \leq -6$
Autoapareamiento (self-dimer y hetero-dimer)	$\Delta G \leq -6$

Los oligonucleótidos diseñados se evaluaron empleando ADN de *M. tuberculosis* y un plásmido control pUC19-*Rv2031c* empleando el programa de corrida mencionado con anterioridad. La visualización del producto de amplificación se llevó a cabo empleando electroforesis horizontal (Owl B1A EasyCast Thermo Scientific, Portsmouth, NH, USA) en gel de agarosa al 2 % y solución TBE 1X como solución de corrida (Fig 5). El peso molecular del amplicón se determinó empleando como referencia un marcador de 100pb (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

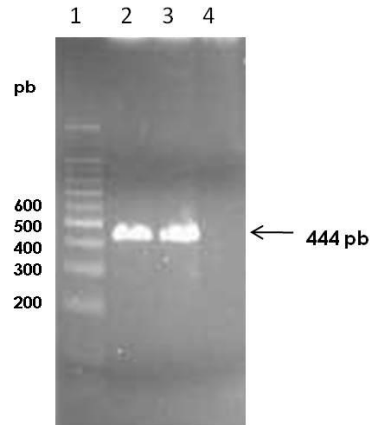


Figura 5. Productos de amplificación. Gel de agarosa al 1.5% en el que se muestran marcador de 100pb (carril 1), producto de amplificación a partir de ADN de *M. tuberculosis* (carril 2), producto de amplificación a partir de ADN plasmídico *pUC19-Rv2031c* (carril 3), control negativo (carril 4). Los productos de amplificación corresponden a 444 pb.

6.2 Clonación del fragmento codificante al gen *Rv2031c* en el vector de expresión pET-23b(+).

Previo a la caracterización del inserto con enzimas de restricción, se realizó un método rápido para la identificación de las clonas conteniendo el plásmido con el inserto y una PCR directa de las colonias para comprobar la presencia del inserto en las bacterias transformadas (Figura 6 y 7).

En la figura 6 se puede observar la presencia del plásmido insertado conteniendo el vector (pET 23(+)-*Rv2031c*); se observa además el plásmido original bacteriano de mayor peso molecular que el vector insertado. La figura 7A muestra el producto de amplificación de 444 pb de la clona 1-1, 8-1 y 8-2. La figura 7B muestra la caracterización de la clona recombinante pET-23b(+)-*Rv2031c* empleando las enzimas de restricción *Xho I* y *Hind III*. La digestión del plásmido que corresponde a la clona 1-1 muestra un fragmento liberado de 438 pb y en la parte superior se puede observar una banda correspondiente al vector con inserto y vector sin inserto respectivamente.

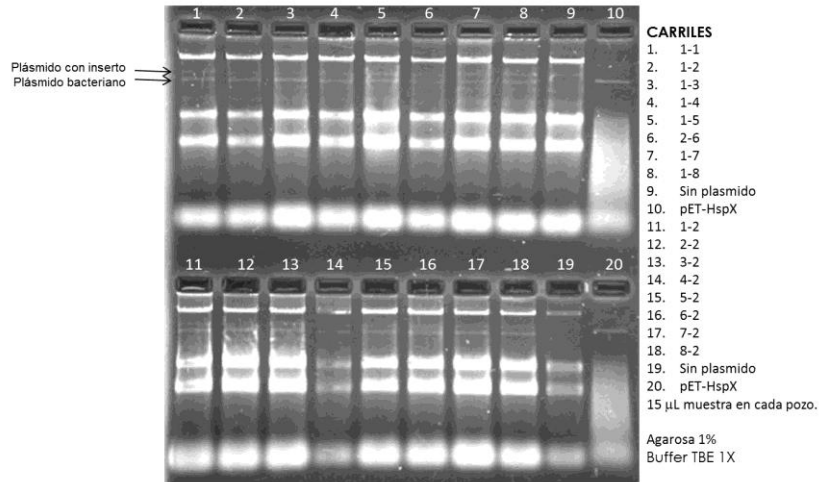


Figura 6. Método rápido para identificación de plásmido. Se puede observar la presencia del plásmido bacteriano y el plásmido insertado conteniendo el vector (pET 23(+)-*Rv2031c*). Carril 1-8 y 11-18 Clonas transformadas, en carril 9 y 19 *E.coli BL21(DE3)pLysS* (*Promega Corporation, Madison, WI, USA*) sin transformar, carriles 10 y 20 vector pET 23(+)-HspX .

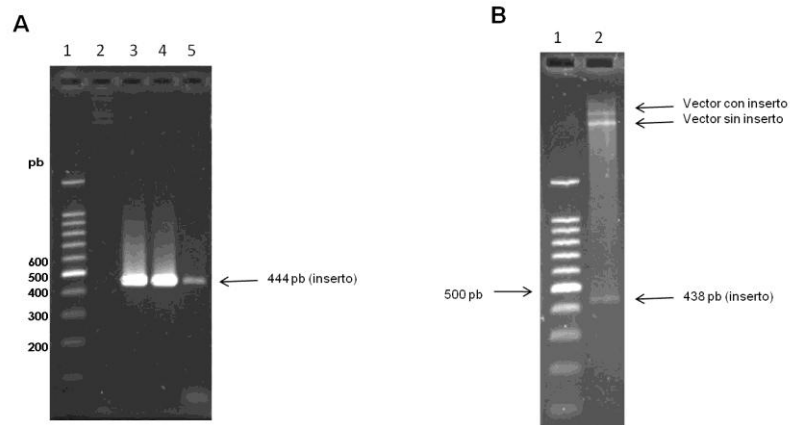


Figura 7. Presencia del inserto en el vector pET-23b(+). En la figura 7A se muestran los productos de amplificación de las clonas 1-1, 8-1 y 8-2 (carril 3, 4 y 5 respectivamente), marcador de 100 pb (carril 1) y control negativo (carril 2). En la figura 7B se observa marcador de 100 pb (carril 1) y vector purificado y digerido con enzimas de restricción *XhoI* y *HindIII* (carril2). Ambos geles fueron corridos y visualizados en gel de agarosa al 2% en TBE 1X.

6.3 Secuenciación de la construcción del plásmido recombinante pET-23b(+)-*Rv2301c*.

La correcta orientación y presencia del gen fue comprobada por secuenciación. El ADN plasmídico correspondiente a la clona 1-1 se purificó empleando el kit de

purificación Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) y posteriormente fue enviado a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología en la UNAM. En la Figura 8 se muestra la alineación realizada en el programa Clustal W 2.1 de las secuencias recibidas respecto a la secuencia codificante del gen *Rv2031c* (HspX) y una sección del vector pET-23b(+).

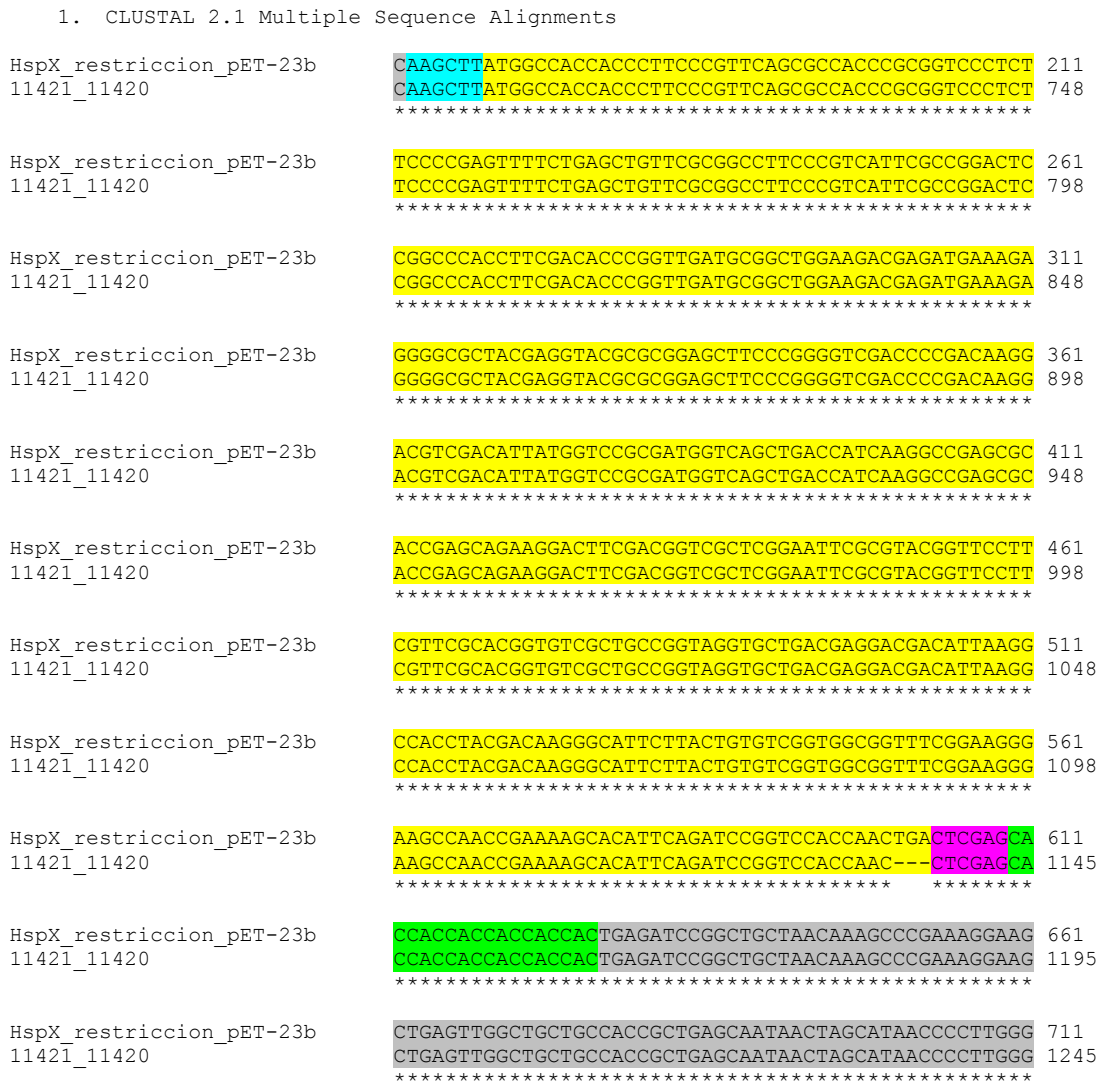


Figura 8. Alineamiento mediante Clustal W. Alineamiento de la secuencia nucleotídica que codifican al gen *Rv2031c* (HspX_restriccion_pET-23b) respecto a la secuencia consenso (11421_11420). Coloreado en amarillo se muestra la secuencia que codifica al gen *Rv2031*, en color turquesa el sitio de restricción para Hind III, en rosa el sitio de restricción para Xho I, en verde la cola de 6 histidinas que se agregan a la proteína y en gris parte de la región nucleotídica condificante al vector de expresión pET-23b(+).

