

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANTÍGENOS NO PROTEICOS PARA EL
INMUNODIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS – OBTENCIÓN
Y ANÁLISIS DE SU REACTIVIDAD SEROLÓGICA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOSÉ ALEJANDRO FIERRO VILLEGAS

DIRIGIDA POR

DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2019.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Antígenos no proteicos para el inmunodiagnóstico
de tuberculosis – obtención y análisis de su
reactividad serológica.

por

José Alejandro Fierro Villegas

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQLIN-237276



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANTÍGENOS NO PROTEICOS PARA EL
INMUNODIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS – OBTENCIÓN
Y ANÁLISIS DE SU REACTIVIDAD SEROLÓGICA”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

JOSÉ ALEJANDRO FIERRO VILLEGAS

DIRIGIDA POR

DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN

SINODALES

**DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN
DIRECTOR**

**DRA. MINERVA RAMOS GÓMEZ
ASESOR INTERNO**

**DRA. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO
SINODAL**

**DR. EDGAR JIMÉNEZ CERVANTES AMIEVA
SINODAL**

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
AGRADECIMIENTOS	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Tuberculosis	1
1.1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
1.1.2. Epidemiología y magnitud del problema	3
1.1.3. Síntomas	4
1.1.4. Transmisión	5
1.1.5. Respuesta del sistema inmune a <i>M. tuberculosis</i>	6
1.1.6. Clasificación actual de TB	7
1.1.7. Clasificación de micobacterias	7
1.1.8. Factores de riesgo y grupos vulnerables	8
1.1.9. Diagnóstico	10
1.1.10. Tratamiento	14
1.1.11. Prevención	15
1.1.12. Incidencia federal y en el Estado de Querétaro	15
1.2. Respuestas T dependiente y T independiente	17
1.3. Pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	19
1.3.1. Dimicocerosatos de ftiocerolos	21
1.3.2. Acil-trealosas	21

1.4.	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	26
1.5.	Inmunodiagnóstico de tuberculosis	27
1.6.	Antecedentes	29
2.	HIPÓTESIS	30
3.	OBJETIVOS	30
3.1.	General	30
3.2.	Específicos	30
4.	METODOLOGÍA	31
4.1.	Cultivo de <i>M. fortuitum</i>	31
4.2.	Extracción de lípidos	31
4.2.1.	Lavados de Folch	32
4.3.	Purificación e identificación de glicolípidos	33
4.3.1.	Purificación de DAT y TAT	34
4.3.2.	Purificación de DMT	34
4.4.	Purificación e identificación de fosfolípidos	35
4.5.	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	35
4.6.	Sueros anti-glicolípidos	36
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1.	Obtención de antígenos lipídicos	38
5.1.1.	Purificación e identificación de antígenos	40
5.1.2.	Purificación de DAT	43
5.1.3.	Purificación de TAT	44
5.1.4.	Purificación de DMT	45
5.1.5.	Purificación de PIMs	45
5.2.	Análisis por FT-IR	47

5.2.1. DAT	49
5.2.2. TAT	50
5.2.3. DMT	51
5.2.4. PIMs	52
5.3. ELISAs	53
5.3.1. Extracto total	53
5.3.2. DAT	54
5.3.3. TAT	55
5.3.4. DMT	56
5.3.5. PIMs	57
6. CONCLUSIONES	59
7. REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Factores de riesgo de padecer TB. Riesgo relativo comparando con el resto de la población sana.	9
2. Factores que dificultan el diagnóstico preciso y oportuno de TB. .	11
3. Sensibilidades y especificidades generales para los antígenos evaluados en el serodiagnóstico de tuberculosis pulmonar con Inmunoensayos detectando los anticuerpos IgG y/o IgA.	28
4. Asignación tentativa de la vibración de bandas asociada a los grupos funcionales en el espectro infrarrojo para lípidos de micobacterias.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Microscopía electrónica de barrido de <i>M. tuberculosis</i> , agente causal de la TB.	2
2. Incidencia estimada para TB en todas sus formas alrededor del mundo	4
3. Patogénesis de la TB.	6
4. Infección por <i>M. tuberculosis</i> y su desarrollo.	7
5. Tipos de inmunoensayos.	13
6. Tasa de incidencia y mortalidad por TB en todas sus formas en México por cada 100, 000 habitantes entre 1990 y 2012.	16
7. Elementos celulares y humorales de la respuesta inmune.	17
8. Pared celular de <i>M. tuberculosis</i> .	20
9. Estructura química general de los ácidos micocerósicos.	21
10. Acil-trealosas de <i>M. tuberculosis</i> .	24
11. Estructura química del fosfatidil-inositol-manósido (PIMs).	25
12. Estructura del 6,6'-dimicolato de trealosa.	26
13. Esquema de un lavado de Folch.	32
14. Purificación de glicolípidos mediante cromatografía en columna Sep-pak.	34
15. Esquema del fraccionamiento del extracto total de lípidos de <i>M. fortuitum</i> .	38
16. TLC analítica del extracto total de lípidos de <i>M. fortuitum</i> .	39
17. TLC analítica de las fracciones del extracto total lote 1.	41
18. TLC analítica de las fracciones del extracto total lote 2.	42
19. TLC analítica de purificación por columna Sep-pak de DAT.	43
20. TLC analítica de la purificación por columna Sep-pak de TAT.	44
21. TLC analítica de la purificación por precipitación con acetona en frío de DMT.	45

22. TLC analítica de purificación por columna Sep-pak de PIMs.	46
23. TLC analítica de purificación por columna Sep-pak de los PIMs.	47
24. Espectro FT-IR de DAT purificado.	49
25. Espectro FT-IR de TAT purificado.	50
26. Espectro FT-IR de DMT purificado.	51
27. Espectro FT-IR de PIMs purificados.	52
28. Evaluación del extracto total de lípidos de <i>M. fortuitum</i> como antígeno contra sueros de conejos.	53
29. Evaluación del antígeno DAT contra sueros de conejo.	55
30. Evaluación del antígeno TAT contra sueros de conejo.	56
31. Evaluación del antígeno DMT contra sueros de conejo.	57
32. Evaluación del antígeno PIMs contra sueros de conejo.	58

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que afecta al hombre y distintas especies desde hace miles de años. Hoy en día, este padecimiento es curable y se puede prevenir; sin embargo, continúa siendo uno de los problemas más graves de salud pública a nivel global. La lucha contra la TB se basa, en gran medida, en el correcto tratamiento de los casos contagiosos, por lo que una herramienta fundamental para el control de este padecimiento es el diagnóstico oportuno. Aún con los avances tecnológicos en el área biomédica, la identificación precisa de micobacterias es una necesidad, así como el desarrollo de pruebas diagnósticas efectivas. Una propuesta es el uso de antígenos no proteicos de naturaleza lipídica en el inmunodiagnóstico de TB. *Mycobacterium fortuitum* es un microorganismo que comparte diversas características genéticas y estructurales con *Mycobacterium tuberculosis*, sin presentar su alta patogenicidad. Se han reportado moléculas lipídicas presentes en la pared celular de ambas micobacterias como antígenos útiles para el serodiagnóstico de TB. El objetivo de este trabajo fue obtener y confirmar la identidad química de 4 moléculas lipídicas específicas de la pared celular de *M. fortuitum* que podrían ser de utilidad para el inmunodiagnóstico de TB.

*Este trabajo es para mis padres Martha y Guillermo y mi hermana Paola,
gracias por demostrarme que el amor más grande es entre padres y hermanos.*

Quiero ser el reflejo de su fuerza y pasión; ustedes son mi más admirable ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue realizado en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la Universidad Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla, Querétaro.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, a través del proyecto PAPIIT IT203518 por el apoyo correspondiente a la beca de titulación, así como los recursos para la realización del presente proyecto.

A los integrantes del Laboratorio de Ondas de Choque (LOCH), la Dra. Blanca Edith Millán Chiu y la Laboratorista Paula Bernardino Peláez, por su enseñanza y guía dentro del LOCH. Por supuesto, al Dr. Achim Max Loske Mehling por permitirme usar los equipos y espacios de su laboratorio.

De la misma manera, agradezco a la M. en C. Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla, por su contribución para la realización exitosa de este trabajo.

Se agradece el excelente apoyo técnico de la Dra. Genoveva Hernández Padrón del Laboratorio de Espectroscopía Óptica y del M. C. Cristian Felipe Ramírez Gutiérrez del Laboratorio de Radiometría del CFATA.

A mi comité tutorial: la Dra. Luz María López Marín y la Dra. Minerva Ramos Gómez, la Dra. Rosalía Camacho y el Dr. Edgar Jiménez por su invaluable guía durante mi formación y proceso de titulación.

Es importante para mí hacer una mención especial para mi directora de tesis, la Dra. Luz María López Marín, por quien siento una gran admiración y un profundo respeto. La singular alegría, pasión y compromiso que irradia por su profesión me motivó de principio a fin durante la realización de este proyecto.

También quiero agradecer a la comunidad del CFATA por permitirme integrarme tan cómodamente en su institución, especialmente a todos mis compañeros y amigos en el Laboratorio de Nanobio-óptica: Mariana, Ravi, Narz, Athenas, Carlos, María, Paulina y Arlen.

Gracias a mis amigos del fútbol y la calistenia por escucharme y motivarme fuera del ámbito académico. Ustedes me enseñan todos los días a esforzarme por mis metas. Me divierto mucho cotorreando con el Oscar y el Hernán.

Por último, le agradezco profundamente a Mirle por todo su apoyo, amor y respeto durante estos años.

1. ANTECEDENTES

1.1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad muy antigua que afecta principalmente a los pulmones. Es causada debido a la infección de una micobacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis*. Los orígenes de la TB, así como su distribución y el tiempo que ha estado presente en el mundo, no se han comprendido por completo. Se ha estudiado la prevalencia aparente de esta enfermedad a través de bovinos y mastodontes de la era de hielo, identificando DNA característico del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) en huesos de estos mamíferos. El caso confirmado de TB más antiguo es el de un bisonte extinto de más de 17,000 años de edad (Lee et al., 2012). Con la confirmación de TB en huesos animales mucho más viejos que cualquier esqueleto humano positivo, existe la posibilidad de que esta enfermedad haya evolucionado como una zoonosis antes de afectar al hombre.

En 1882 el Dr. Robert Koch, médico y microbiólogo alemán, probó que la causa de la TB era la infección de un microorganismo específico y describió una metodología para identificarlo al microscopio, dando inicio a interminables investigaciones en la lucha contra esta enfermedad (Sakula, 1983). Desde el año 1921, tras el desarrollo y la aprobación del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) como vacuna para este padecimiento, la mortalidad en niños vacunados se ha reducido un 90 % (Forbes, 2018).

Después de más de 100 años de avances en la medicina y en los estudios de la TB, hoy en día esta enfermedad sigue siendo uno de los problemas más graves de salud pública (OMS, 2018). Entre 1970 y 1990, debido al fortalecimiento de campañas de salud y a la preocupación por atender la amenaza de las enfermedades degenerativas (afecciones cardíacas, diabetes, sobrepeso, nutrición, etc.), el problema de la TB se desatendió.

Creer que la TB estaba controlada resultó en una curva de mortalidad creciente y en casos nuevos de esta enfermedad en todo el mundo, representando desde 2016 la mayor causa de muerte debido a un agente infeccioso a nivel mundial (Pliheu, 1998; CENAPRECE, 2017; OMS, 2018).

1.1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

El Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) de los Estados Unidos describe al agente causal de la TB, *M. tuberculosis*, como un bacilo con forma de bastón de aproximadamente 2 micrómetros de largo, perteneciente a los actinomicetos del género *Mycobacterium* y a la familia *Mycobacteriaceae* (Figura 1) (NIAID, 2015).

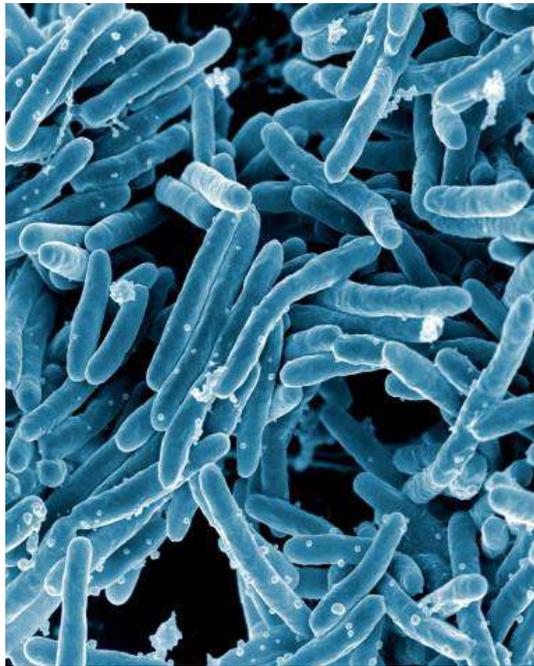


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de *M. tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis (TB). Imagen tomada de los reportes del NIAID, 2015.

Existen cientos de especies de micobacterias, en su mayoría, son bacterias estrictamente aerobias y grampositivas que además de encontrarse en los tejidos infectados de animales hospederos de sangre caliente, también están presentes como contaminantes biológicos del agua y los suelos (Forbes, 2017; Instituto Nacional de la Salud (NIH) de Estados Unidos, 2018).