6.4 Producción de la proteína recombinante HspX.

El amplicón que codifica al gen *Rv2031c* (HspX) se clonó en el sistema de expresión *E.coli*BL21(DE3)pLysS conteniendo el vector pET-23b(+). La figura 8 muestra el corrimiento electroforético en SDS-PAGE de los lisados bacterianos inducidos con IPTG a la hora, 2 horas, 2.5 horas y 3 horas de incubación a 37°C. En el corrimiento electroforético se puede observar una banda entre los 15 y 20 kDa que corresponde a la proteína HspX. La incubación de los cultivos en inducción por IPTG produjo la mayor cantidad de proteína a las 3 horas y este tiempo de incubación fue seleccionado para realizar el resto de nuestro trabajo. A partir de este paso, decidimos arbitrariamente trabajar con la clona 1.1, pues las diferentes clonas produjeron la proteína de manera similar.

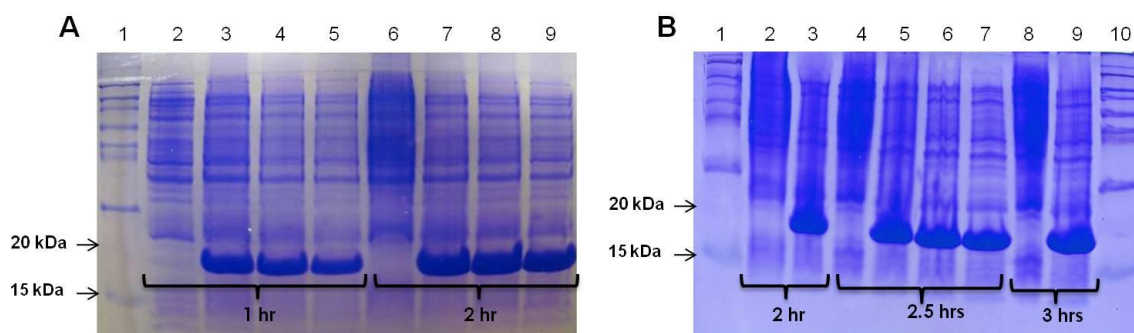


Figura 9. Producción de la proteína recombinante. En la figura **A** y **B** se muestran la expresión de la proteína recombinante HspX obtenida por inducción con IPTG a la 1, 2, 2.5 y 3 horas de incubación. En la figura **A** se muestra el marcador de peso molecular (carril 1), clona sin transformar (carril 2), clona 1-1, 8-1 y 8-2 (carril 3, 4 y 5 respectivamente), clona sin transformar (carril 6), clona 1-1, 8-1 y 8-2 (carril 7, 8 y 9 respectivamente). En **B** marcador de peso molecular (carril 1), clona sin transformar (carril 2), clona 1-1 (carril 3), clona sin transformar (carril 4), clona 1-1, 8-1 y 8-2 (carril 5, 6 y 7 respectivamente), clona sin transformar (carril 8), clona 1-1 (carril 9), marcador de peso molecular (carril 10).

6.5 Purificación de la proteína recombinante HspX.

La purificación de la proteína se realizó empleando el kit His•Bind (Novagen-A Brand of EMD Biosciences, Inc, Darmstadt, Germany). Esta tecnología emplea la resina His•Bind para purificar mediante cromatografía de quelación proteínas que presentan

cola de histidinas. Durante los distintos pasos de purificación fueron tomadas alícuotas para evaluar el proceso y confirmar que no se perdiera la proteína durante el proceso de purificación, en la figura 10 se muestra el contenido proteico y pureza de la proteína en cada paso descrito en material y métodos.

Al término de la purificación la proteína recombinante se cuantificó empleando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000(Thermo Fisher Scientific Inc,Wilmington, DE, USA).La concentración fue de 0.66 mg/mL.

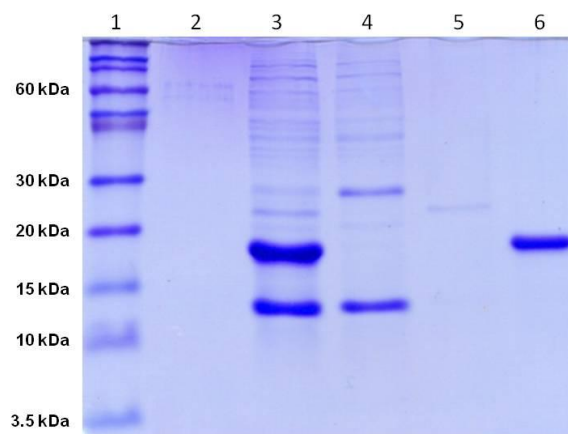


Figura 10. Purificación de la proteína recombinante. Corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 14% de cada paso del proceso de purificación. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, carril 2 sobrenadante, carril 3 lisado, carril 4 eluido uno, carril 5 eluido dos, carril 6 proteína His•Tag.

6.6 Diálisis y liofilización de la proteína recombinante HspX.

La proteína purificada por cromatografía de quelación se sometió a diálisis empleando el cassette Slide-A-Lyzer® G2 (Thermo Scientific Rockford, USA) con un tamaño de poro de 3,500 MWCO.Una vez recuperado el producto dializado éste se liofilizó empleando el liofilizador Labconco (FreeZone Freeze Dry Systems, Kansas City, MO) y se almacenó a 4°C hasta su uso. Uno de los viales liofilizados se resuspendió en KCl 0.01 M para su posterior análisis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 11).

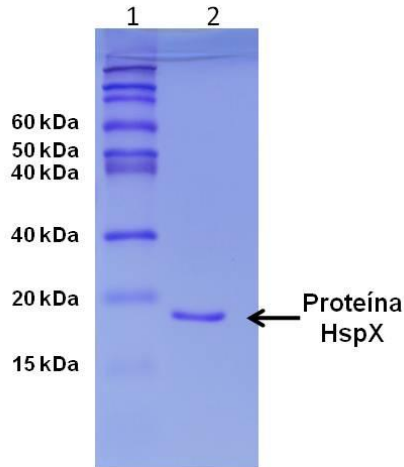


Figura 11. Corrida en gel de poliacrilamida de la proteína recombinante dializada. El gel de poliacrilamida al 14% muestra la proteína recombinante HspX (carril 2) dializada. La banda corresponde a un peso molecular aproximado de 18 kDa (carril 1).

6.7 Inmunodetección de la proteína recombinante HspX.

Para verificar la reactividad de la proteína recombinante HspX producida se realizó Western Blot empleando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-HspX 1:1000 (NIH biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository, NIAID) y el anticuerpo secundario anti IgG-HRP de ratón 1:100 (abcam-Goat polyclonal Secondary Antibody to Mouse IgG-H&L HRP). En la Figura 12 se confirma la presencia de la proteína recombinante mediante la técnica de quimioluminiscencia y colorimétrico (Figura 12A y Figura 12B) con anticuerpos monoclonales contra el producto del gen *Rv2031c*.

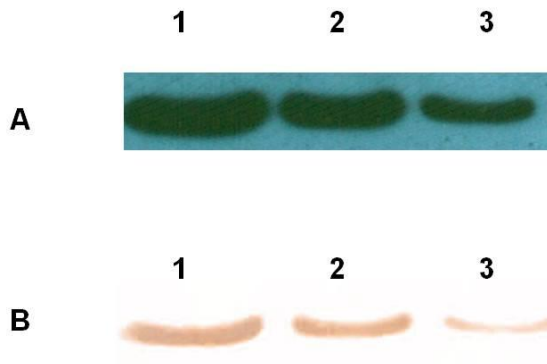


Figura 12. Detección de la proteína recombinante HspX mediante Western Blot. En **A** se muestra el Western Blot mediante quimioluminiscencia y en **B** mediante el método colorimétrico (HRP-OPD). Las concentraciones de proteína usadas fueron de 0.33, 0.165 y 0.0825 mg/mL en los carriles 1, 2 y 3 respectivamente.

6.8 Análisis electroforético de lisados celulares bacterianos mediante SDS-PAGE.

La comparación de secuencias de proteínas homólogas a la proteína HspX realizada por el programa *DNAstar* arrojó un porcentaje de similitud y divergencia respecto a la proteína en estudio (tabla 8). Estos porcentajes de similitud fueron tomados en cuenta para seleccionar los microorganismos que se incluirán para el análisis de reacciones cruzadas con la proteína recombinante en estudio. El corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida de los lisados celulares se muestra en la figura 13.

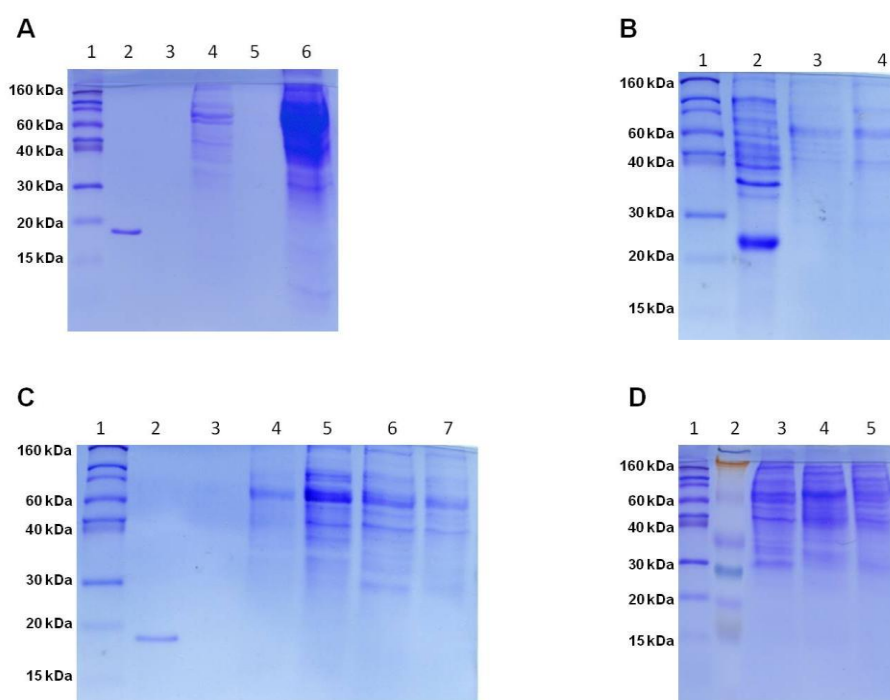


Figura 13. Corrimiento electroforético de los lisados celulares. En **A** se muestra marcador de peso molecular (carril 1), proteína recombinante HspX dializada (carril 2), HspX BEIResources (carril 3), *M. tuberculosis* H37Rv (carril 4), PPD (carril 5), *M. tuberculosis* Beijing, fase logarítmica (carril 6). En **B** se muestra marcador de peso molecular (carril 1), lisado celular de la cepa *E. coli*BL21(DE3)pLysS (carril 2), *M. avium* 1 (carril 3), *M. scrofulaceum* (carril 4). En **C** se muestra marcador de peso molecular (carril 1), proteína recombinante HspX dializada (carril 2), HspX BEI Resources (carril 3), *M. tuberculosis* H37Rv (carril 4), *M. bovis* (carril 5), *M. kansasii* (carril 6), *M. intracellulare* (carril 7). En **D** se muestra marcador de peso molecular (carril 1), marcador de peso molecular (carril 2), *M. kansasii* (carril 3), *M. smegmatis* (carril 4), *M. bovis* (carril 5).*La proteína proporcionada por BEI Resources no fue posible identificarla debido a la baja cantidad proporcionada.

Tabla 7. Porcentaje de identidad obtenido en el programa DNASTar

*Sequence Distances of Untitled ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet)

*En el triángulo superior se observa el porcentaje de identidad

*En el triángulo inferior se observa el porcentaje de divergencia

Percent Identity																																													
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43			
1	100.0	100.0	100.0	80.4	71.3	71.3	72.7	60.8	49.7	32.6	32.6	31.9	16.1	15.9	14.8	26.4	19.8	19.4	20.9	18.3	26.2	31.0	7.8	24.4	17.3	24.8	24.6	18.1	20.3	26.4	16.4	18.8	25.0	24.3	18.5	27.0	14.3	20.6	25.5	24.3	27.3	24.5	1	NP_216547.1	
2	0.0	100.0	100.0	80.4	71.3	71.3	72.7	60.8	49.7	32.6	32.6	31.9	16.1	15.9	14.8	26.4	19.8	19.4	20.9	18.3	26.2	31.0	7.8	24.4	17.3	24.8	24.6	18.1	20.3	26.4	16.4	18.8	25.0	24.3	18.5	27.0	14.3	20.6	25.5	24.3	27.3	24.5	2	NP_855707.1	
3	0.0	0.0	100.0	80.4	71.3	71.3	72.7	60.8	49.7	32.6	32.6	31.9	16.1	15.9	14.8	26.4	19.8	19.4	20.9	18.3	26.2	31.0	7.8	24.4	17.3	24.8	24.6	18.1	20.3	26.4	16.4	18.8	25.0	24.3	18.5	27.0	14.3	20.6	25.5	24.3	27.3	24.5	3	YP_978140.1	
4	0.0	0.0	0.0	100.0	80.4	71.3	71.3	72.7	60.8	49.7	32.6	32.6	31.9	15.8	15.6	13.7	26.2	19.7	19.3	19.9	17.8	25.6	31.0	7.6	24.4	16.4	24.8	24.6	18.0	19.3	26.2	16.4	17.4	24.8	23.9	18.5	26.4	14.3	20.6	24.6	23.2	27.1	24.3	4	YP_003031913.1
5	22.7	22.7	22.7	22.7	100.0	67.6	76.9	66.9	64.8	48.6	28.4	28.4	27.7	16.2	16.1	13.4	27.4	19.8	19.4	20.1	19.8	25.4	30.2	9.2	23.6	16.5	28.1	25.4	19.0	18.8	27.4	17.3	17.4	25.0	30.4	19.4	29.3	16.7	23.0	25.5	25.2	28.3	25.2	5	ZP_04749296.1
6	36.1	36.1	36.1	36.1	42.3	100.0	62.7	72.0	62.2	49.0	30.5	30.5	31.9	20.6	17.5	15.7	26.6	23.1	21.8	20.3	24.0	24.8	28.7	10.7	26.8	16.7	28.9	27.8	16.1	22.6	26.6	16.4	21.2	26.6	26.7	18.5	30.0	16.5	21.3	24.3	26.6	29.9	28.3	6	YP_001651758.1
7	36.1	36.1	36.1	36.1	27.6	51.3	100.0	65.5	62.7	47.2	29.1	29.1	28.4	16.9	15.3	13.4	21.8	18.3	17.9	22.4	19.8	24.6	28.7	11.3	24.4	18.0	26.4	23.1	15.3	20.3	21.8	15.0	16.7	23.6	25.2	16.3	27.9	15.9	18.5	27.0	25.2	23.6	25.2	7	ZP_06852440.1
8	33.9	33.9	33.9	33.9	43.5	35.0	46.0	100.0	58.7	48.3	34.0	34.0	34.8	20.6	20.4	19.7	29.0	21.5	16.5	20.3	20.8	25.6	33.3	10.7	27.6	18.8	24.0	28.6	15.3	21.9	29.0	17.2	22.6	21.6	25.2	21.5	27.9	16.5	20.6	24.3	26.6	27.6	24.6	8	ZP_04750177.1
9	54.9	54.9	54.9	54.9	47.3	52.1	51.3	59.2	100.0	47.9	29.8	29.8	31.2	17.4	12.3	20.3	23.8	17.6	20.1	22.4	22.2	23.8	28.5	12.1	29.3	17.4	25.4	22.4	16.5	20.4	23.8	22.1	19.6	26.6	27.2	23.5	29.1	18.5	21.0	27.2	25.0	25.6	27.5	9	YP_888221.1
10	80.8	80.8	80.8	80.8	83.7	82.7	87.7	84.6	85.6	100.0	28.4	28.4	27.7	16.7	12.2	17.9	20.7	19.2	20.3	21.8	19.2	21.6	24.0	13.6	22.0	18.1	26.4	29.3	11.9	23.4	20.7	18.6	19.0	25.2	25.2	17.6	23.5	17.4	15.3	25.7	28.4	27.6	26.8	10	YP_954724.1
11	144.6	144.6	144.6	144.6	170.9	156.9	166.0	137.3	161.3	170.9	100.0	99.3	87.7	19.1	19.7	17.3	22.2	20.0	18.8	22.5	13.5	21.4	23.9	10.3	24.2	19.0	27.9	18.8	12.2	20.7	22.2	24.4	21.2	25.2	28.3	22.7	28.7	19.4	17.5	22.1	28.2	23.8	23.9	11	NP_962635.1
12	144.6	144.6	144.6	144.6	170.9	156.9	166.0	137.3	161.3	170.9	0.7	100.0	87.0	19.9	19.0	16.5	21.4	19.3	18.1	21.7	12.7	20.6	23.1	10.3	24.2	18.3	27.9	18.1	12.2	20.0	21.4	24.4	21.2	25.2	27.5	22.7	28.0	19.4	17.5	22.1	27.5	23.1	23.9	12	ZP_05218861.1
13	148.5	148.5	148.5	148.5	176.1	148.5	170.9	133.8	152.6	176.1	13.5	14.3	100.0	21.3	21.9	18.1	20.6	20.0	17.4	25.4	14.3	20.6	25.4	11.7	24.2	19.0	26.2	19.6	12.2	20.0	20.6	23.7	19.0	25.2	28.3	22.0	29.4	19.4	17.5	21.4	25.4	24.6	23.9	13	ZP_05225418.1
14	307.0	307.0	307.0	313.0	305.0	239.0	291.0	239.0	284.0	296.0	257.0	248.0	230.0	100.0	57.7	45.4	16.0	17.7	18.0	17.0	16.7	12.1	18.9	9.8	16.0	14.1	25.0	21.2	14.1	13.6	16.0	14.7	17.6	14.6	21.3	13.6	20.9	16.4	16.2	14.6	20.3	13.6	15.3	14	NP_000385.1
15	309.0	309.0	309.0	315.0	307.0	281.0	321.0	240.0	403.0	407.0	249.0	260.0	224.0	61.3	100.0	50.0	15.7	16.0	13.5	16.6	15.6	13.2	15.7	11.2	18.2	14.6	21.5	15.9	12.5	14.8	15.7	14.5	20.3	11.6	18.2	16.4	17.9	14.0	15.2	15.2	18.1	14.1	10.2	15	NP_001876.1
16	332.0	332.0	332.0	362.0	371.0	313.0	371.0	250.0	241.0	274.0	284.0	298.0	271.0	93.1	79.9	100.0	15.6	15.4	15.7	17.0	16.4	13.1	22.3	9.6	15.8	17.0	19.1	20.6	10.5	13.6	15.6	13.3	16.7	10.9	16.2	16.1	18.4	15.9	12.8	11.6	19.2	17.7	15.6	16	NP_653218.1
17	186.0	186.0	186.0	187.8	177.9	184.3	226.0	166.3	205.0	237.0	220.0	229.0	238.0	307.0	315.0	317.0	100.0	20.9	21.7	23.4	22.8	20.9	30.6	11.6	22.4	19.4	21.6	32.8	16.3	25.4	100.0	14.6	14.6	26.8	31.1	16.4	22.3	13.2	12.7	19.5	25.0	55.4	25.4	17	YP_002503848.1
18	248.0	248.0	248.0	250.0	248.0	212.0	268.0	228.0	281.0	255.0	246.0	255.0	246.0	279.0	307.0	319.0	234.0	100.0	30.0	35.6	29.5	39.2	25.9	21.8	21.1	19.7	20.8	29.5	14.6	21.8	20.9	14.3	19.3	19.3	25.2	18.3	18.1	11.3	14.8	21.8	26.1	25.6	23.1	18	OS7733.1
19	253.0	253.0	253.0	255.0	253.0	224.0	274.0	298.0	244.0	241.0	261.0	271.0	284.0	273.0	365.0	313.0	226.0	159.9	100.0	32.9	28.3	31.5	25.9	17.9	21.1	20.7	20.8	36.8	13.7	24.4	21.7	14.7	15.3	22.5	31.0	16.5	21.3	15.6	12.3	25.0	30.7	24.8	26.3	19	AAB85357.1
20	236.0	236.0	236.0	248.0	244.0	241.0	219.0	241.0	219.0	224.0	218.0	226.0	195.0	289.0	298.0	289.0	209.0	129.7	143.3	100.0	37.5	39.0	32.8	18.8	26.2	19.0	27.3	40.1	10.6	25.4	23.4	12.4	16.8	21.0	33.1	11.9	23.1	11.0	10.7	22.9	24.5	28.0	27.7	20	NP_143673.1
21	270.0	270.0	270.0	276.0	248.0	204.0	248.0	237.0	220.0	257.0	368.0	393.0	347.0	296.0	315.0	299.0	214.0	163.5	171.0	121.4	100.0	45.9	32.8	20.0	24.1	19.6	25.4	32.5	15.9	20.0	22.8	16.4	18.8	16.7	31.5	16.5	20.8	15.7	14.5	18.3	22.0	22.4	24.0	21	NP_148279.2
22	187.8	187.8	187.8	193.1	194.7	197.0	198.0	192.9	205.0	228.0	229.0	238.0	238.0	410.0	377.0	380.0	236.0	114.4	150.9	115.2	91.6	100.0	36.1	22.7	26.5	22.9	29.6	36.5	13.4	23.8	20.8	16.4	15.8	15.9	31.2	19.0	22.3	12.4	14.4	19.0	25.2	20.5	20.8	22	NP_070125.1
23	153.8	153.8	153.8	153.8	158.5	168.7	168.7	140.9	170.2	203.0	205.0	211.0	194.9	261.0	313.0	219.0	155.9	190.0	190.3	143.4	143.8	127.7	100.0	17.9	23.0	20.7	22.7	38.1	15.0	24.0	30.6	20.5	15.9	24.2	32.4	18.5	31.9	20.5	16.4	24.6	26.7	30.5	28.2	23	NP_070795.1
24	736.0	736.0	736.0	796.0	569.0	471.0	442.0	471.0	414.0	365.0	493.0	493.0	426.0	531.0	451.0	538.0	430.0	224.0	274.0	261.0	246.0	216.0	276.0	100.0	13.7	14.7	16.4	17.4	15.9	17.1	11.6	12.9	10.8	9.0	18.1	14.6	10.8	12.9	12.7	12.2	9.6	12.8	17.5	24	CAC11613.1
25	200.0	200.0	200.0	200.0	208.0	182.5	200.0	176.2	164.7	223.0	202.0	202.0	202.0	309.0	271.0	313.0	218.0	232.0	232.0	187.4	202.0	184.8	213.0	360.0	100.0	19.5	23.3	26.0	15.6	22.3	22.4	16.7	23.8	18.7	31.5	19.5	17.1	14.2	14.8	28.1	18.9	23.5	23.8	25	CAC11993.1
26	285.0	285.0	285.0	299.0	298.0	296.0	274.0	261.0	284.0	271.0	258.0	268.0	258.0	352.0	339.0	289.0	254.0	249.0	237.0	260.0	252.0	214.0	237.0	337.0	252.0	100.0	22.7	22.3	10.6	19.7	19.4	13.3	12.8	18.2	22.5	19.2	14.9	13.1	16.7	21.4	19.5	21.1	26	AAG20020.1	
27	197.0	197.0	197.0	197.0	172.8	167.0	185.6	204.0	194.6	185.6	174.5	174.5	187.4	195.0	229.0	258.0	228.0	236.0	236.0	179.0	194.4	162.7	216.0	301.0	210.0	216.0	100.0	26.7	14.9	16.1	21.6	22.7	21.8	24.2	28.1	17.9	28.9	19.3	16.5	25.6	20.2	21.0	24.4	27	AAG20865.1
28	198.0	198.0	198.0	198.0	194.9	174.9	211.0	16																																					