Si las condiciones metabólicas (pH y tensión de oxígeno) son adecuadas para la bacteria, puede reproducirse y producir la enfermedad (Murray, 2014), en la mayoría de los casos dentro de los pulmones (tuberculosis pulmonar), formando lesiones llamadas cavernas (CENAPRECE, 2017). Al madurar, los bacilos dentro de las cavernas pueden invadir distintos órganos a través de la sangre y causar la enfermedad en diferentes zonas y tejidos del cuerpo (tuberculosis extrapulmonar) (CENAPRECE, 2017). En conjunto, los casos de TB extrapulmonar suponen del 10-20% del total de enfermos con TB. Los tipos de TB extrapulmonar más frecuentes son: TB miliar, pleural, linfática, ganglionar, meníngea, genital y ósea (Caminero, 2003).

1.1.2. Epidemiología y magnitud del problema

Las enfermedades infecciosas ocasionan anualmente más de una cuarta parte de las defunciones a nivel global (20 millones de muertes anuales) (OMS, 2016). En particular, seis entidades (VIH/SIDA, TB, diarreas, paludismo, sarampión y neumonías) representan el 90% de estas muertes, especialmente en países pobres. Actualmente, en el siglo XXI, gracias a las mejoras de sanidad e higiene sumadas a una mayor calidad nutricional y el alcance a antibióticos, la prevalencia de estas enfermedades se ha reducido (OMS, 2015).

La TB es una enfermedad curable. Sin embargo, los esfuerzos para detectar y curar a todos los enfermos son insuficientes. La falta de información sobre el contagio y los síntomas de TB, hacen que la magnitud del problema esté subestimada y lamentablemente, de los nueve millones de personas que contraen la enfermedad cada año, aproximadamente 3 millones mueren (a) OMS, 2014). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (b) OMS, 2014), 2300 millones de personas están infectadas por *M. tuberculosis* y se estima que entre 5-10% de éstas desarrollarán la enfermedad en algún momento de su vida (b) OMS, 2018).

Existen millones de portadores silenciosos de *M. tuberculosis*, que pueden albergar la infección de manera pasiva y nunca desarrollarán los síntomas de la enfermedad; a esta condición se le denomina TB latente (Secretaría de Salud, 2001).

La Figura 2 muestra los nuevos casos de TB en todas sus formas, estimados en 2017 en la población mundial. Es importante notar que el 95% de los casos se registran en países en desarrollo de África y Asia, donde el acceso a servicios de salud de calidad es limitado (OMS, 2017; a) OMS, 2018).

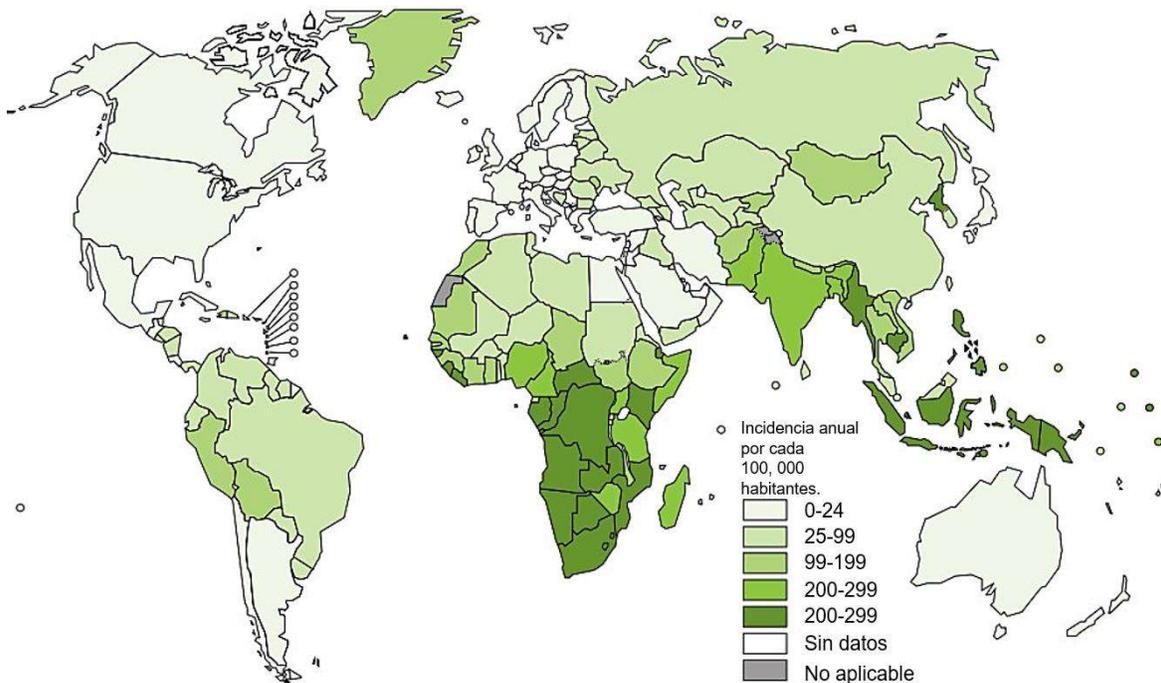


Figura 2. Incidencia estimada para tuberculosis en todas sus formas alrededor del mundo. Imagen consultada en el Reporte de Tuberculosis (TB REPORT) de la OMS, 2017.

1.1.3. Síntomas

Cuando una persona presenta fiebre, sudoración nocturna, fatiga, pérdida de apetito y, sobre todo, tos con flemas por al menos 15 días, muy probablemente padece TB. Cuando se presentan estos síntomas de manera aguda, al toser, los infectados transmiten la enfermedad, lo que se conoce como TB activa (CENAPRECE, 2017). Los síntomas de TB son padecimientos comunes que pueden confundirse con malestares causados por otras enfermedades, por lo que la gente suele

menospreciar las molestias y prolongar su visita al centro de salud, complicando su diagnóstico oportuno, recuperación y la contención de la enfermedad (CENAPRECE, 2017; Mickael & Roland, 2018).

1.1.4. Transmisión

Controlar y erradicar esta enfermedad resulta un gran problema debido que la transmisión se da principalmente vía aérea de persona a persona, a través microaerosoles producidos cuando un enfermo con TB activa estornuda, escupe, habla y, principalmente, al toser (Secretaría de Salud, 2013; OMS, 2017). Se estima que los bacilos *de M. tuberculosis* permanecen vivos dentro de estos aerosoles en el aire alrededor de 2 horas. Una persona que no sabe que está enferma puede contagiar hasta 10 contactos cercanos en 1 año (CENAPRECE, 2017).

Además de la vía aerógena, existen otros mecanismos de transmisión importantes, como son: la vía digestiva, contagiando al hombre generalmente al consumir carne de ganado vacuno infectado por *M. bovis*; por la vía urogenital, a través de la infección en las vías urinarias, por transmisión sexual y por vía transplacentaria, que determina la denominada TB congénita (Caminero, 2003).

El diagrama en la Figura 3 muestra el ciclo infeccioso de la enfermedad tuberculosa a través del aire. Del total de los nuevos contagios, entre 5-10 % desarrollarán los síntomas de manera aguda en los primeros 2 años después de la infección. El resto de los infectados albergará de manera pasiva la infección en los pulmones. El sistema inmunológico es el encargado de combatir a *M. tuberculosis*; en este esquema también se presentan las distintas células inmunitarias que colaboran para formar el granuloma y poder contener al bacilo. Estas células cumplen la función de pausar los mecanismos de replicación del bacilo y evitar su desarrollo.

La respuesta ante esta infección es mediada por células epiteliales y dendríticas, macrófagos alveolares y espumosos, neutrófilos y células gigantes, linfocitos B y T y células asesinas naturales (NK) (Ndlovu y Mohlopheni, 2016).

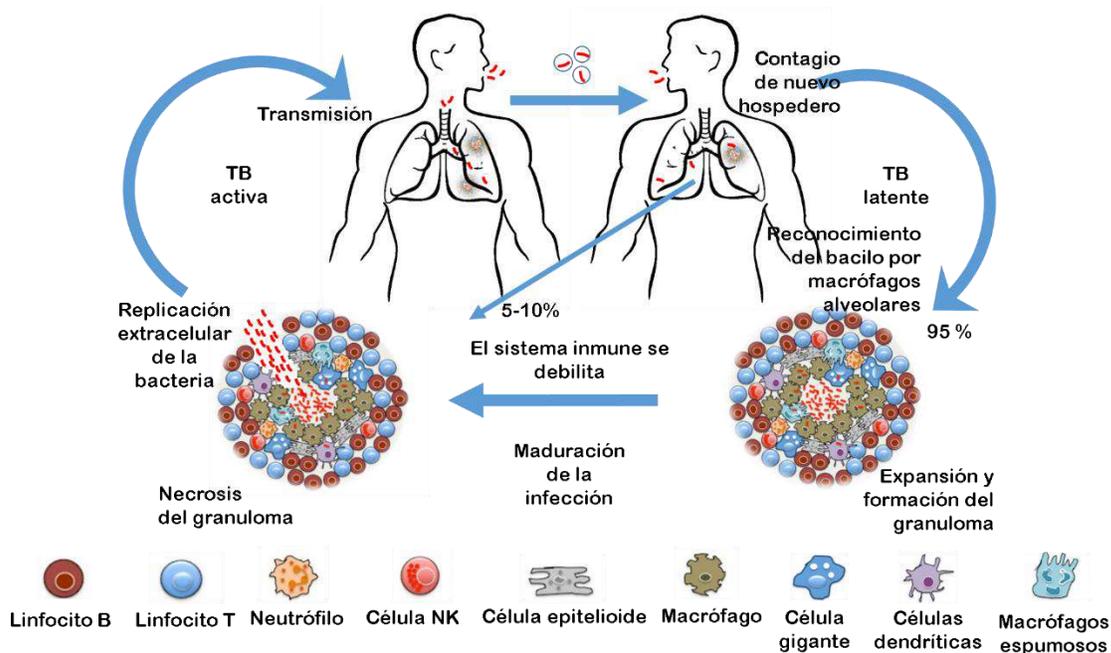


Figura 3. Patogénesis de la TB. La TB es transmitida a través del aire. En conjunto, distintas células están involucradas en evitar el desarrollo de la infección con la formación del granuloma; si estas células no pueden controlar al bacilo, su proceso de replicación continua hasta causar la enfermedad. Esquema adaptado de Ndlovu (2016).

1.1.5. Respuesta del sistema inmune a *M. tuberculosis*

Cuando nos debilitamos, por distintas causas, las defensas de nuestro organismo bajan y la micobacteria puede generar mecanismos para continuar su proceso de replicación dentro de los pulmones y posteriormente invadir otros tejidos a través de la sangre (Ndlovu y Mohlopheni, 2016). Al grupo de células que se forma para contener al bacilo de manera latente en nuestros pulmones se le llama granuloma. El granuloma está formado por varias células: linfocitos B y T, neutrófilos, células epiteliales, células asesinas naturales, células dendríticas, macrófagos espumosos y células gigantes (Figura 3) (Ndlovu y Mohlopheni, 2016).

1.1.6. Clasificación actual de la TB

Como ya se mencionó, no todas las personas infectadas por *M. tuberculosis* desarrollarán la enfermedad; de hecho, solamente el 5 % de los nuevos casos anuales presentarán la sintomatología aguda en un periodo aproximado de 2 años, en su mayoría niños (Figura 4) (Abel y col., 2014). Al resto de la población expuesta al bacilo que mantiene la infección de manera pasiva dentro de su organismo, se les llama portadores de TB latente. Las personas con TB latente pueden o no desarrollar la enfermedad. Del total de personas expuestas al bacilo, muchas (80 - 90%) no lograrán eliminarlo, dando paso a la infección pulmonar. La gran mayoría de los infectados (95 %) permanecerán como casos de TB latente, mientras que el 5% de los infectados desarrollarán los síntomas de manera aguda, aproximadamente 2 años después de la infección. Esta infección 'primaria' es menos controlable y particularmente común en niños y adultos mayores; en su mayoría, las infecciones primarias están asociadas a TB extrapulmonar. Algunos pocos infectados latentes reactivarán TB en algún momento de sus vidas, normalmente (80 % de los casos) en los pulmones (Figura 4) (Secretaría de Salud, 2013).

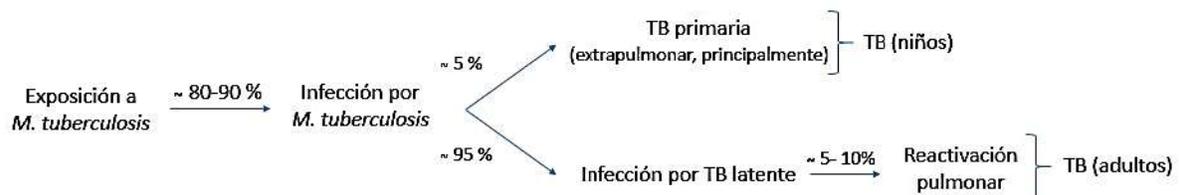


Figura 4. Infección por *M. tuberculosis* y su desarrollo. El esquema muestra las diferentes condiciones que se pueden desarrollar después de albergar al bacilo en los pulmones. Adaptado de Abel (2014) y la Secretaría de Salud (2013).

1.1.7. Clasificación de micobacterias

Los avances en la microbiología y la biología molecular han revolucionado los estudios epidemiológicos de muchos agentes causales de enfermedades infecciosas, incluyendo la tuberculosis. Actualmente, se han reportado alrededor de 200 tipos o cepas de micobacterias (Forbes, 2016).

Al igual que los seres humanos, las micobacterias han evolucionado, adaptándose a su entorno mediante mecanismos de su pared celular, por lo que continúa estando presente en todo el mundo (OMS, 2017) (a) OMS, 2018).

Las micobacterias suelen clasificarse en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) o como micobacterias no tuberculosas (MNT). El MTC se caracterizan por ser de crecimiento lento y por tener un hospedero animal natural en el que pueden causar enfermedades similares a TB (CENAPRECE, 2017; OMS, 2017).