6.9 Inmunodetección de la proteína HspX (*Rv2031c*) en lisados celulares de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* y micobacterias atípicas.

En los lisados celulares obtenidos fue posible identificar la proteína en estudio solo en la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. En cada pozo se agregó una cantidad de 0.36 mg/mL de cada lisado celular (figura 14).

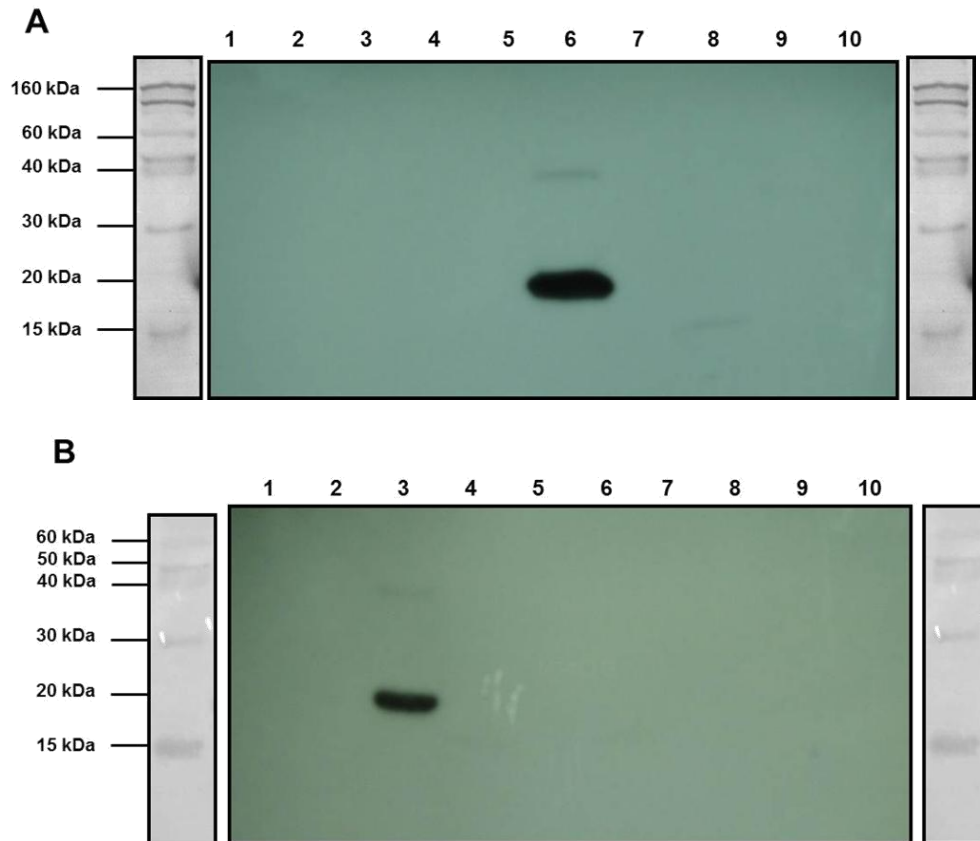


Figura 14. Inmunodetección de la proteína HspX (*Rv2031c*). En **A** se muestra *M. avium* 1 (carril 1), *M. smegmatis* (carril 2), *M. kansasii* (carril 3), *M. scrofulaceum* (carril 4), marcador de proteínas (carril 5), proteína recombinante HspX dializada (carril 6), HspX BEI Resources (carril 7), *M. tuberculosis* H37Rv (carril 8), lisado celular de la cepa *E. coli*BL21(DE3)pLysS (carril 9), *M. tuberculosis* Beijing, fase logarítmica (carril 10). En **B** se muestra *M. intracellulare* (carril 1), marcador de peso molecular (carril 2), proteína recombinante HspX dializada (carril 3), *M. tuberculosis* H37Rv (carril 4), HspX BEI Resources (carril 5), *M. bovis* (carril 6), *M. kansasii* (carril 7), lisado celular de la cepa *E. coli*BL21(DE3)pLysS (carril 8), *M. avium* 2 (carril 9), *M. intracellulare* (carril 10).

*La proteína proporcionada por BEI Resources no fue posible identificarla debido a la baja cantidad proporcionada.

6.10 Identificación de anticuerpos IgG e IgM contra el antígeno de 16-kDa mediante la técnica de ELISA.

Un total de 98 muestras fueron analizadas; 15 fueron clasificadas como no infectados (PPD⁻), 28 como TB activa, 30 como TB latente y 25 como muestra problema. Los datos demográficos y clínicos obtenidos se presentan en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Datos clínicos y demográficos de personas clasificadas como TB activa y muestras problema

	TB activa (n = 28)	Muestras problema (n = 25)
Masculino/Femenino	16/12	17/8
BAAR (+)	28 (100 %)	11 (44 %)
PPD (+)	28 (100 %)	17 (60 %)
Cultivo (+)	28 (100 %)	25 (100 %)
QuantiFERON[®](+)	28 (100 %)	16 (64 %)

Tabla 9. Datos clínicos y demográficos de personas con diagnóstico presuntivo de Tuberculosis latente

	TB latente (n = 30)
Edad	19 – 65*
Masculino/Femenino	5/16*
Drogas	0 (0%)
COMBE	30 (100%)
TB familiar	7*
Diabetes mellitus	0 (0%)*
Cáncer pulmonar	0 (0%)*
Neumonía	0 (0%)*
PPD	30 (100%)
BCG (Si/No)	28/2

*No se cuenta con datos demográficos de algunas personas

Los individuos incluidos en la clasificación de TB activa presentaron BAAR, cultivo y QuantiFERON[®]-TB Gold positivo. Debido a la variabilidad en los estudios antes mencionados 25 personas fueron clasificadas como muestras problema, sin embargo, es de notar que todos presentaron cultivo positivo.

En la figura 15 se muestra en gráficos de dispersión la detección de los anticuerpos IgG e IgM contra la proteína recombinante HspX-His producida. Se puede observar que la presencia de anticuerpos de tipo IgM es significativa (p 0.003) en

individuos con TB latente respecto a los individuos clasificados como TB activa. En la identificación de anticuerpos de tipo IgG no hubo diferencias significativas entre los grupos analizados.

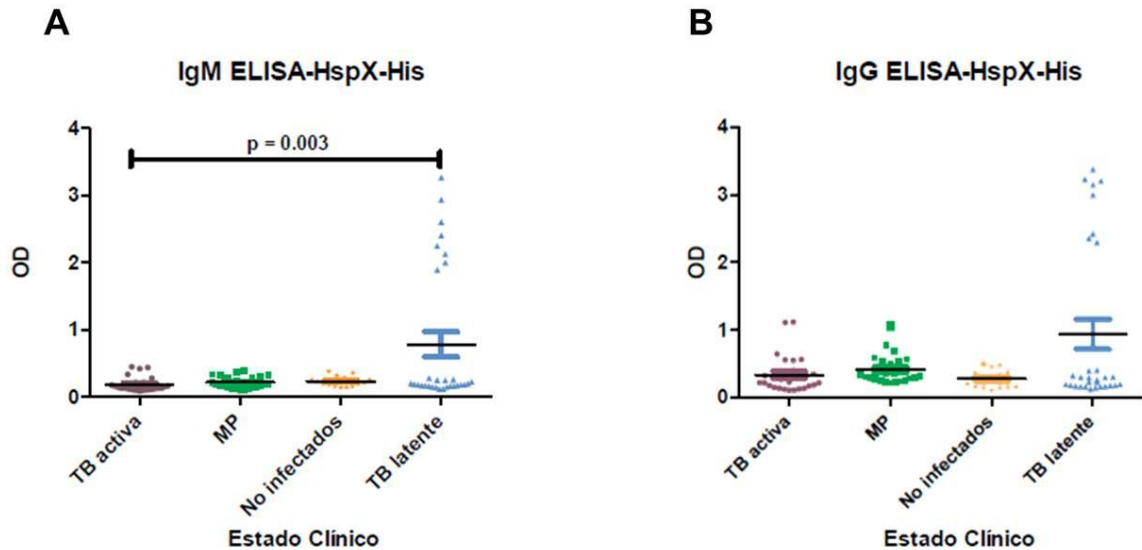


Figura 15. Identificación de anticuerpos IgG e IgM contra la proteína recombinante HspX-His. En **A.** Niveles de anticuerpos IgM contra la proteína HspX en individuos clasificados como TB activa (n = 28), muestra problema (n = 25), TB latente (n = 30) y no infectados (n = 15). Se observa una diferencia significativa entre individuos con TB activa y TB latente ($p = 0.003$). En **B.** Niveles de anticuerpos IgG contra la proteína HspX en individuos clasificados como TB activa (n = 28), muestra problema (n = 25), TB latente (n = 30) y no infectados (n = 15). **OD** corresponde a la densidad óptica (492 nm). Programa GraphPad Prism 6.