El MTC incluye a las siguiente micobacterias: *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti*, cuyo reservorio natural es el hombre, *Mycobacterium bovis*, que infecta bovinos, *Mycobacterium caprae*, que infecta ganado caprino, *Mycobacterium pinnipedi*, que infecta a las focas y *Mycobacterium microti*, que infecta roedores y murinos.

1.1.8. Factores de riesgo y grupos vulnerables

No todas las personas infectadas por *M. tuberculosis* tienen la misma probabilidad de desarrollar TB activa. Los grupos más vulnerables son niños menores de 5 años, adultos mayores (65-70 años) y pacientes con VIH y/o diabetes (Caminero, 2003), debido al grado de inmunodeficiencia que se puede tener en estas edades y con estos padecimientos (CENAPRECE, 2017).

Interesantemente, en todas las poblaciones estudiadas a nivel mundial, la TB afecta más frecuentemente a hombres (60-70 %) que a mujeres (Caminero, 2003). Esta situación podría ser justificada por la predisposición genética, los receptores específicos y los niveles hormonales en ambos sexos. Los factores moleculares podrían sensibilizar al hombre a la infección del bacilo y a desarrollar la enfermedad más frecuentemente (Nhamoyebonde y Alasdair, 2014; Horton y col., 2016).

A la serie de circunstancias que facilitan al desarrollo de la enfermedad se les denomina factores de riesgo. En el Cuadro 1 se exponen estos factores y su riesgo relativo de padecer TB con respecto a la población normal.

Cuadro 1. Factores de riesgo de padecer TB. Riesgo relativo comparando con el resto de la población sana.

Factores de riesgo	Porcentaje (%)
Infección por VIH	50-100
Cortocircuito yeyunoileal	27-63
Cáncer	1-10
Silicosis	8-34
Hemodiálisis	10-15
Lesiones fibróticas	2-14
Fármacos inmunosupresores	2-12
Hemofilia	9
Gastrectomía	5
Bajo peso corporal	2-4
Diabetes mellitus	2-4
Fumadores importantes	2-4
Población normal	1

Adaptado de Caminero (2003).

1.1.9. Diagnóstico

Dada la importancia que representan las enfermedades infecciosas para la población mundial, los esfuerzos para erradicarlas han sido apoyados por muchas instituciones gubernamentales y grandes inversionistas internacionales preocupados por la salud desde principios del siglo XXI (Anderson, 2007). Acompañados por la innovación y las tecnologías emergentes, estos esfuerzos se dirigen cada vez más hacia el diagnóstico temprano de las enfermedades (Arinaminpathy y Dowdy, 2015).

También es muy importante mencionar que si el diagnóstico de TB se realiza a tiempo, el tratamiento resulta altamente efectivo, funciona en el 95 % de los casos si se concluye al pie de la letra y bajo seguimiento médico (Murray, 2004; CENAPRECE, 2017). Por esta razón, desde hace 2 décadas algunas de las estrategias internacionales en la lucha contra la TB han fortalecido los programas para la difusión de información sobre el contagio y los síntomas, así como de su diagnóstico oportuno (Arinaminpathy y Dowdy, 2015; OMS, 2017). Sin embargo, múltiples factores (Cuadro 2) condicionan su detección temprana, complicando cortar la cadena de transmisión y erradicar esta enfermedad.

El desarrollo tecnológico de nuevas pruebas diagnósticas, su implementación y uso en los centros de salud de manera exitosa, nos acerca a controlar la TB. Evaluar la validez y precisión de estas pruebas resulta de máxima importancia, para lo que se utilizan dos parámetros: la especificidad y sensibilidad (Schulz y Grimes, 2002).

La especificidad de una prueba es la probabilidad de que un sujeto sano tenga un resultado negativo. Por otra parte, la sensibilidad o límite de detección es la probabilidad de una prueba para detectar correctamente un resultado positivo (Schulz y Grimes, 2002).

Cuadro 2. Factores que dificultan el diagnóstico preciso y oportuno de TB.

Factores	Comentarios
Distintos tipos (cepas) de micobacterias	Resulta complicado identificar con certeza las diferentes micobacterias presentes en el ambiente y en nuestro organismo, que a pesar de sus similitudes con <i>M. tuberculosis</i> , no causan la enfermedad.
Falta de información de la población	Los millones de infectados pasivos de TB desconocen que son portadores.
Poca sospecha por parte de los profesionales de la salud	Debido a los síntomas comunes de TB, suele confundirse con otras enfermedades infecciosas.
Tiempo tomado por los pacientes para buscar ayuda	Normalmente el periodo entre la aparición de los primeros síntomas y la visita al centro de salud para diagnosticar su padecimiento, es prolongado.
Costo	Muchas de las nuevas pruebas diagnósticas moleculares han mostrado ventajas para la detección de TB, sin embargo, su elevado precio al público dificulta su implementación en los centros de salud de las comunidades más afectadas.
Cobertura y sencillez	Para aumentar la búsqueda e identificación de probables infectados, es necesario que las pruebas puedan ser realizadas por personal no especializado y sean reproducibles a bajo costo.
Sensibilidad y especificidad	Indican la confianza de las pruebas.

Adaptado de Caminero (2003).

Desde hace más de un siglo, en todo el mundo, se han desarrollado e implementado diferentes métodos para la detección de TB; a continuación, se mencionan los más utilizados y difundidos en la actualidad por los centros de salud en México:

- Baciloscopía: El diagnóstico más comúnmente utilizado para TB consiste en la tinción específica de *M. tuberculosis* en frotis de esputo. El fundamento de esta prueba se conoce desde hace más de 100 años y considera la permeabilidad de la pared celular del bacilo (BAAR: bacilos ácido-alcohol resistentes). Con ayuda de colorantes específicos, que puedan fijarse en la superficie de estas bacterias, se busca al microscopio la presencia de bacilos tuberculosos. Además de sugerir el diagnóstico de TB pulmonar, indica la gravedad de la infección.
- Cultivo LJ: El cultivo de micobacterias sigue siendo el estándar de oro de las pruebas diagnósticas de laboratorio. Para realizar esta técnica se debe llevar a cabo un pretratamiento descontaminante de las muestras y posteriormente sembrar en el medio de cultivo Lowenstein Jensen (LJ), bajo condiciones estériles. El medio LJ está adicionado con yema de huevo, que coagula y le da solidez al medio; fosfato monopotásico, sulfato y citrato de magnesio; glicerol como fuente de carbonos y asparagina, como fuente de nitrógeno; además de verde de malaquita que inhibe el crecimiento de otras bacterias. La tasa de reproducción de *M. tuberculosis* es de 24 horas, por lo que la presencia de bacilos puede confirmarse tras 42 días de crecimiento.
- Inmunoensayo acoplado a enzimas (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*, por sus siglas en inglés): Los ELISAs detectan las reacciones antígeno-anticuerpo en fluidos de individuos infectados, en placas de microtitulación. Son una alternativa muy precisa para la detección de distintas enfermedades. Las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden detectar cantidades diminutas de un analito blanco específico (nanogramos por microlitro).

Utilizando enzimas se cataliza una reacción específica, virando el color de la solución. El cambio de color está dado en función de la concentración de antígeno en la muestra (Engvall, 1971; Hnasko Robert, 2015).

Para cuantificar la interacción antígeno-anticuerpo, la concentración de antígeno en la microplaca debe ser conocida previamente a su incubación. Después de realizar esta técnica, el cambio de color en los pozos se mide con ayuda del espectrofotómetro. La concentración de anticuerpos es proporcional al desarrollo de color.

Existen diferentes tipos de ELISAs clasificados por la manera de cuantificar la señal de interacción antígeno-anticuerpo. Esta interacción se puede medir directa o indirectamente (ELISA directo o indirecto) (Figura 5). Los ELISAs directos detectan antígenos con anticuerpos primarios conjugados a una enzima; de manera similar, los ELISAs indirectos detectan un anticuerpo primario, mediante un anticuerpo secundario producido en otra especie y que está conjugado a una enzima.

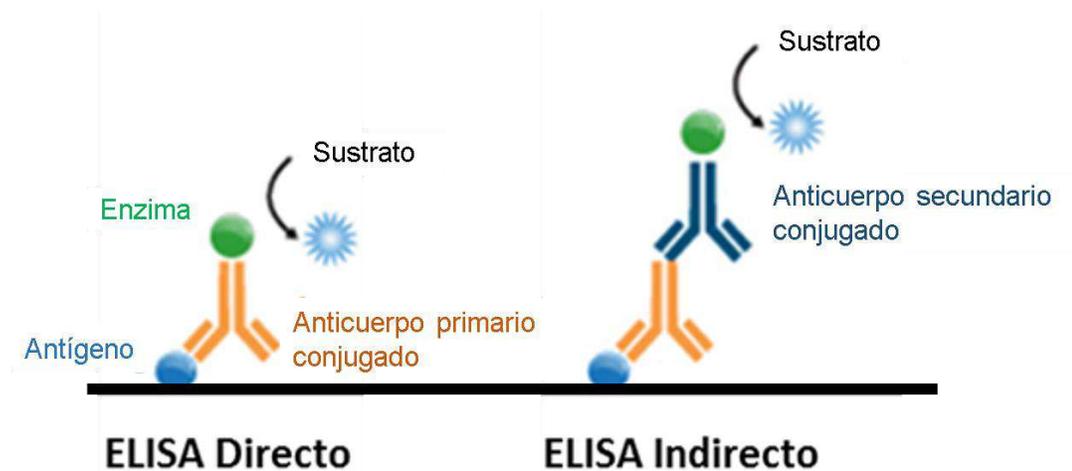


Figura 5. Tipos de inmunoensayos. Se muestra la detección de la interacción antígeno-anticuerpo mediante ELISAs directos e indirectos. Adaptado de Wang y col. (2012).

- Gene *Xpert* MTB/RIF: Esta técnica ofrece resultados altamente específicos de manera rápida en el diagnóstico de TB. Consiste en introducir una muestra

de esputo en cartuchos, y a su vez colocar éstos en el sistema GeneXpert. Este sistema realiza una PCR semianidada automatizada con 5 diferentes sondas de DNA dirigidas específicamente hacia el genoma de *M. tuberculosis*. Si el bacilo está presente, cuantifica la amplificación de sus genes.

Los cultivos continúan siendo el diagnóstico definitivo de TB, aunque presentan tiempos de crecimiento muy largos (hasta 12 semanas), resultando poco eficientes para diagnósticos rápidos (WHO, 2017). Recientemente, la OMS ha manifestado la urgencia que vivimos como sociedad por encontrar nuevos métodos de detección rápida para TB (Kamariza y col., 2018).

Las nuevas pruebas diagnósticas moleculares de TB presentan ventajas sobre las pruebas tradicionales, siendo poco invasivas, disminuyendo tiempos de detección, y aumentando los valores de sensibilidad y especificidad sin requerir del crecimiento ni la manipulación de *M. tuberculosis* (FIND, 2008).

1.1.10. Tratamiento

Una vez detectada confiablemente, el tratamiento de TB se prescribe por el personal médico en cualquiera de sus formas (sensible o fármaco-resistente). El abordaje de casos de TB primaria con 4 fármacos durante 6 meses, llamados de primera línea (rifampicina, isoniacida, pirazinamida y etambutol), es gratuito, altamente efectivo y cura a los pacientes hace casi de 50 años (Pilheu, 1998; Secretaría de Salud, 2013). Aun así, el estado del arte indica un recrudecimiento de TB en los últimos 30 años, incluso en países donde se creía controlada (Delogu y col., 2013).

Los casos con TB fármaco-resistente, multifármaco-resistente y fármaco-resistente extendida son mucho más complejos y costosos. Para éstos, se prescriben 6 fármacos de segunda línea durante dos años, por personal médico especializado, tomando en cuenta el estudio de susceptibilidad a fármacos y el historial médico de cada paciente (CENAPRECE, 2017).

Es fundamental prevenir la aparición de casos de bacterias con resistencia a fármacos y garantizar la curación de los infectados. Para esto, el personal de salud debe hacer mucho hincapié en la adherencia terapéutica de los casos sensibles con base en la estrategia TAES (Tratamiento Alargado Estrictamente Supervisado) (Caminero, 2003; OMS, 2017; CENAPRECE, 2017).

1.1.11. Prevención

Para prevenir que los nuevos casos de TB en México y en el mundo aumenten, es necesario aumentar la búsqueda de posibles enfermos e indagar en grupos vulnerables, considerando los determinantes sociales y de salud vinculados a esta antigua enfermedad, además de implementar, mejorar y consolidar las estrategias TAES y “Alto a la Tuberculosis” (STOP TB) globalmente. Gracias a las estrategias del TAES y STOP TB recomendadas por la OMS, entre 1995 y 2012, 56 millones de personas enfermas fueron detectadas y tratadas correctamente contra TB, salvando aproximadamente 22 millones de vidas (Secretaría de Salud, 2018).

1.1.12. Incidencia federal y en el estado de Querétaro

En México se registran en promedio 19000 casos con TB en todas sus formas y 2000 muertes anuales por esta enfermedad. La TB pulmonar es la forma más frecuente (80 %) (CENAPRECE, 2017). Nuestro país cuenta con un Programa de Acción Específico (PAE) para la Prevención y el Control de la TB, el cual constituye un instrumento que orienta a las instituciones de salud a ofertar servicios y atención de calidad, abordando de manera práctica y confiable las distintas problemáticas sociales de la salud para este fin. El PAE está basado específicamente en los lineamientos de prevención y control descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM006-SSA2-2013 para la prevención y control de TB, misma que es de carácter obligatorio para todo el personal de las unidades de atención médica del Sistema Nacional de Salud, siendo responsable de vigilar y verificar su cumplimiento la Secretaría de Salud y los gobiernos de cada estado (Secretaría de Salud, 2013).

La Secretaría de Salud en conjunto con la Dirección General de Epidemiología (DGE) y el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE), combinan esfuerzos para controlar la TB en México (CENAPRECE, 2017; Secretaría de Salud, 2018).

En 1997 se registró la mayor incidencia de nuevos casos de TBTF en México, con 24300 personas diagnosticadas TB positivo, de las cuales 4300 fallecieron. La tasa de mortalidad ha disminuido desde entonces. En 2013, el PAE contra TB indicó que entre los años 2002 y 2012 se mantuvo un promedio de 2400 defunciones por esta causa anualmente (Figura 6) (Secretaría de Salud, 2013). La reducción de la mortalidad por TBTF a través de los años, es el reflejo de un mayor y gradual incremento en el porcentaje de éxito de los programas implementados para el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad en nuestro país, a través de la estrategia del TAES, cuyo objetivo es cortar la cadena de transmisión de la enfermedad (CENAPRECE, 2017; Secretaría de Salud, 2018).

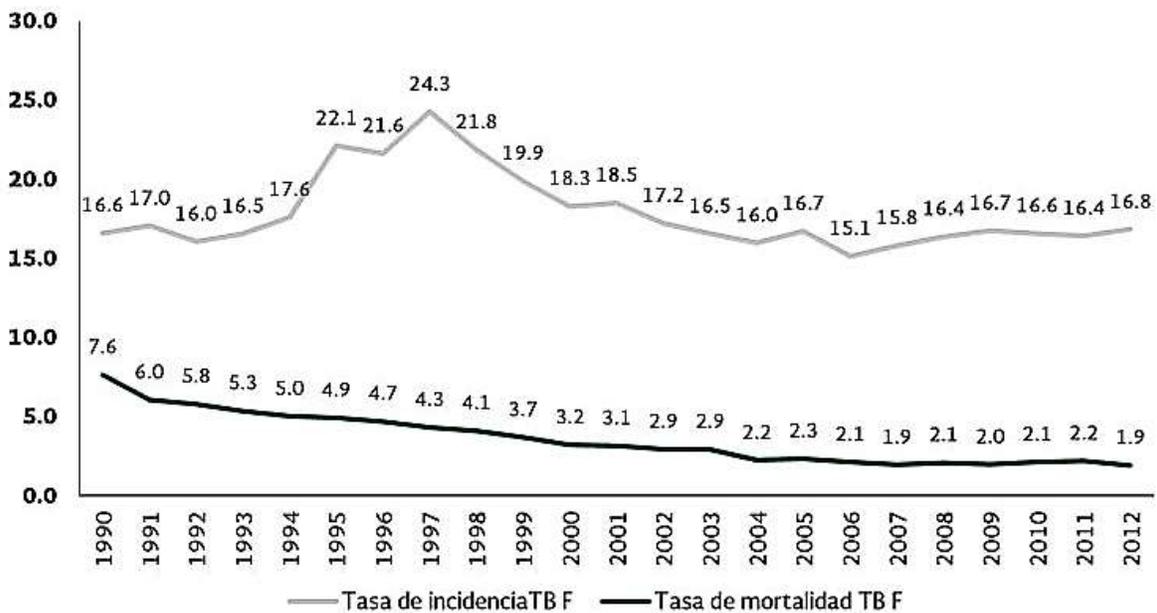


Figura 6. Tasa de incidencia y mortalidad por TB en todas sus formas en México por cada 100, 000 habitantes entre 1990 y 2012. Secretaría de Salud (2013).

1.2. Respuestas T dependiente y T independiente

Las células y moléculas responsables de la inmunidad ante agentes infecciosos constituyen el sistema inmune, y a su respuesta conjunta y coordinada para eliminar agentes extraños se le llama respuesta inmunitaria (Abbas, Lichtman y Pillai, 2015).

La defensa contra los microbios está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa (Abbas, Lichtman y Pillai, 2015). Los mecanismos de la inmunidad innata proporcionan la defensa inicial contra las infecciones (en las primeras 12 h después de la infección); mientras que, las respuestas adaptativas son más específicas, aparecen después y requieren la activación de linfocitos (en los primeros 7 días después de la infección) (Figura 7).

Generalmente, los linfocitos T son estimulados por células de la inmunidad innata al reconocer antígenos específicos de diferentes microbios. Un antígeno es cualquier molécula que activa la respuesta del sistema inmune (Abbas, Lichtman y Pillai, 2015).

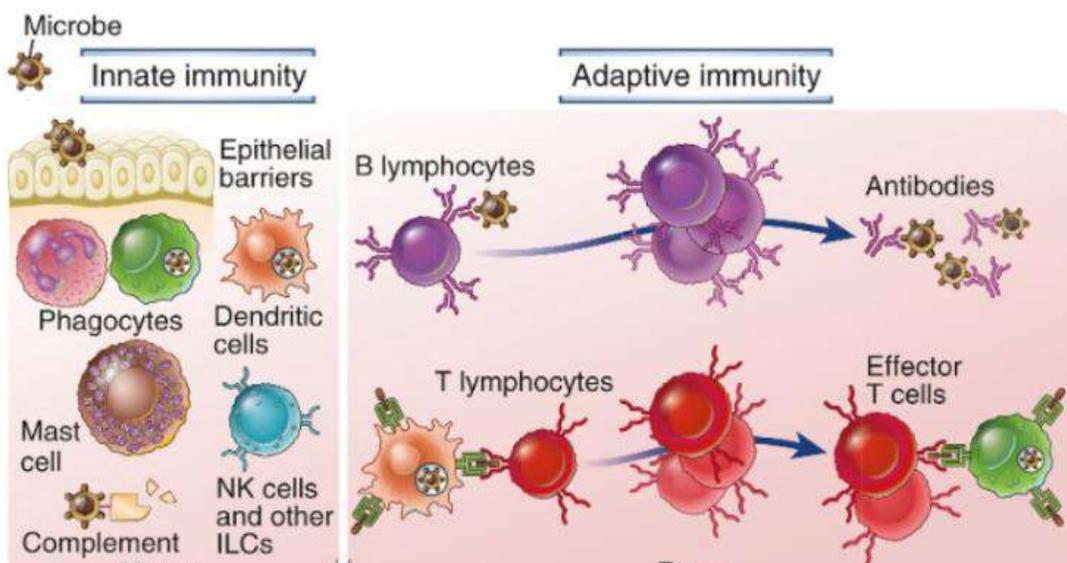


Figura 7. Elementos celulares y humorales de la respuesta inmunitaria. La imagen fue tomada del libro Inmunología celular y molecular, Abbas, Lichtman y Pillai, 2015.

La respuesta inmunitaria frente a antígenos de agentes patógenos es sumamente compleja (Cliff y col., 2015); sin embargo, existen patrones generales que permiten describirla. Por ejemplo, el modo de supervivencia y la relación de un patógeno con su huésped. Las bacterias particularmente, varían en sus mecanismos de infección; estos pueden ser intracelulares o extracelulares. *M. tuberculosis* es una bacteria de vida intracelular que puede sobrevivir manipulando la transducción de señales en las células que infecta, evitando así mecanismos de degradación celular para continuar su ciclo infeccioso (Xi Chen, 2015).

Una vez dentro de la célula, la protección de anticuerpos contra *M. tuberculosis* es poca o nula (Abbas, Lichtman y Pillai, 2015); interesantemente, nuestros linfocitos B producen anticuerpos específicos contra componentes de la pared celular de esta bacteria, los cuales podrían tener valor diagnóstico (Wang, 2018). La importancia del estudio de anticuerpos para la identificación de patógenos intracelulares, como *M. tuberculosis*, no ha sido determinada.

De acuerdo a sus propiedades inmunoestimulantes, los antígenos pueden clasificarse como T dependientes y T independientes. La respuesta timo-dependiente requiere de la cooperación de linfocitos T CD4+ que liberan citocinas, induciendo la proliferación y diferenciación en linfocitos B que han contactado antígenos a través de su receptor específico. La respuesta humoral a antígenos proteicos se caracteriza además de ser timo dependiente, por presentar variación isotípica, maduración de afinidad y por generar memoria inmunológica (Abbas, Lichtman y Pillai, 2015).

Por el contrario, la respuesta inmunitaria humoral también puede ser independiente de las células T cooperadoras. Los antígenos timo-independientes se localizan frecuentemente en la superficie de macrófagos de la zona marginal de ganglios linfáticos y del bazo, donde son reconocidos directamente por linfocitos B (Harriff y col., 2017). En las respuestas timo-independientes pueden participar antígenos lipoproteicos constituyentes de la pared celular, como bacterias gram negativas

(endotoxinas) o micobacterias (lípidos de su superficie celular) que son capaces de estimular gran cantidad de linfocitos B en forma directa e independiente del receptor específico. Estas respuestas son de inducción rápida, de carácter transitorio y no desarrollan memoria, por lo que resultan de mucha importancia para el diagnóstico oportuno de enfermedades (Abbas Lichtman y Pillai, 2015).

La reactividad de los glicolípidos pertenecientes a la familia de las trealosas de *M. fortuitum* ha sido evaluada mediante ELISAs en pacientes humanos (Escamilla y col., 1996). Las trealosas di- y tri-O-aciladas de este microorganismo mostraron una mayor respuesta (sensibilidad 0.98 y especificidad 0.867) contra los anticuerpos séricos de pacientes con TB pulmonar avanzada que contra los sueros de individuos sanos (Escamilla y col., 1996). No obstante, la utilidad de estos reactivos para detectar TB de manera temprana aún no ha sido determinada.

1.3. Pared celular de *M. tuberculosis*

La pared celular de las especies micobacterianas es de suma complejidad. Abundante en distintas grasas, está compuesta por peptidoglicanos, glicolípidos y ácidos micólicos (ácidos grasos de alto peso molecular, característicos de las micobacterias) (Forrellad y col., 2013; Carel, 2014). Todos estos lípidos, polares y apolares, hacen a la bacteria impermeable a muchas sustancias (Minnkin y col., 1991).

El complejo peptidoglicano-arabinogalactano-micolatos (MAPc) es un polímero formado por unidades de distintos lípidos, azúcares y aminoácidos; el esqueleto de la pared celular de *M. tuberculosis* está compuesto por las estructuras de MAPc. La Figura 7 muestra un modelo de la pared celular de *M. tuberculosis*, en la cual se observa el arreglo impermeable de los lípidos junto con otras moléculas que integran la estructura de su pared celular.

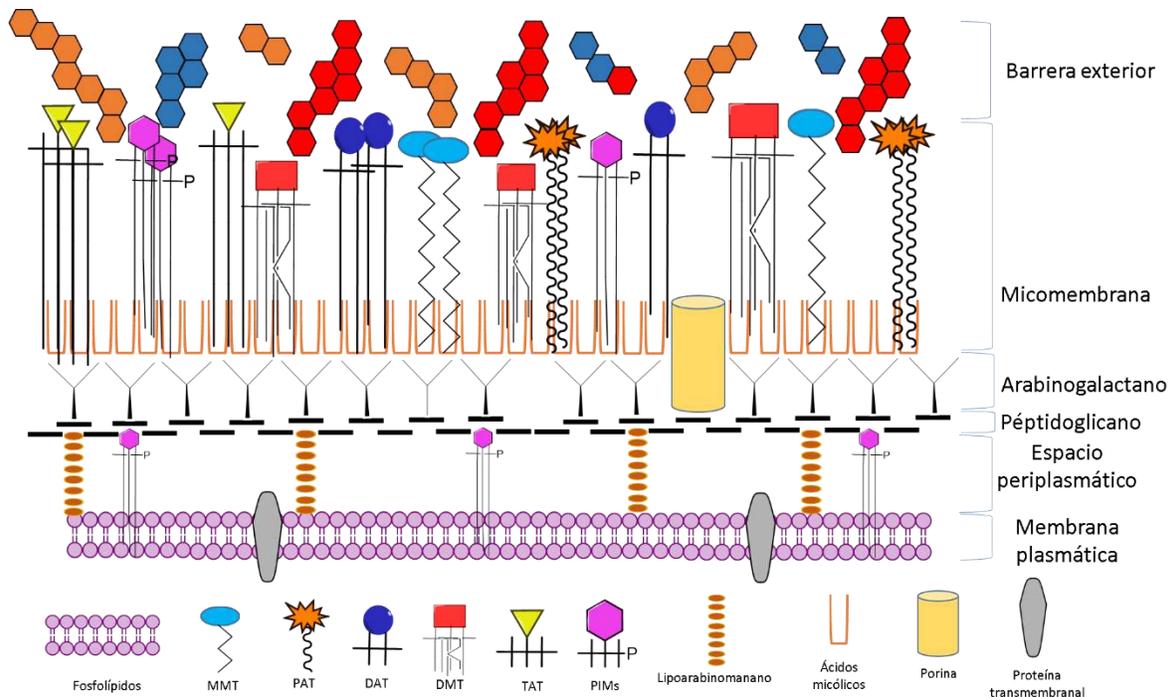


Figura 8. Pared celular de *M. tuberculosis*. Se muestra un modelo adaptado de Marrakchi y col. (2014) y Zuber y col. (2008).

En el primer nivel interno, se muestra una bicapa lipídica formando una membrana plasmática, seguida del espacio periplasmático, en el que se ha reportado la presencia de glicofosfolípidos y el lipoarabinomano, que está unido al arabinogalactano, estructura que se encuentra unida covalentemente al peptidoglicano por enlaces fosfodiéster, y a los ácidos micólicos en su extremo más distal mediante puentes de hidrógeno. Además, se presenta una micromembrana, estructura compuesta por muchísimos ácidos micólicos y otros glicolípidos característicos de las micobacterias (Carel y col., 2014).