Debido a que en la población mexicana la vacuna BCG es parte del esquema nacional de vacunación, casi todos los individuos incluidos en el estudio cuentan con la aplicación de la misma, es de notar que dos personas no contaban con la aplicación de la vacuna, sin embargo no se encontró diferencia significativa en los títulos de anticuerpos IgG e IgM contra la proteína recombinante entre los individuos con y sin vacuna BCG.

De acuerdo a la clasificación empleada por Rabahi y colaboradores (2007) se realizó una re-clasificación de las poblaciones de individuos dividiendo la población de tuberculosis latente en tuberculosis latente reciente (rLTBI) y tuberculosis latente (LTBI) de varios años. En la Figura 16 se muestra en gráficos de dispersión la respuesta de los anticuerpos IgG e IgM contra la proteína recombinante HspX-His producida.

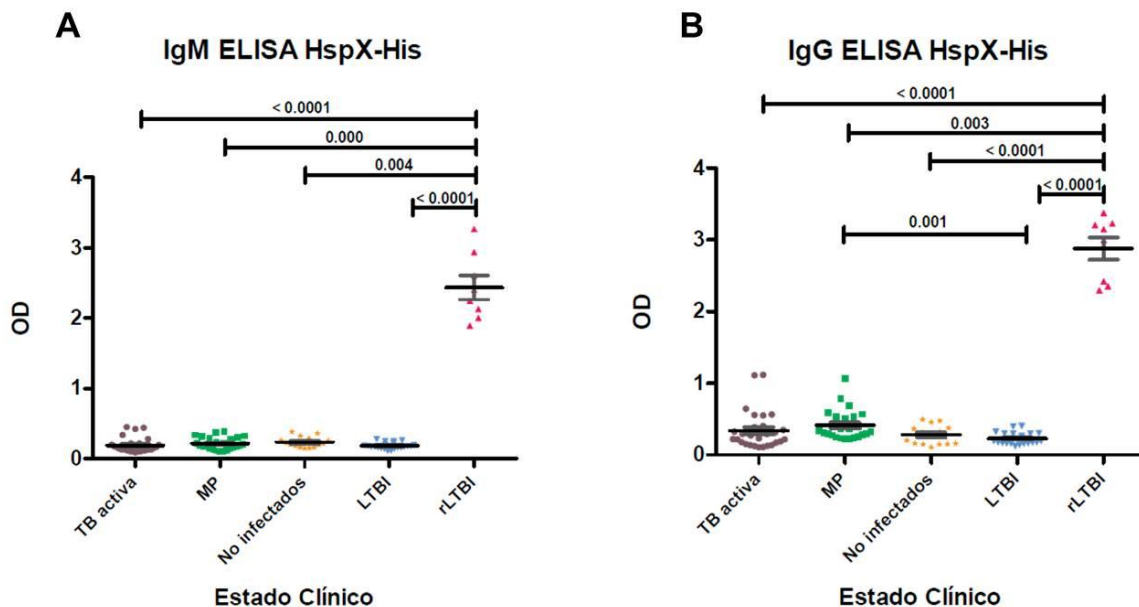
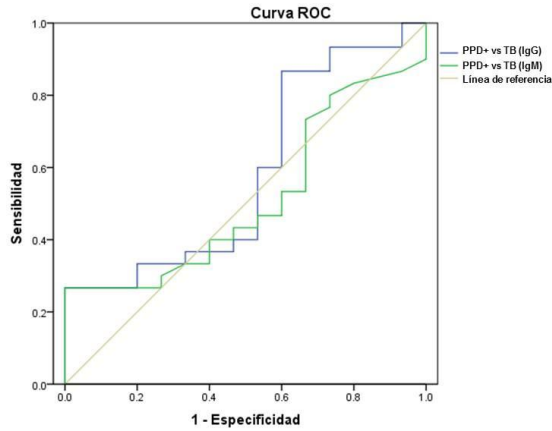


Figura 16. Identificación de anticuerpos IgG e IgM contra la proteína recombinante HspX-His en individuos con nueva clasificación. En **A**. Niveles de anticuerpos IgM contra la proteína HspX en individuos clasificados como TB activa (n = 28), casos indeterminados (n = 25), TB latente reciente (n = 8), TB latente (n = 22) y no infectados (n = 15). Se observa una diferencia significativa entre individuos con tuberculosis latente reciente y el resto de los grupos establecidos. En **B**. Niveles de anticuerpos IgG contra la proteína HspX en individuos clasificados como TB activa (n = 28), casos indeterminados (n = 25), TB latente reciente (n = 8), TB latente (n = 22) y no infectados (n = 15). Se observa una diferencia significativa entre individuos con tuberculosis latente reciente y el resto de los grupos establecidos, así como en la población de tuberculosis latente y muestras problema. **OD** corresponde a la densidad óptica (492 nm). Programa GraphPad Prism 6.

El análisis de curvas ROC (Figura 17) para la clasificación de individuos identificada como no tuberculosis, tuberculosis activa, casos indeterminados y tuberculosis latente muestra que no hay un valor de corte claro para diferenciar entre individuos no infectados, con tuberculosis activa y muestra problema. Sin embargo, entre los individuos que resultaron con diferencia significativa (TB activa y TB latente) se identificó un valor de corte en valores de densidad óptica (492 nm) de 1.3945 para anticuerpos de tipo IgG y 1.1375 para anticuerpos de tipo IgM contra la proteína recombinante HspX. Una sensibilidad (Se) y especificidad (Es) de 86.7% y 40% respectivamente para los anticuerpos de tipo IgG, y un 26% de Se y 100 % de Es para los anticuerpos IgM.



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Parámetros	PPD+ vs TB		Parámetros	
	IgG	IgM	ABC	Área bajo la curva
ABC	.582	.513	Se	Sensibilidad
Se	0.867	0.267	Es	Especificidad
Es	0.4	1	VP+	Valor Predictivo+
VP+	0.743	1	VP-	Valor Predictivo-
VP-	0.600	0.405	Ef	Eficiencia
Ef	0.711	0.511	J	Índice de Youden
J	0.267	0.267	LR+	Proporción de probabilidad de un resultado de una prueba positiva
LR+	ND*	ND*	LR-	Proporción de probabilidad de un resultado de una prueba negativa
LR-	0.333	0.733	IP	Índice de Probabilidad (Odds Ratio = OR)
IP	4.333	ND*	VC	Valor de corte (D.O.) para diagnosticar muestras + y -
VC	1.3945	1.1375		

*ND = No puede ser determinado.

Figura 17. Análisis de curva ROC para Tuberculosis latente y TB activa. Programa SPSS

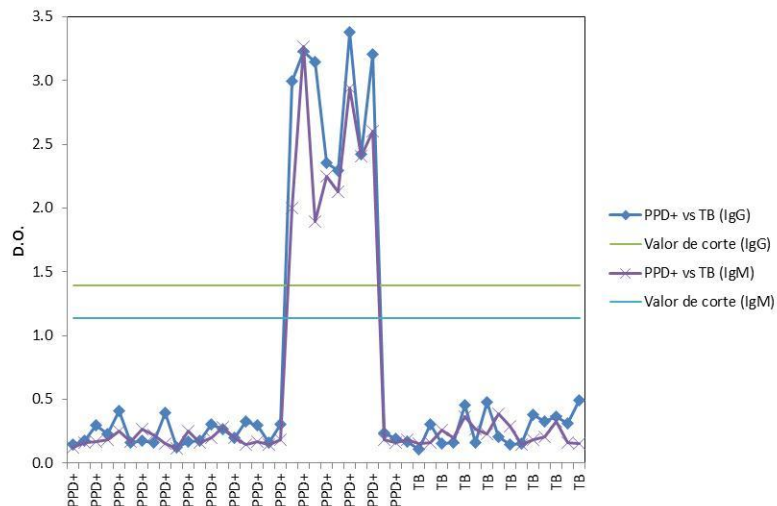


Figura 18. Valor de corte para Tuberculosis latente y TB activa. Microsoft Excel (Office 2010).

Tomando en cuenta la clasificación hecha por Rabahi se re-clasificaron las poblaciones dividiendo la población de tuberculosis latente en tuberculosis latente reciente (rLTBI) y tuberculosis latente (LTBI) obteniendo un valor de corte en valores de densidad óptica (492 nm) de 1.7065 para anticuerpos de tipo IgG y 1.1715 para anticuerpos de tipo IgM contra la proteína recombinante HspX con 100% de Se y 100% de Es para los anticuerpos de tipo IgG, y un 100% de Se y 100% de Es para los anticuerpos IgM (Figura 19).

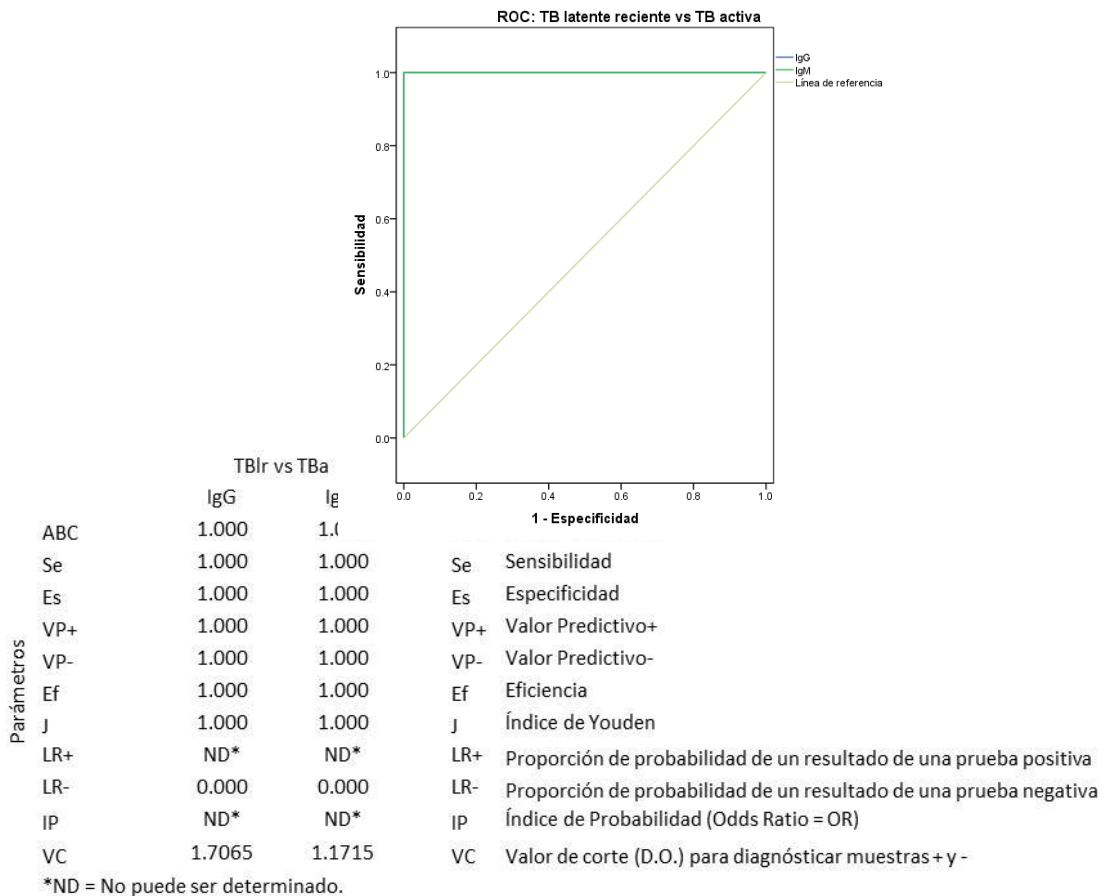


Figura 19. Análisis de curva ROC para Tuberculosis latente reciente y TB activa. Programa SPSS versión 11.0.