Las principales moléculas lipídicas apolares encontradas en *M. tuberculosis* son los triacilglicéridos, los cuales funcionan como reservas de energía y generalmente se encuentran contenidos en vesículas intracelulares (Caminero, 2003). Los glicofosfolípidos son moléculas lipídicas de alta polaridad debido a su grupo fosfato, además de los azúcares presentes en su estructura. A estos glicolípidos se les atribuyen propiedades antigénicas importantes durante el ciclo infeccioso y el

desarrollo de la bacteria, por lo que resultan blancos prometedores para el diagnóstico de TB (Escamilla y col., 1996).

A continuación, se presentan algunas de las moléculas lipídicas con actividad antigénica en la pared celular de *M. tuberculosis*:

1.3.1. Dimicocerosatos de ftioceroles

Por sí solos, estos compuestos no son antigénicos; sin embargo, su estructura apolar (Figura 9) es extremadamente abundante en las vacuolas de la pared celular de micobacterias y son componentes importantes de moléculas antigénicas. Pertenecen al grupo de los ácidos micocerósicos esterificados con dioles de cadena larga, a los que se refiere como ftioceroles, característicos por tener varios grupos metilos cercanos al grupo carboxilo (Minnikin y col., 1991).

Ácido micocerósico

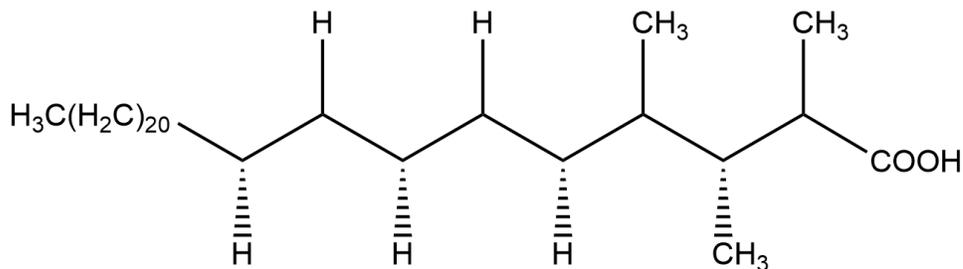


Figura 9. Estructura química general de los ácidos micocerósicos. Estructura basada en reportes de Minnikin y col. (1991) y Marrakchi y col. (2014).

1.3.2. Acil-trealosas

Los mayores componentes polares libres en la pared celular de *M. tuberculosis* son las trealosas aciladas, las cuales varían enormemente en cuanto a su patrón de acilación por trealosa y su contenido de ácidos grasos. Estas moléculas se han reportado como importantes factores de virulencia durante el proceso de infección

del bacilo y son producidos por un número muy limitado de especies de micobacterias de crecimiento lento, en su mayoría, patógenas para los humanos. También algunas micobacterias de crecimiento rápido producen acil-trealosas, como *M. fortuitum*. Las acil-trealosas desempeñan un papel fundamental en la patogenicidad de *M. tuberculosis* al modular la respuesta inmune del huésped durante la infección (Simeone y col., 2013).

Su estructura consiste en una cadena grasa terminada por una trealosa. La cadena sacarídica puede estar ramificada con residuos de azúcar, unidades de ramnosilo y fucosilo terminal O-metilados (Simeone y col., 2013).

1.3.2.a. DAT

2,3-di-O-aciltrealosa (DAT) es un glicolípido polar (Figura 10 A) localizado en la parte externa de la pared celular de *M. tuberculosis*. Contiene una combinación de ácidos grasos de cadena lineal con micocerosatos de 21 a 25 átomos de carbono. Saavedra y colaboradores, demostraron que este glicolípido inhibe la proliferación celular de linfocitos en modelos murinos (Saavedra y col., 2001).

1.3.2.b. TAT

Las triacil-trealosas (TATs) (Figura 10 B) son glicolípidos presentes en el MTC, así como en *M. fortuitum*. Se ha descrito que estas moléculas pueden estar integradas por ácidos grasos en las posiciones 2, 3 y 4 ó 2, 3 y 6, y en las posiciones -no saturados con sustituyentes ftienoil, cadenas de átomos de carbono metiladas de 25 carbonos (Muñoz y col., 1997).

1.3.2.c. DMT

El 6,6'-dimicoloil-D-trealosa (dimicolato de trealosa, DMT) (Figura 12) también llamado factor cuerda, es uno de los glicolípidos mejor estudiados en *M. tuberculosis* debido a sus propiedades inmunoestimulantes. Induce la producción de distintas interleucinas (IL) (IL-4, IL-6 e IL-10) y citocinas pro-inflamatorias.

El DMT funge un papel crítico durante la formación del granuloma y el proceso de infección de esta bacteria en su hospedero, permitiéndole sobrevivir dentro del sistema inmune (Indrigo y col., 2003; Velasco, 2008). Además, es la molécula responsable de la agrupación de bacilos en cadenas paralelas (tipo cordón), y está estrechamente relacionada con las cepas virulentas (Velasco, 2008).

Se ha demostrado que el DMT es responsable de la inhibición del reclutamiento de linfocitos polimorfonucleares al sitio de colonización, e induce la formación del granuloma (Romero, 2007).

1.2.2.d. PIMs

En la Figura 11 se presenta la estructura química de los fosfatidil-inositol-manósidos (PIMs), una familia de glicolípidos polares que integran la pared celular de todas las especies de micobacterias. Se ha reportado la importancia de estos lípidos en la inmunopatogénesis de *M. tuberculosis* (Fong-Fu y col., 2007). Estas moléculas pueden promover el reclutamiento de macrófagos y la secreción de citocinas proinflamatorias en el cuerpo humano.

Los PIMs son producto del gen *Rv2869* en *M. tuberculosis*. Forrellad y col. Reportan a los PIMs como importantes factores de virulencia debidos a este gen. Además, demuestran su participación en múltiples vías biosintéticas de lípidos libres; la interrupción en la traducción de este gen resulta en múltiples alteraciones en la antigenicidad y estabilidad de su pared celular (Forrellad y col., 2013).

En las Figuras 10 11 y 12, se muestran las estructuras químicas de algunos de los glicolípidos y glicofosfolípidos más estudiados en *M. tuberculosis*, los cuales fueron obtenidos y purificados a partir de *M. fortuitum* para su análisis contra sueros de conejos hiperinmunes.

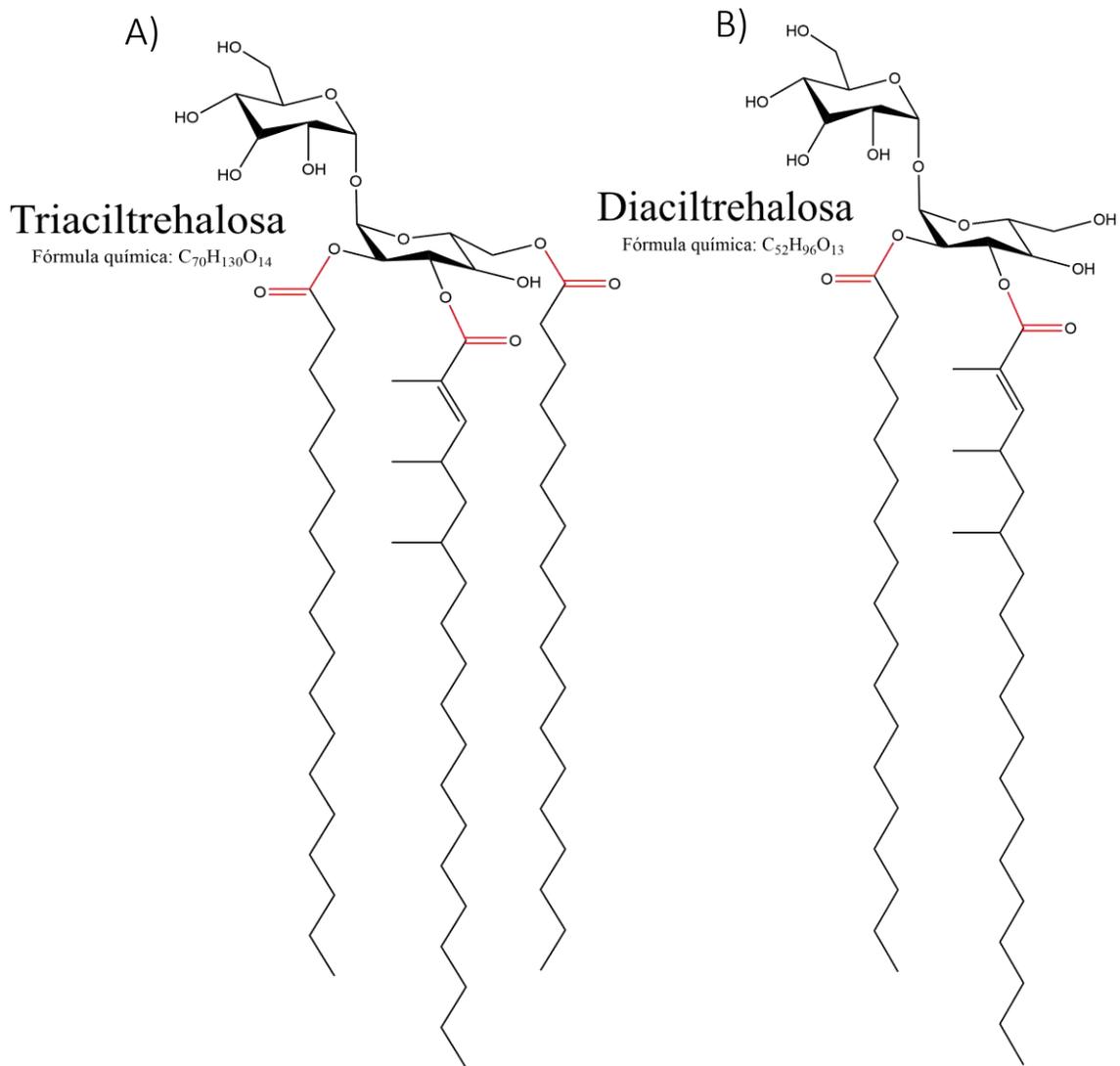
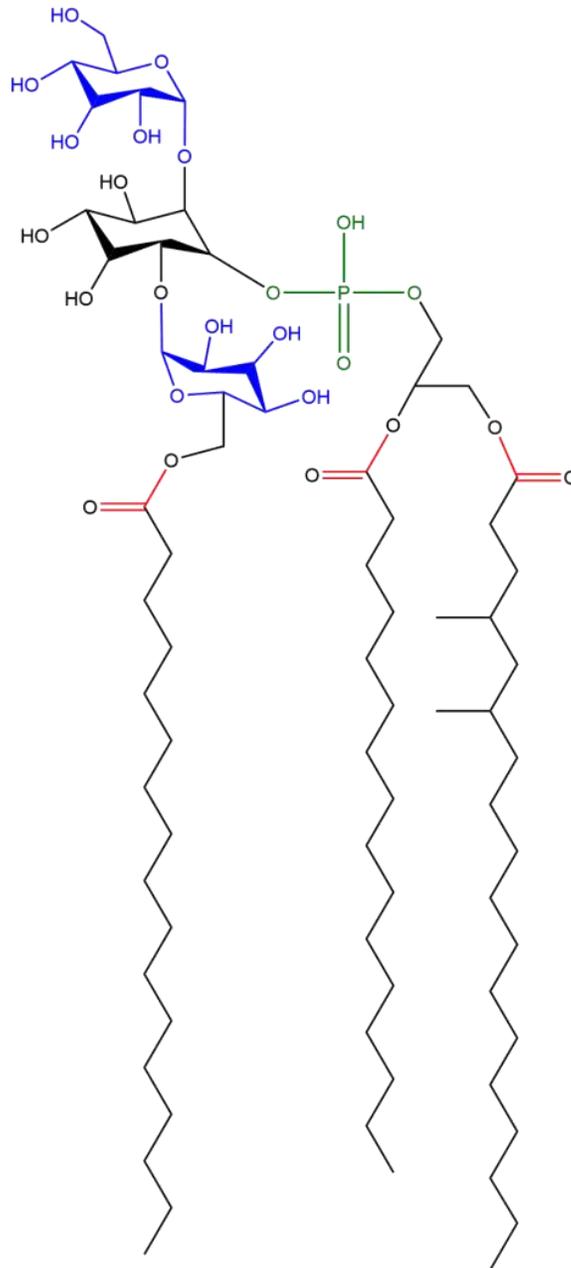


Figura 10. Acil-trealosas de *M. tuberculosis*. A) Estructura química del TAT (2,3,4-tri-O-acil-trealosa). B) Estructura química del DAT (2,3-di-O-aciltrealosa). Adaptado de Minnikin (1991).



Fosfatidilinositol dimanósidos

Fórmula química: $C_{74}H_{139}O_{24}P$

Figura 11. Estructura química del fosfatidil-inositol-manósido (PIMs). Los grupos inositol se muestran en negro, mientras que los grupos fosfato de color verde. Además, en azul, un par de manosas, y en rojo los ácidos carboxílicos de las cadenas grasas. Adaptado de Driessen (2009).