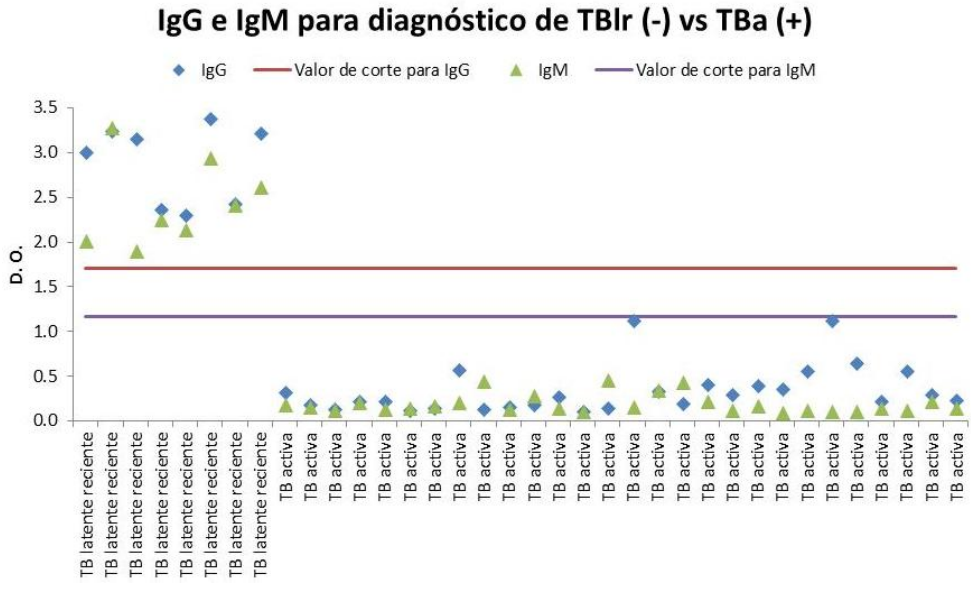


Figura 20. Valor de corte para Tuberculosis latente reciente y TB activa. Microsoft Excel (Office 2010).

7. DISCUSIÓN

Mycobacterium tuberculosis (MTB) es el agente causal de la tuberculosis (TB), una de las enfermedades más antiguas de los seres humanos y la segunda causa de muerte en todo el mundo por un solo agente infeccioso, solo detrás del VIH/SIDA. El curso de la enfermedad es complicado, sin embargo se estima que solo un 5 a 10% de los individuos infectados con el bacilo progresará a una infección activa. El otro porcentaje de personas infectadas con el bacilo es clasificada como “infección latente” (Gideon, 2011). La población de individuos con infección latente constituye uno de los mayores impedimentos en el control de la tuberculosis, ya que está presente la posibilidad de reactivación de la enfermedad y de representar una fuente de infección a otros individuos mientras que no se manifiesten los síntomas para un diagnóstico y tratamiento correcto. Los individuos recientemente expuestos al bacilo y que se consideran con tuberculosis latente reciente son más propensos a desarrollar la enfermedad activa (contagiosa) en los primeros 1 a 2 años después de la exposición al bacilo. Mientras que el costo-beneficio de detectar y tratar individuos recientemente expuestos al bacilo es aún controversial, es importante recalcar que el identificar a los individuos con infección latente ya sea para su tratamiento y/o seguimiento cercano es un punto básico e importante en los programas de control para la erradicación de la tuberculosis (Doherty, 2008).

Un objetivo importante en el diagnóstico de tuberculosis es diferenciar entre una infección reciente, una infección pasada (ya de años) o infección activa. Debido a su bajo costo, fácil manejo y rapidez en la obtención de resultados, el inmunodiagnóstico es una buena alternativa para identificar individuos propensos a desarrollar la enfermedad antes de que desarrollen la forma contagiosa, es decir que presenten baciloscopía positiva (Rabahi, 2007, Doherty, 2008).

En respuesta a la infección por MTB las células del sistema inmune comienzan a acumularse alrededor del bacilo formándose granulomas y conduciendo a un microambiente con reducción de nutrientes, baja tensión de oxígeno, pH bajo, niveles elevados de enzimas hidrolíticas y especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico. La bacteria responde a este microambiente regulando genes que le ayudan a sobrevivir en el microambiente, entre ellos se incluyen chaperoninas, transportadores asociados con el control del pH, genes implicados en el metabolismo de lípidos, etc. (Demissie, 2006). Uno de los genes que más se expresan bajo las condiciones antes mencionadas es el gen *Rv2031c*, que codifica la proteína HspX, una de las más abundantes durante la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria y frecuentemente identificada en el suero de pacientes con tuberculosis. Sin embargo, la magnitud de la respuesta inmune frente a este antígeno se presenta en forma diferente en individuos con infección aguda y latente, lo que podría ayudar en la diferenciación de estos dos estados de la enfermedad (Doherty, 2008).

Un paso importante para analizar la relevancia de un antígeno en su posible uso en un método diagnóstico es contar con la proteína en cantidades suficientes; la primera parte de este trabajo tuvo como objetivo la producción *in vitro* de la proteína HspX recombinante en un sistema de expresión eficiente. De acuerdo a nuestros resultados, logramos producir y purificar la proteína en buena cantidad y calidad como lo demostramos en los geles de SDS-PAGE (Figs. 10 y 11). Después, comprobamos su antigenicidad mediante un ensayo de Western Blot utilizando anticuerpos monoclonales anti-HspX. En estos ensayos encontramos que la banda correspondiente a la proteína HspX recombinante tenía un peso aproximado entre 18 y 19 kDa. El peso molecular de la proteína codificada en el gen *Rv2031c* es de 16 kDa, la diferencia de peso con la proteína recombinante se debe muy probablemente a la secuencia adicional de histidinas (~4 kDa). Se observa además una banda extra a la altura aproximada de 38-kDa, caso similar obtenido por Vervon y colaboradores (1992). Adicionalmente hay evidencia (Raja, 2002, Kennaway, 2005) que muestra que la proteína HspX existe en diferentes formas oligoméricas, entre ellas como dodecámero y como dímero, esta última una forma básica de la proteína relativamente estable. La reactividad por los anticuerpos encontrada

a la altura aproximada de 38-kDa en el análisis de Western Blot pudiera corresponder con la formación de dímeros de la proteína.

Las proteínas inducidas por estrés existen en otros microorganismos o células eucariotas (Kennaway, 2005) y pueden presentar reacción cruzadas con los anticuerpos anti-HspX; Para analizar esta posibilidad con la proteína recombinante producida, se realizó un análisis de comparación de secuencias homólogas a la proteína empleando el programa DNASTar. El análisis de comparación de secuencias mostró que la secuencia que presenta mayor similitud corresponde a *M. bovis*(ver tabla 7). Sin embargo bajo las condiciones de crecimiento en medio líquido empleadas en el laboratorio para algunas micobacterias del complejo *M. tuberculosis* y algunas otras micobacterias atípicas solo se identificó la presencia de la proteína HspX de 16-kDa en la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Previamente O'Loan (1994) reportó la presencia de una proteína de tamaño similar en el lisado celular de *M. bovis*, pero en este trabajo no la observamos, quizá fue debido a las condiciones de crecimiento.

En un estudio realizado *in vitro* con células humanas, Geluk y colaboradores (2007) analizaron la respuesta inmune celular frente a la proteína HspX en después de la inmunización con la vacuna BCG; ellos concluyeron que la vacunación no induce respuesta celular de tipo T en contra de la proteína HspX por lo que sugieren que la expresión de la proteína HspX es probablemente baja. Respecto a la respuesta inmune humoral frente a la proteína, Rabahi y colaboradores (2007)no encontraron diferencias significativas entre la respuesta de anticuerpos producida por la vacunación por BCG en comparación con el resto de la población analizada.

Respecto al análisis de respuesta inmune humoral frente a la proteína recombinante producida, nuestros resultados muestran que no hubo diferencias significativas respecto a la respuesta de anticuerpos de tipo IgG contra la proteína HspX entre individuos clasificados con TB activa, tuberculosis latente e individuos no infectados. Sin embargo, sí se encontró diferencia significativa en la respuesta de anticuerpos de tipo IgM contra la proteína recombinante entre individuos con tuberculosis latente en comparación con el grupo de tuberculosis activa. Resultados

similares fueron reportados por Rabahi y colaboradores (2007) en un estudio realizado a trabajadores de un hospital en Goiania, Brazil que admite un gran número de personas con diagnóstico de tuberculosis. Entre sus resultados ellos encontraron una media de densidad óptica para anticuerpos de tipo IgM significativamente más alta en individuos con tuberculosis latente reciente respecto a trabajadores infectados años atrás e individuos no infectados.

Es importante mencionar que en nuestro laboratorio los grupos de individuos con tuberculosis activa, fueron seleccionados basándonos principalmente en la prueba de tuberculina (PPD) y en el resultado de cultivo, baciloscopía y QuantiFERON®. Observando la respuesta de anticuerpos de tipo IgM frente a la proteína recombinante en individuos con tuberculosis latente se pudo observar claramente una diferencia marcada en la respuesta de anticuerpos entre individuos del mismo grupo, por lo que fácilmente se podrían separar dos poblaciones de individuos dentro del mismo grupo de tuberculosis latente. Esto resulta interesante ya que Rabahi y colaboradores (2007) dividen sus poblaciones de individuos en tuberculosis latente reciente (rLTBI) y tuberculosis latente previa (de varios años), la división empleada por este grupo de investigadores parece correlacionarse con los dos tipos de poblaciones que estamos observando dentro de nuestro grupo clasificado como tuberculosis latente.

Lo mencionado anteriormente resulta importante ya que una de las debilidades tanto de la prueba de tuberculina, como del QuantiFERON®, es que no son capaces de distinguir entre una infección latente reciente de una que lleva varios años y en base a lo anterior diferentes estudios han demostrado que entre los individuos con infección reciente el riesgo de desarrollar una tuberculosis activa en los primeros años de vida es 8 veces más alta que en los 7 años subsecuentes y que el 82% de los casos de TB desarrolló la enfermedad activa en los primeros 2 años de infección (Rabahi y cols, 2007).

Para comprender de una forma más clara la relación entre el tiempo de infección, respuesta inmune y la infección por *M. tuberculosis* Doherty (2008) propone un modelo simple en el que se puede explicar la conclusión a la que llegan diferentes autores. Como

se mencionó antes en este modelo se explica el curso de la infección por *M. tuberculosis*, pero además muestra que los anticuerpos frente a la proteína HspX es inicialmente baja en los pacientes con TB pero los títulos se incrementan durante el tratamiento de la enfermedad y también en los individuos infectados pero sanos. En su modelo describe una figura en la que traza en el eje de las “X” el tiempo después de la infección y en el eje de las “Y” la carga bacteriana. De él se desprenden tres campanas de Gauss cargadas a la izquierda, una de ellas es una línea continua, la segunda es una línea entrecortada y la última una línea de puntos. De la carga bacteriana se desprenden dos puntos de corte, uno de ellos define el punto de corte para positividad y el otro de ellos define el punto de corte para la enfermedad clínica. Centrándonos en la primera campaña de Gauss (línea continua) menciona que la infección inicial puede ser controlada con la presencia de cantidades mínimas de bacterias y con respuesta inmune específica, las personas que controlan la infección inicial permanecen con resultados de prueba intradérmica negativa e IGRA negativo y puede o no convertirse en individuos con infección latente haciendo indistinguibles las personas que nunca se infectaron y los que no produjeron respuesta inmune significativa. Sin embargo, en algunos casos la replicación bacteriana alcanza un punto en el que induce una respuesta inmune detectable (el umbral de positividad) identificando a los individuos como “infectados”. Los individuos que alcanzan a generar una respuesta inmune contra la bacteria debido a su carga bacteriana presentan prueba intradérmica positiva e IGRA positivo y la respuesta inmune en este punto es dominada por una fuerte respuesta a los antígenos de fase aguda como ESAT-6, se caracteriza además por la producción elevada de INF- γ e IL-4. Si esto continúa, el individuo desarrollará los signos clínicos de la enfermedad (umbral de enfermedad clínica), en la mayoría de los casos los individuos controlarán la infección (línea entrecortada) resultando en una infección latente pero en algunos la replicación bacteriana continuará conduciendo a una infección primaria (línea punteada), permaneciendo con prueba intradérmica e IGRA positivo además de una elevada cantidad e IL4 y un decremento en la producción de INF- γ e IL-4 δ 2. Los individuos que subsecuentemente controlan la replicación bacteriana o responden al tratamiento (línea entrecortada) permanecen con prueba intradérmica e IGRA positivos y los antígenos de

fase aguda como ESAT-6 empiezan a disminuir, pero una respuesta a antígenos de latencia como el producto del gen *Rv2031c* comienza a incrementarse. Es en este punto donde la respuesta inmune celular contra los antígenos de latencia como la proteína HspX comienza a producirse identificando cantidades elevadas de INF- γ e IL-4 δ 2 y la producción de anticuerpos IgM de manera más temprana para luego producir anticuerpos de tipo IgG. Durante todo este proceso es donde se puede visualizar de una mejor manera la clasificación de infección latente reciente (rLTBI) con predominio de anticuerpos de tipo IgM e infección latente pasada (LTBI) que mencionan Rabahi y colaboradores (2007).

Tomando en cuenta la primera clasificación de individuos identificada como no tuberculosis, tuberculosis activa, muestra problema y tuberculosis latente y en base a los resultados obtenidos en el análisis de curvas ROC no pudo obtenerse un valor de corte claro para diferenciar entre individuos no infectados, con tuberculosis activa y muestra problema. Sin embargo, entre los individuos que resultaron con diferencia significativa (TB activa y TB latente) se identificó un valor de corte en valores de densidad óptica de 1.3945 para anticuerpos de tipo IgG y 1.1375 para anticuerpos de tipo IgM contra la proteína recombinante HspX. Resultando una sensibilidad (Se) de 86.7% y una especificidad (Es) de 40% para los anticuerpos de tipo IgG, y un 26% Se y 100 % Es para los anticuerpos IgM. Los valores obtenidos no son tan altos como se espera para un buen test de prueba. Sin embargo tomando en cuenta las referencias encontradas y la clasificación hecha por Rabahi (2007) se re-clasificaron las poblaciones dividiendo la población de tuberculosis latente en tuberculosis latente reciente (rLTBI) y tuberculosis latente (LTBI) obteniendo un valor de corte en valores de densidad óptica de 1.7065 para anticuerpos de tipo IgG y 1.1715 para anticuerpos de tipo IgM contra la proteína recombinante HspX y una Se de 100% y una Es de 100% para los anticuerpos de tipo IgG, y una Se de 100% y una Es de 100% para los anticuerpos IgM. Estos resultados son alentadores en cuanto al desarrollo de un nuevo método de diagnóstico y apoyan la necesidad de un reclasificación de las etapas de la enfermedad para lograr el diagnóstico adecuado de la tuberculosis y de esta manera mejorar los programas de control. Estudios

adicionales con un mayor número de muestra y el seguimiento de los pacientes proporcionaría resultados confirmatorios a lo encontrado en este estudio.

8. CONCLUSIONES

- Logramos producir y purificar la proteína recombinante HspX.
- La proteína recombinante es reconocida por los anticuerpos monoclonales anti-HspX.
- Se desarrolló una prueba de ELISA utilizando la proteína recombinante producida en nuestro laboratorio.
- Logramos cuantificar anticuerpos anti-HspX de tipo IgG e IgM en sueros de pacientes con tuberculosis activa, tuberculosis latente e individuos sanos.
- No encontramos diferencias significativas entre la respuesta de anticuerpos de tipo IgG e IgM entre individuos no infectados y con tuberculosis activa.
- Sin embargo, si encontramos diferencias significativas en la cuantificación de anticuerpos IgM en individuos con diagnóstico presuntivo de tuberculosis latente reciente respecto a tuberculosis activa.
- Este estudio sugiere un nuevo método de diagnóstico para la detección de la tuberculosis latente reciente.

9. PERSPECTIVAS

- Los resultados en este estudio son limitados debido al tamaño de la muestra, por lo que es importante realizar más determinaciones en pacientes con tuberculosis activa y tuberculosis latente presuntiva.
- Mientras no se tengan estos datos, es importante mencionar que para el diagnóstico de la enfermedad, es importante realizar otras pruebas como la medición de INF- γ frente antígenos como ESAT-6, CFP-10 (QuantiFERON[®]TB Gold) y la determinación de citocinas características de la enfermedad para determinar el estadio clínico de la enfermedad.

APENDICE

PBS 10X	Cantidades	[] Final
NaCl	8.0 g	137 mM
KCl	0.2 g	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	1.44 g	10 mM
KH ₂ PO ₄	0.24 g	2 mM

Disolver en 80 mL de agua desionizada, ajustar a pH 7.4, llevar a 100 mL y esterilizar por autoclave o filtración.

PBS + 0.05% (v/v) Tween[®] 20	Cantidades	[] Final
PBS 10X	100 mL	
Tween [®] 20	0.5 mL	

Llevar a 1 L con agua desionizada.

KCl 0.01 M	Cantidades	[] Final
KCl	0.07455 gr	

Disolver en 80 mL de agua desionizada y llevar a 100 mL.

TBS 100 mM Tris HCl y 150 mM NaCl	Cantidades	[] Final
Tris HCl	1.576 g	100 mM
NaCl	0.8773 g	150 mM

Disolver en 80 mL de agua desionizada, ajustar a pH 7.4, llevar a 100 mL y esterilizar por autoclave o filtración.
Una vez preparada la solución añadir 0.5 mL de Tritón X-100 a cada 100 mL

Solución de carbonato 50 mM pH 9.6

Na₂CO₃ (carbonato de sodio) 1.59 gr

NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) 2.93 gr

Disolver en 500 mL de agua bidestilada y llevar a 1 Litro

Solución de bloqueo 5%	Cantidades	[] Final
-------------------------------	-------------------	------------------

Leche descremada en polvo	3 gr	
---------------------------	------	--

Solución de carbonato 50 mM pH 9.6	100 mL	
------------------------------------	--------	--

Se prepara el mismo día y solo el volumen a utilizar de acuerdo a la cantidad de muestras a procesar.

Solución de bloqueo 1%	Cantidades	[] Final
-------------------------------	-------------------	------------------

Leche descremada en polvo	0.56 gr	
---------------------------	---------	--

Solución de carbonato 50 mM pH 9.6	100 mL	
------------------------------------	--------	--

Se prepara el mismo día y solo el volumen a utilizar de acuerdo a la cantidad de muestras a procesar.

Solución de desnaturalización	Cantidades	[] Final
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.25 mL	
Glicerol	2.5 mL	
SDS 10%	2.0 mL	
Azul de Bromofenol 0.5%	0.2 mL	
Agua destilada	3.55 mL	
Volumen Total	9.5 mL	

Añadir 50 μ L de β -mercaptoetanol a 950 μ L de solución de muestra. Diluir las muestras 1:1 con solución de desnaturalización y calentarlas a 95°C por 4 minutos. Almacenar el reactivo a temperatura ambiente.

Solución de Azul de Coomassie	Cantidades	[] Final
Metanol	50 mL	
CH ₃ COOH	7 mL	
Azul de Coomassie	0.05 g	
Aforar a 100 mL con agua destilada		

LITERATURA CITADA

American Thoracic Society. 2000. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. Vol 161:1376-1375.

Barrios J, Castañón M, Flores M, Hernandez R. 2010. Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente. Salud Publica Mex 52:70-78.

Beck S, Leite O, Arruda R, Ferreira A. 2005. Humoral response to low molecular weight antigens of *Mycobacterium tuberculosis* by tuberculosis patients and contacts. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 38:587-567.

Bergamini B, Losi M, Valenti F, D'Ámico Roberto, Meccugni B, Meacci M, De Giovanni D, Rumpianesi F, Fabbri L, Balli F, Richeldi L. 2009. Performance of Commercial Blood Test for the Diagnosis of latent Tuberculosis Infection in Children and Adolescents. American Academy of Pediatrics 123:e419-e424

Bobadilla K, Rivas B, Sada E, Torres M. 2009. Biogénesis del fagolisosoma micobacteriano y su papel en el procesamiento y presentación del antígeno. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias 22:56-62.