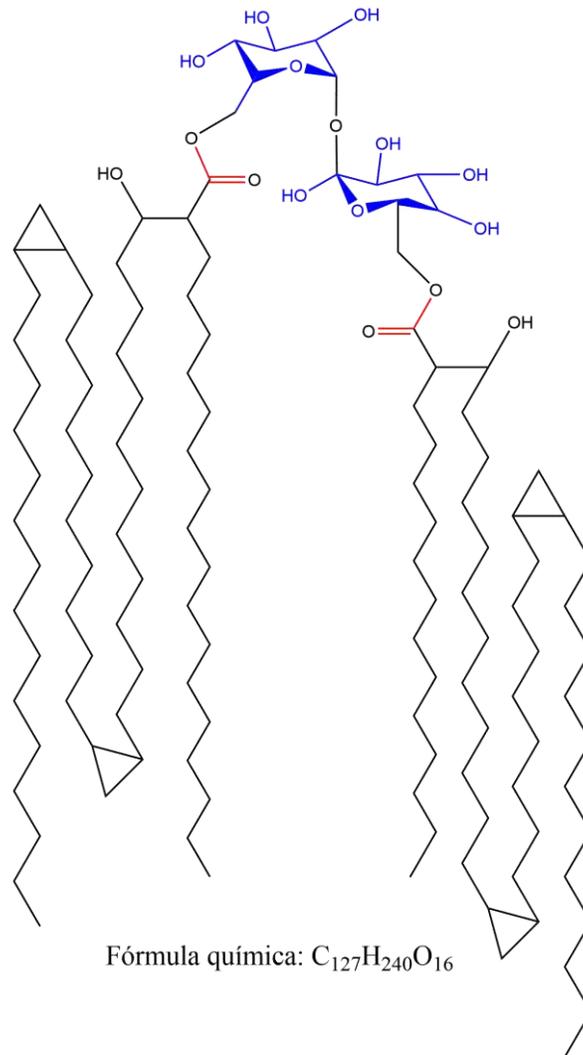


Figura 12. Estructura del 6,6'-dimicolato de trealosa. Se muestran de color azul dos glucosas unidas por un enlace C-O-C, definido como una trealosa. Modelo adaptado de reportes de Indrigo y col. (2003) y Velasco (2008).

1.4. *Mycobacterium fortuitum*

M. fortuitum es una micobacteria no tuberculosa de crecimiento rápido, cuyo reservorio natural son los peces. Fue identificada por primera vez a principios del siglo XX como la causa de una infección cutánea en seres humanos (Brown, 1985). Esta bacteria es homóloga a nivel genético y estructural con *M. tuberculosis* (Asensio y col., 2014). Ambas bacterias producen proteínas y glicolípidos similares,

presentando reactividad cruzada hacia anticuerpos de individuos con TB (Escamilla y col., 1996).

Además de los peces, el ambiente natural de *M. fortuitum* son los suelos y el agua, por lo que su infección en seres humanos es poco frecuente (Smith, 2001). Estas características han despertado un gran interés en el uso de esta micobacteria para el diagnóstico de TB, debido a sus prometedoras aproximaciones a nivel molecular con *M. tuberculosis* (López Marín y col., 1994; Datta y col., 2018).

1.5. Inmunodiagnóstico de tuberculosis

En los últimos 15 años, la revolución en la secuenciación del genoma y los avances en la microbiología y la inmunología nos ha brindado información valiosa para el tratamiento y diagnóstico de muchas enfermedades. Gracias a la investigación de moléculas patogénicas de *M. tuberculosis* y el estudio de la respuesta inmunológica humana ante éstas, hoy podemos comprender mejor su ciclo infeccioso.

Por ejemplo, en 2014, Asensio y colaboradores realizaron un estudio comparativo a nivel genético entre distintas cepas de micobacterias para evaluar el polimorfismo de un solo nucleótido del gen *phoPR*. Los resultados indican que la expresión de este gen en distintas cepas de micobacterias resulta crucial para la biosíntesis de lípidos fundamentales en el desarrollo de la bacteria y que, en su ausencia, las bacterias pierden patogenicidad (Asensio y col., 2014).

La investigación para el diagnóstico de TB de manera oportuna, así como la mayoría de las pruebas diagnósticas comerciales actuales se centran en la determinación de proteínas presentes en la pared celular de *M. tuberculosis*, las cuales han mostrado poca especificidad para identificar este microorganismo (Singh, 2011).

Distintas especies micobacterianas comparten lípidos antigénicos presentes en su pared celular (Ridell y col., 1992). En la última década, diferentes antígenos lipídicos de *M. tuberculosis* y otras micobacterias han sido estudiados intensamente, ya que

su implementación como marcadores para el diagnóstico de TB y tener ventajas valiosas (Steingart y col., 2009). En el Cuadro 3 se mencionan algunas de las moléculas más estudiadas en el diagnóstico de TB con su especificidad y sensibilidad específica, obtenidas de diferentes estudios.

Cuadro 3. Sensibilidades y especificidades generales para los antígenos evaluados en el serodiagnóstico de tuberculosis pulmonar con inmunoensayos detectando los anticuerpos IgG y/o IgA.

Tipo de componente	Nombre del antígeno	Número de estudios con estatus de esputo positivo	Especificidad	Sensibilidad
Recombinante	38 kDa	12	94 (86-98)	47 (39-55)
	Malato	8	98 (95-100)	73 (58-85)
	MPT51	9	94 (77-99)	59 (38-76)
	CFP-10	6	97 (84-100)	58 (30-82)
	TbF6 ^b	4	93 (69-99)	70 (37-90)
Proteínas nativas	38 kDa	13	97 (94-99)	49 (37-61)
	Ag 85B	7	95 (78-99)	53 (20-83)
Lípidos	DAT	7	81 (50-96)	63 (45-78)
	TAT	4	44 (24-67)	81 (21-99)

Adaptado de Steingart y col. (2009).

La detección con anticuerpos de los antígenos DAT y TAT de *M. tuberculosis* ofrece resultados más rápido que las técnicas de microscopía, además de ser tecnológicamente simples y su realización requiere de entrenamiento mínimo. Estas ventajas sugieren que las pruebas para serodiagnóstico de TB utilizando lípidos, pueden ser implementadas en todas las instituciones con servicios de salud y también en países en vías de desarrollo (Steingart y col., 2009).

1.6. Antecedentes

M. fortuitum podría ser una fuente indirecta y rápida de antígenos para el serodiagnóstico de TB (Escamilla y col., 1996). Además, resultados no publicados de nuestro grupo de trabajo han mostrado que *M. fortuitum* contiene una variedad de glicolípidos antigénicos reconocidos por sueros de pacientes humanos infectados con TB. Sin embargo, una fracción enriquecida en esos compuestos carece de especificidad, es decir, la mezcla del extracto total de lípidos es incapaz de discriminar entre los sueros de individuos sanos y enfermos en población mexicana.

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que mezclas de glicolípidos reportados como antígenos para el diagnóstico de TB, no son reconocidos específicamente por los anticuerpos en sueros de individuos con TB. Atribuimos esta situación a varias posibilidades: (a) Las mezclas de antígenos podrían contener moléculas inespecíficas para el serodiagnóstico; (b) si bien algunos glicolípidos han sido reportados como antígenos valiosos para diagnóstico de TB, la mayoría de los reportes han involucrado muestras clínicas de individuos en diferente grado de la enfermedad y con distinto origen. Además, (c) la población mexicana se encuentra expuesta constantemente a MNT que pueden generar reacciones cruzadas con algunos de los antígenos analizados.

Sin embargo, en contraste con múltiples reportes para la obtención de antígenos proteicos, la purificación y caracterización de antígenos no proteicos, específicamente los lipídicos, ha sido poco descrita.

2. HIPÓTESIS

Mediante una estrategia de fraccionamientos cromatográficos sobre fase normal, será posible purificar los glicolípidos reportados como antígenos prometedores para diagnóstico de tuberculosis, partiendo de extractos de lípidos totales.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Poner a punto un método para la purificación de antígenos no proteicos con potencial para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis, a partir de la especie de crecimiento rápido *Mycobacterium fortuitum*.

3.2. Específicos

1. Obtener un extracto de lípidos totales de *Mycobacterium fortuitum* a través de lavados de Folch.
2. Purificar lípidos de trealosa y glicofosfolípidos a partir de un extracto de lípidos totales, a través de técnicas cromatográficas.
3. Corroborar la identidad química de los lípidos purificados mediante reactividad química y técnicas espectroscópicas.
4. Corroborar el carácter antigénico de los lípidos purificados, utilizando sueros de conejos hiperinmunizados con fracciones lipídicas crudas.

4. METODOLOGÍA

Los reactivos, materiales y equipos utilizados para este trabajo fueron proporcionados por el Laboratorio de Nanobio-óptica del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Campus Juriquilla. Los instrumentos empleados para realizar los análisis por FT-IR fueron facilitados por el Laboratorio de Espectroscopía y el Laboratorio de Radiometría del CFATA.

4.1. Cultivo de *M. fortuitum*

La cepa ATCC 6841 de *M. fortuitum* se sembró en medio Sauton líquido a 37 °C durante 15 días sin agitación.

El medio Sauton fue preparado con fosfato de potasio monobásico (0.5 g/L), L-asparagina (4 g/L), sulfato de magnesio (0.5 g/L), citrato de amonio y hierro (0.05 g/L) y glicerol (60 g/L), ajustando el pH a un valor entre 7.2 y 7.3 unidades.

4.2. Extracción de lípidos

Una vez crecidas, las células procariotas se inactivaron a 121 °C por 30 min en la autoclave. Los cuerpos celulares fueron filtrados utilizando un sistema de un embudo de vidrio, un matraz kitasato y membranas con filtro de 0.44 µm, conectado a una bomba de vacío.

Los lípidos de las micobacterias inactivadas se extrajeron incubando los cuerpos celulares en metanol/cloroformo (2:1, vol/vol) durante 2 h a 50 °C. Los cuerpos celulares fueron filtrados recuperando el extracto; después, los cuerpos celulares se sometieron a una incubación en metanol/cloroformo (1:2, vol/vol) durante 2 h a 50 °C, obteniendo un segundo extracto, y por último en una solución metanol/cloroformo (1:1, vol/vol) a las mismas condiciones de tiempo y temperatura.

Los 3 extractos orgánicos recuperados se evaporaron utilizando el rota-evaporador Büchi® R-124, hasta obtener los lípidos secos en la superficie interior de matraces de bola (extracción de Folch) (Folch, 1956). Los extractos se mezclaron para obtener un único extracto de lípidos.

4.2.1. Lavados de Folch

Los extractos de lípidos obtenidos (cloroformo/metanol 1:2, 2:1 y 1:1 vol/vol) se mezclaron antes de realizar los lavados de Folch. El extracto total se sometió a un lavado en una relación cloroformo/metanol/agua 4:2:1 vol/vol/vol, separando el sistema en dos fases: la primera, de naturaleza antipática (clorofórmica), y una segunda fase más polar (acuosa). Los compuestos más polares se concentran en la fracción acuosa y las moléculas lipídicas, con menos polaridad, en la fracción clorofórmica (Figura 13) (Folch, 1956; Escamilla y col., 1996).

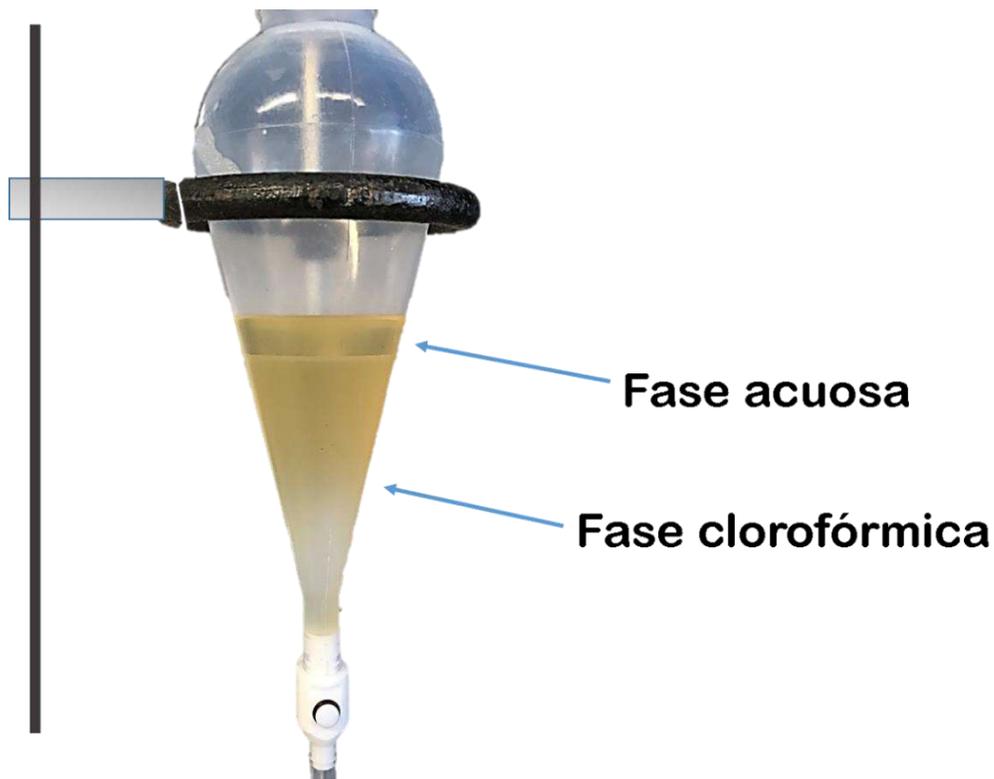


Figura 13. Esquema de un lavado de Folch. La imagen muestra el lavado del extracto de lípidos totales para eliminar contaminantes polares que acompañen al extracto crudo (Folch, 1956). Mezcla miscible de cloroformo/metanol/agua.

La fase acuosa fue desechada, recuperando y evaporando la fase clorofórmica. La mezcla de grasas secas obtenidas se definió como el extracto total de lípidos de *M. fortuitum*.

4.3. Purificación e identificación de glicolípidos

El extracto total de lípidos de *M. fortuitum* se fraccionó en una columna cromatográfica con Florisil. Con el fin de recuperar de menor a mayor polaridad las diferentes moléculas en el extracto, incrementamos gradualmente la polaridad del eluyente. Primeramente, en el caso de los glicolípidos, se utilizaron 9 mezclas metanol-cloroformo, aumentando la concentración de metanol en cloroformo de la solución eluyente (100:0, 97.5:2.5, 95:5, 92.5:7.5, 90:10, 87.5:12.5, 85:15, 82.5:17.5, 80:20 y 76:24 % vol/vol). Para eluir los fosfolípidos, se utilizaron 3 mezclas de metanol-cloroformo-agua (65:25:4, 60:35:8 y 50:50:10, vol/vol/vol).

Cada una de las fracciones recuperadas fue evaporada a 60 °C bajo flujo de nitrógeno (N₂) y analizada por cromatografía en capa fina en placas de vidrio con gel de sílice (TLC). Las placas fueron reveladas con antrona al 2 % en H₂SO₄ y calentadas a 110 °C durante 4 min (o hasta observar una coloración azul, característica de la reacción).

La antrona es una cetona aromática tricíclica comúnmente utilizada para la determinación de azúcares y carbohidratos. Al aplicar calor en un medio ácido (H₂SO₄), los azúcares presentes en los glicolípidos forman compuestos llamados derivados furfúricos, los cuales reaccionan con la antrona y producen cromógenos de color azul-violeta.

De forma paralela se realizó una purificación en 3 fracciones a partir de una elución con solventes puros, cloroformo, acetona y metanol, empleando columnas de cromatografía comerciales Sep-pak 6 cc, con 500 mg de sílice (Figura 14).

De esta manera se obtuvo un extracto de glicolípidos (acetona) y una de fosfolípidos (metanol). La actividad biológica específica de las moléculas lipídicas obtenidas fue analizada posteriormente en sueros de conejos inmunizados contra estos antígenos.

4.3.1. Purificación de DAT y TAT

Las fracciones enriquecidas con DAT y TAT (90:10 y 80:20, respectivamente), se filtraron a través de columnas cromatográficas Sep-pak de 6 cc, con 500 mg de sílice (tamaño de poro de 125 Å), para remover contaminantes residuales de los glicolípidos. Se realizó un fraccionamiento de los productos, aumentando gradualmente la polaridad de las mezclas de solventes cloroformo/metanol:

- Eluyentes metanol-cloroformo para TAT: 100:0, 97:3, 92:8, 90:10, 88:12, 85:15.
- Eluyentes metanol-cloroformo para DAT: 100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 76:24.



Figura 14. Purificación de glicolípidos mediante cromatografía en columna Sep-pak. Las fracciones purificadas fueron recuperadas en viales de centelleo y evaporadas a 60 °C bajo flujo de N₂.

4.3.2. Purificación de DMT

Para purificar el factor cuerda se pesó 1 mg de una fracción enriquecida con DMT en un tubo de vidrio calcinado y se realizó una precipitación con acetona en frío.

La fracción utilizada fue la recuperada al eluir la columna de florisil con cloroformo-metanol (85:15 vol/vol). Para la precipitación, el tubo con acetona fue incubando a 4 °C por 2 h y, centrifugando 10 minutos a 3000 rpm. El precipitado y el sobrenadante resultantes fueron analizados por TLC.

4.4. Purificación e identificación de fosfolípidos

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas de mayor polaridad que los glicolípidos debido al grupo fosfato presente en su estructura; para obtener los PIMs del extracto total, posteriormente a la elución de los glicolípidos, se utilizaron 3 distintas relaciones de solventes más polares, utilizando cloroformo, metanol y agua (65:25:4, 60:35:8 y 50:50:10, (vol/vol/vol).

A continuación, utilizando columnas Sep-Pak de 500 mg y 3 solventes destilados puros como eluyentes (cloroformo, metanol y acetona, en ese orden), se removieron los compuestos contaminantes de las fracciones de PIMs. Para el análisis de los lípidos purificados en placas cromatográficas se utilizó un solvente de corrida a una relación de 60:35:8 cloroformo-metanol-agua (vol/vol/vol), y estas fueron reveladas con 3 reactivos distintos: cada indicador identifica específicamente diferentes grupos funcionales: ninhidrina para aminas, azul de molibdeno para grupos fosfatos y antrona para azúcares.

4.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La estructura química de los lípidos purificados se corroboró realizando un análisis FT-IR. Se utilizó un equipo IR READY TO GO Spretum Two de Perkin Elmer®, acoplado a un sistema de reflectancia total atenuada con un cristal de seleniuro de cadmio y diamante (ATR Diamond/CdSe PIKE TECHNOLOGIES), realizando 12 barridos entre 500 y 4000 cm^{-1} para cada análisis. Resolución del equipo 0.5 cm^{-1} .

Para analizar las muestras en el detector de cristal del equipo se pesó una cantidad mínima (<1 mg) de cada uno de los antígenos lipídicos secos (DAT, TAT, DMT y PIMs) por separado en papel aluminio.

4.6. Sueros anti-glicolípidos

Los sueros utilizados en este estudio se obtuvieron previamente, a partir de conejos hiperinmunizados con extractos lipídicos enriquecidos en aciltrealosas o en fosfoglicolípidos. Para ello, se utilizaron conejos Nueva Zelanda de 3 meses de edad, los cuales fueron inmunizados de acuerdo con protocolos anteriormente descritos (López Marín y col., 1994).

Los conejos fueron inmunizados con la fracción metanólica (FM) o la fracción acetónica (FA) del extracto total de *M. fortuitum*, previamente purificadas por cromatografía en columna Sep-pak. Se utilizó como control el suero de un conejo que no fue inmunizado contra ninguno de los antígenos lipídicos.

La primera inmunización consistió en 5 mg de lípidos en adyuvante completo de Freund y un refuerzo realizado 15 días después con 3 mg de lípido con adyuvante incompleto de Freund. Las muestras de suero fueron obtenidas por centrifugación de sangre, recuperada por venopunción auricular. Los conejos fueron sangrados al día 0 (t0), 15 (t1) y 32 (t2) después de la inmunización para monitorear la producción de anticuerpos anti-lípidos a través del tiempo, mediante reacciones serológicas.

Los protocolos de inmunización fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla.

4.7. Inmunoensayos

Se realizaron ELISAs en placas de microtitulación de poliestireno (Nunc inmunoplasacas de 96 pozos; Polysorp, Dinamarca). Cada antígeno purificado fue disuelto en etanol-hexano (1:1 vol/vol a una concentración de 0.01 mg ml⁻¹). En cada pozo se depositaron 100 µl y se incubó la placa a 37°C para evaporar el solvente. Subsecuentemente, los pozos fueron saturados con 200 µl de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 3% (peso/vol) en amortiguador salino de fosfatos (PBS) a 37°C por 2 h, y lavados 5 veces con PBS. En seguida, se agregaron a la placa 100 µl de cada suero diluido (1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 y 1/3600) y se incubó a 37°C por 2 h. Después de lavar 5 veces con PBS, se agregaron 100 µl del anticuerpo secundario diluido 1:20, 000 en BSA al 0.3%. En el caso de DAT, TAT y los PIMS se utilizó anti-IgG de conejo producido en cabra, conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma), y en el caso de DMT se agregó anti-IgG de conejo producido en cabra, conjugado a peroxidasa de rábano negro (HRP, Abcam). Seguido de una incubación de 2 h a 37 °C, se realizaron 5 lavados con una solución de BSA al 0.3% en PBS y se agregaron 100 µl del sustrato específico de cada enzima: *p*-nitrofenilfosfato (Sigma) 0.1% en amortiguador de dietanolamina (pH 9.8) para la fosfatasa alcalina y ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) para HRP (Abcam). Al paso de 5 min de incubación a 37 °C se leyó la absorbancia a 405 nm con el lector de microplaca iMark™ (Bio-Rad) y el escáner lector de microplacas Varioskan® Flash (Thermo Scientific).

Los datos fueron obtenidos por triplicado y expresados como un promedio de su densidad óptica a 405 nm.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Obtención de antígenos lipídicos

Los cuerpos celulares inactivados de la cepa ATCC 6841 de *M. fortuitum* fueron tratados para obtener el extracto total de lípidos mediante incubación en solventes orgánicos (cloroformo/metanol 1:2, 2:1 y 1:1). Se realizaron lavados de Folch para eliminar impurezas hidrosolubles y sales presentes en el extracto.

Se obtuvieron fracciones diferentes aumentando la polaridad del eluyente. En la Figura 15 se muestra un esquema de la separación de los compuestos presentes en la mezcla del extracto total de lípidos de *M. fortuitum*, mediante cromatografía en columna.

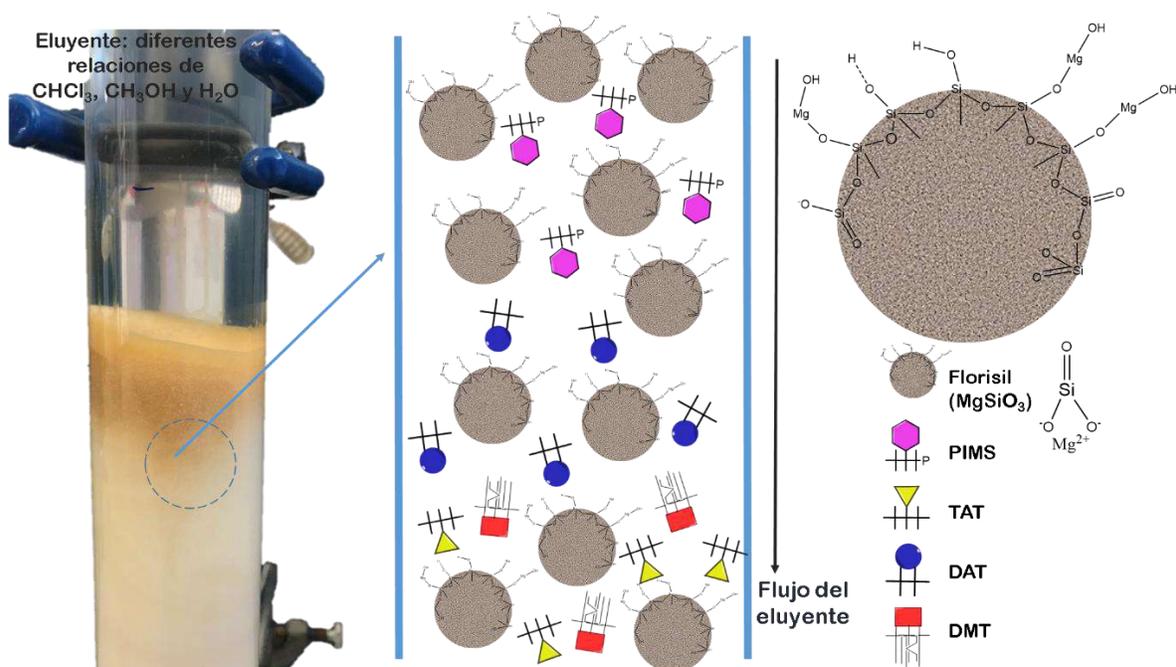


Figura 15. Esquema del fraccionamiento del extracto total de lípidos de *M. fortuitum*. Se puede observar el arrastre de componentes lipídicos por el gradiente de color en la columna cromatográfica con Florisil. El orden de elución de las moléculas analizadas en este estudio (DAT, TAT, DMT y PIMs) fue asignado de acuerdo a su polaridad.

El extracto crudo de lípidos totales fue analizado por TLC utilizando dos placas de gel de sílice de 0.25 mm de espesor de 20x20 cm; en cada placa se utilizaron solventes de corrida con diferente polaridad (Figura 16 A y B). El eluyente cloroformo/metnaol 80:20 (vol/vol) (Figura 16 A) separó dos marcas azules; en contraste, un eluyente de mayor polaridad, cloroformo/etnaol/agua 60:35:8 (vol/vol/vol), generó el corrimiento de 8 marcas en distintas posiciones, correspondientes a moléculas del grupo de los PIMs con diferente peso molecular en su cadena lipídica. El revelado de ambas placas con antrona evidenció diferentes perfiles cromatográficos de lípidos con azúcares, algunos de los cuales han sido reportados con antigenicidad (López-Marín, 2003).



Figura 16. TLC analítica del extracto total de lípidos de *M. fortuitum*.
A) Eluyente cloroformo/metanol 80:20 (vol/vol).
B) Eluyente cloroformo/metanol/agua 60:35:8 (vol/vol/vol).
Identificación de diferentes perfiles cromatográficos con dos solventes de corrida de distinta polaridad. Detección: antrona en ácido sulfúrico.

5.1.1. Purificación e identificación de antígenos

Una vez identificados diferentes compuestos en el extracto total, las fracciones recuperadas por cromatografía en columna fueron analizadas por TLC. Diferentes lípidos glicosilados fueron puestos en evidencia mediante el corrimiento con un eluyente cloroformo/metanol 80:20 (vol/vol) y la detección con antrona en ácido sulfúrico. Las fracciones fueron analizadas en placas de 10x10 cm (Figura 17) y de 20x20 cm (Figura 18).

Se observó un perfil cromatográfico similar en el análisis por TLC de estas fracciones de diferentes lotes de cultivo a través del tiempo. El color azul-verde es característico de glicolípidos y gris-violeta para acil-trealosas son evidenciadas en la Figura 17 (lote 1) y en la Figura 18 (lote 2).