Boon C, Li R, Qi R, Dick T. 2001. Proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induced in the Wayne dormancy model. Journal of Bacteriology 183:2672-2676

Bothamley G. 2004. Epitope-specific antibody levels demonstrate recognition of new epitopes and changes in titer but not affinity during treatment of tuberculosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 11:942-951.

Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. 2010. Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica. 25ª Edición. Ediciones McGraw-Hill. pp. 289-297.

Burgueño M, Bastos J, Gonzalez J. 1995. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. Medicina Clínica 104:661-670.

Cardona P. 2006. New insights on the nature of latent infection and its treatment. Inflammation & Allergy-Drug Targets 6:27-39.

Clark A, Befus D, O'Hashi P, Hart F, Schunk M, Fletch A, Griffin G. 2002. Canadian Council on Animal Care guidelines on: antibody production. Ottawa on Canada, pp. 1-14.

Colorado State University. 2010. Production manuals & SOPs. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cvmbs.colostate.edu/mip/tb/sop.htm> [Revisado el 07 de Octubre de 2012].

Cunningham A, Spreadbury C. 1998. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-Kilodalton α -crystallin Homolog. *Journal of Bacteriology* 180:801-808.

Davidow A, Kanaujia G, Shi Lanbo, Kaviar J, Guo X, Sung N, Kaplan G, Menzies D, Gennaro M. 2005. Antibody profiles characteristic of *Mycobacterium tuberculosis* infection state. *Infection and Immunity* 73:6846-6851.

Demissie A, Leyten Eliane, Abebe M, Wassie L, Aseffa A, Abate Getahun, Fletcher H, Owiafe P, Hill P, Brookes R, Rook G, Zumla A, Arend S, Klein M, Ottenhoff Tom, Andersen P, Dhoerty T, VACSEL Study Group. 2006. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Vaccine Immunology* 13:179-186.

Desjardin L, Hayes L, Sohaskey C, Wayne L, Eisenach K. 2001. Microaerophilic induction of the alpha-crystallin chaperone protein homologue (*hspX*) mRNA of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 183:5311-5316.

Diagbouga S, Fomoux F, Zoubga Alain, Sanou P, Marchal G. 1997. Immunoblot analysis for serodiagnosis of Tuberculosis using a 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 4:334-338.

Doherty T. 2008. Separating latent and acute Disease in the diagnosis of tuberculosis. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. Volume 1. *Frontiers in Research* p 91-99.

Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J.L, Loscalzo J. 2009. *Harrison Principios de Medicina Interna*. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México, D.F. pp. 1006-1020.

Florczyk M, McCUE L, Stack R, Hauer C, McDonough K. 2001. Identification and characterization of mycobacterial proteins differentially expressed under standing and shaking culture conditions, including Rv2623 from a novel class of putative ATP-binding proteins. *Infection and Immunology* 69:5777-5785.

Geluk A, Lin M, Meijgaarden K, Leyten E, Franken K, Ottenhoff T, Klein M. 2007. T-cell recognition of the HspX protein of *Mycobacterium tuberculosis* correlates with latent *M. tuberculosis* infection but not with *M. bovis* BCG vaccination. *Infection and Immunity* 75:2914-2921.

Gennaro M, Flynn J, Goulding C, DeRiemer K, Lerche N, Luciw P. 2008. Profiling antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex microbead suspension arrays for serodiagnosis of tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 15:433-438.

- Gideon H, Flynn J. 2011. Latent tuberculosis: what the host “sees”?. *Immunologic Research* 50:202-212.
- Godreuil S, Tazi L, Bañuls A. 2007. *Encyclopedia of Infectious Disease: Modern Methodologies*, by M. Tybayrenc. John Wiley & Sons, Inc. pp. 1-22.
- Gordillo S, Guirado E, Gil O, Díaz J, Amat I, Molinos S, Vilaplana C, Ausina V, Cardona J. 2006. Usefulness of *acr* expression of monitoring latent *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in 'in vivo' experimental models. *Scandinavian Journal of Immunology* 64:30-39.
- Greiner M, Göbel P. 1995. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic test. *Journal of Immunological Methods* 181:123-132.
- Haile Y, Bjune G, Wiker H. 2002. Expression of the *mceA*, *esat-6* and *hspX* genes in *Mycobacterium tuberculosis* and their responses to aerobic conditions and to restricted oxygen supply. *Microbiology* 148:3881-3886.
- Hu Y, Coates A. 1999. Transcription of the Stationary-Phase Associated *hspX* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is inversely related to synthesis of the 16-kilodalton protein. *Journal of Bacteriology* 181:1380–1387.
- Iretton G, Greenwald R, Liang H, Esfandiari J, Lyashchenko P, Reed S. 2010. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* antigens of high serodiagnostic value. *Clinical and Vaccine Immunology* 17:1539.
- Kennaway C, Benesch J, Gohlke U, Wang L, Robinson C, Orlova E, Saibi H, Keep N. 2005. Dodecameric structure of the small heat shock protein Acr1 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* 280:33419-33425.
- Khan I, Ravindran R, Yee J, Ziman M, Lewinsohn D, Gennaro M, Flynn J, Goulding C, DeRiemer K, Lerche N, Luciw P. 2008. Profiling antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex microbead suspension arrays for serodiagnosis of tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 15: 433-438.
- Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten L, Netea M, Van Crevel. 2011. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biotechnology* 83:13-17.
- Knechel N. 2009. Tuberculosis: Pathophysiology, Clinical Features, and Diagnosis. *Critical Care Nurse* 29:34-43
- Kumar V, Abbas A, Fausto N. 2008. *Patología Estructural y Funcional*. 7ª Edición. Elsevier Saunders pp. 385-392.
- Lim A, Eleuterio M, Hutter B, Murugasu-Oei B, Dick T. 1999. Oxygen depletion-induced dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Bacteriology* 181:2252-2256.

Maglione P, Chan J. 2009. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Immunology* 39:676-686.

Narberhaus. 2002. α -crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in context of a multichaperone network. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66:64-93.

O'Loan C, Pollock J, Hanna J, Neill S. 1994. Immunoblot analysis of humoral immune responses to *Mycobacterium bovis* in experimentally infected cattle: early recognition of 26-Kilodalton antigen. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1:608 -611.

Palma-Nicolás J, Bocanegra-García V. 2007. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. *Archivos de Bronconeumología* 43:225-32.

Rabahi MF, Junqueira-Kipnis AP, Dos Reis MC, Oelemann W, Conde MB. 2007. Humoral response to HspX and GlcB to previous and recent infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Infectious Diseases* 7:1-9.

Raja A, Devi K, Ramalingam B, Brennan P. 2002. Immunoglobulin G, A, and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by de 16-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9:308-312.

Retamal P, Martínez M, Abalos P. 2003. Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 en cepas de *Mycobacterium bovis* provenientes de bovinos beneficiados en la Región Metropolitana. *Revista Chilena de Infectología* 20:166-170.

Roupie V, Romano M, Zhang L, Korf H, Young Lin M, Franken K, Ottenhoff T, Rkein M, Huyen K. 2007. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. *Infection and Immunity* 75:941-949.

Sabine E, Schnappinger D. 2009. Microbial survival strategies in the phagosome: defense against host stresses. *Cellular Microbiology* 11:117-1178.

Sartaint M, Slayden R, Singh K, Laal S, Belisle J. 2006. Disease state differentiation and identification of tuberculosis biomarkers via native antigen array profiling. *Molecular & Cellular Proteomics* 5:2102-13.

Secretaría de Salud. 2010. Tuberculosis en México. *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica* 25:1-3.

Secretaría de Salud. 2012. Situación actual de la tuberculosis en México 2010....Avances y desafíos. [Internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis/XV%20curso%20hgm%202011/lunes%202011/Situaci%C3%B3n%20y%20retos%20TB%20Curso%202011%20HGM.pdf>. [Revisado al 01 de septiembre de 2012].

Sherman D, Voskuil M, Schnappinger D, Liao, Harrell M, Schoolnik. 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding α -crystallin. 98:7534-7539.

Silva V, Kanaujia G, Gennaro M, Menzies D. 2003. Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 kDa and 14 kDa in patients with a spectrum of tuberculosis. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 7:478-484.

Sireci G, Dieli F, Di Liberto D, Buccheri, Pio La Manna M, Scarpa F, Macaluso P, Romano A, Titone L, Di Carlo P, Singh M, Ivanyi J, Salerno A. 2007. Anti-16-Kilodalton Mycobacterial Protein Immunoglobulin M Levels in healthy but purified protein derivative-reactive children decrease after chemoprophylaxis. Clinical and Vaccine Immunology 14:1231-1234.

Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. Clinical Microbiology Reviews 16:463-496.

Starck J, Källenius G, Marklund B, Andersson D, Åkerlund T. 2004. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* grown under aerobic and anaerobic conditions. Microbiology 150:3821-3829.

TB Database. 2010. [Internet]. Broad Institute Stanford School of Medicine. [Internet]. Disponible en el sitio red: <http://genome.tdb.org/annotation/genome/tbdb/GeneDetails.html?sp=S7000000635254781>. [Revisado al 07 de Octubre de 2012].

Torres M, Mendez-Sampeiro P, Jimenez-Zamudio L, Terant L, Camarena A. 1994. Comparison of the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* antigens between a group of patients with active pulmonary tuberculosis and health household contacts. Clinical & Experimental Immunology 96:75-78.

Vekemans J, Ota M, Sillah J, Fielding K, Alderson M, Skeiky Y, Dalemans W, McAdam K, Lienhardt C, Marchant A. 2004. Immune responses to mycobacterial antigens in gambian population: implications for vaccines and immunodiagnostic test design. Infection and Immunity 72:381-388.

Verbon A, Hartskeerl R, Schuitema A, Kolk A, Young D, Lathigra R. 1992. 14,000-molecular weight antigen of *Mycobacterium tuberculosis* related to the alpha-crystallin family of low-molecular-weight heat shock proteins. Journal of Bacteriology 174:1352-1359.

World Health Organization. 2009. Who report 2009, Global tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing. Geneva, Switzerland pp. 6-33.

Yuan Y, Crane D, Barry III C. 1996. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial α -crystallin homolog. Journal of Bacteriology 178:4484-4492.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Paola Janeth García Jacobo

Candidato para el grado de
Maestra en Ciencias con acentuación en Inmunobiología

Tesis: **ANÁLISIS DE LA RESUPUESTA HUMORAL CONTRA LA PROTEÍNA HspX DE *Mycobacterium tuberculosis* COMO BIOMARCADOR DE TUBERCULOSIS LATENTE.**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacida en Monterrey, N.L el 30 de Septiembre de 1983.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2007.

Experiencia Profesional: Química Analista, Hospital y Clínica OCA.
Química Analista, Doctors Hospital 2011-a la fecha