Las fracciones de los carriles 1 y 2, en las Figuras 17 y 18, mostraron marcas rojas-amarillas, indicando la presencia de compuestos de naturaleza no glicosilada en la parte superior de ambas placas (Etienne, 2005). Estas moléculas de menor polaridad carecen de especificidad para la identificación de micobacterias.

En los carriles 3, 4 y 5, las fracciones analizadas evidenciaron glicolípidos de interés debido a su movilidad cromatográfica: TAT y DMT se observan de color azul-verde al nivel medio superior de las placas de sílice y DAT, de color azul en la mitad inferior (Figuras 17 y 18).

Posteriormente, se realizó una precipitación con metanol en frío de la fracción número 4, enriquecida en DAT. El análisis por TLC del precipitado resultante confirmó la purificación de moléculas que, con antrona, generan un color gris-violeta (Rf MMT= 0.34; Rf DAT = 0.47; Rf DMT = 0.82)

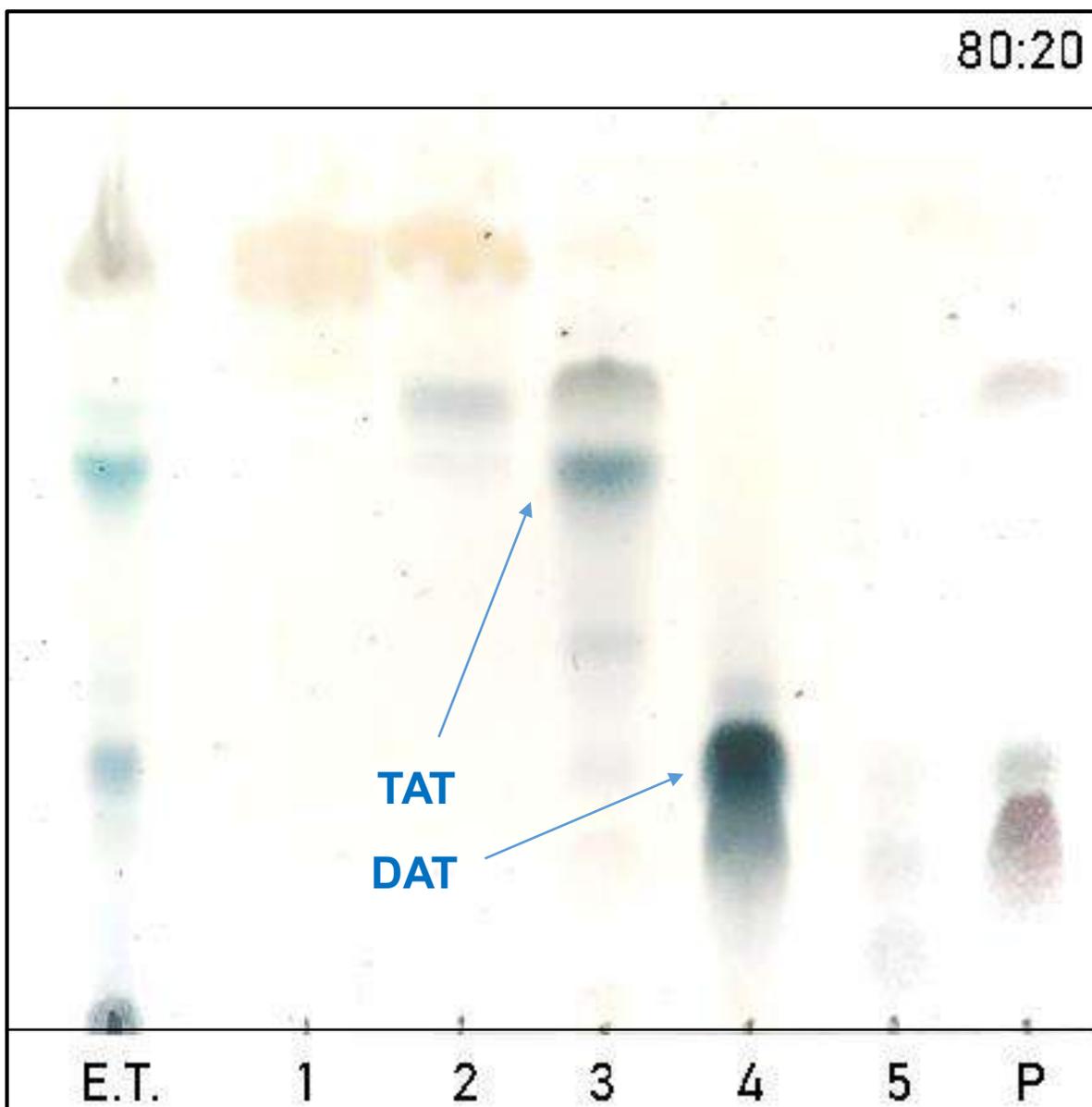


Figura 17. TLC analítica de las fracciones del extracto total lote 1. El orden de los carriles indica el aumento a relaciones de cloroformo/metanol de 1) 100:0, 2) 97:3, 3) 94:6, 4) 90:10, 5) 86:14 relaciones cloroformo/metanol (vol/vol).

*E.T. – extracto total; *P – precipitado fracción 4) 90:10.

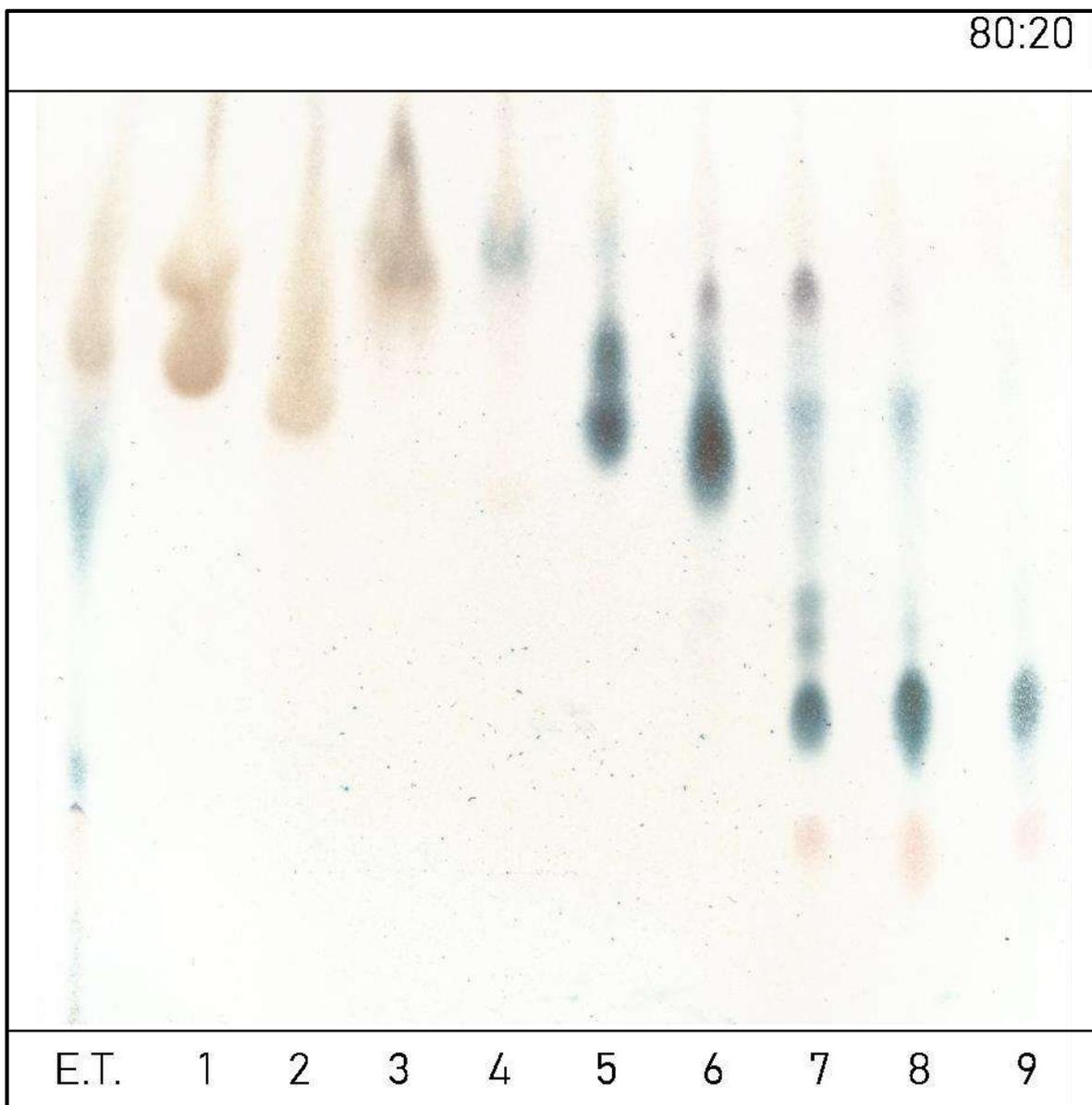


Figura 18. TLC analítica de las fracciones del extracto total lote 2. Orden de los carriles: relaciones cloroformo/metanol 1) 100:0, 2) 97.5:2.5, 3) 95:5, 4) 92.5:7.5, 5) 90:10, 6) 87.5:12.5, 7) 85:15, 8) 80:20 y 9) 76:24 (vol/vol).

A continuación, se realizó la purificación de los glicolípidos antigénicos de interés en las fracciones más enriquecidas en estos compuestos, utilizando columnas Sep-pak. Las cromatografías en columna Sep-pak nos permiten excluir moléculas no deseadas contaminantes de los lípidos, con el corrimiento de los mismos a través de poros de 125 Å de diámetro. Las moléculas retenidas en la columna fueron eluidas con un solvente afín su polaridad.

5.1.2. Purificación de DAT

La fracción recuperada con el eluyente cloroformo/metanol 80:20 (vol/vol) mostró un mayor enriquecimiento del DAT. La Figura 19 muestra el análisis por TLC de estas fracciones purificadas y su fracción inicial; se puede observar en el carril número 4 la obtención del antígeno DAT puro.



Figura 19. TLC analítica de purificación por columna Sep-pak de DAT. Orden de los carriles: 1) Fracción 80:20 del E.T. 2) 100:0 3) 95:5 4) 90:10 5) 88:12 y 6) 85:15 cloroformo/metanol (vol/vol). El DAT fue identificado por su $R_f = 0.47$.

5.1.3. Purificación de TAT

La fracción recuperada con el eluyente cloroformo/metanol 90:10 (vol/vol) del extracto total del lote 1 mostró un mayor enriquecimiento del TAT y fue purificada a través de una columna Sep-pak. En la Figura 20 se observa el análisis por TLC de la fracción inicial contra las fracciones purificadas. El carril 4 evidenció el corrimiento del antígeno TAT sin otros compuestos contaminantes.

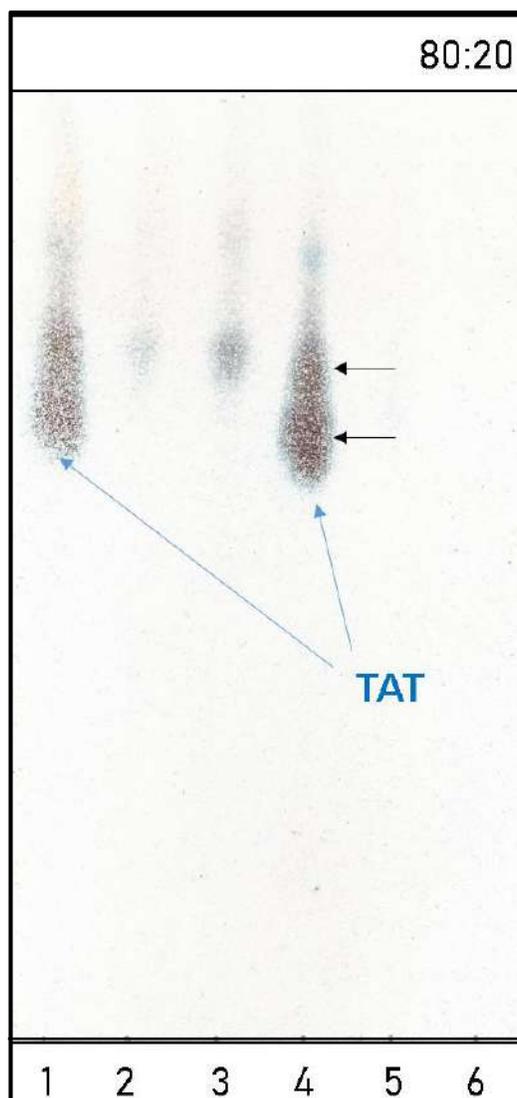


Figura 20. TLC analítica de la purificación por columna Sep-pak de TAT. Orden de los carriles: Relaciones cloroformo/metanol 1) Fracción 90:10 del extracto total. 2) 100:0, 3) 97:3, 4) 92:8, 5) 90:10, 6) 88:12 (vol/vol). $R_f = 0.64$. Las flechas en negro podrían indicar la separación del 2,3,4-tri-*O*-acil-trealosa y el 2,3,6-tri-*O*-acil-trealosa.

5.1.4. Purificación de DMT

La fracción cloroformo/metanol 85:15 (vol/vol), enriquecida en DMT, se purificó mediante una precipitación con acetona en frío. En acetona fría los glicolípidos son insolubles, permitiendo una mayor recuperación de producto. El análisis por TLC del precipitado (Figura 21, carril 4) de esta fracción detectó una marca de color azul-gris, con valor $R_f = 0.82$, característico del dimicolato de trealosa en micobacterias (López Marín, 2003). El resto de compuestos que se observan en la fracción inicial permanecieron en el sobrenadante.

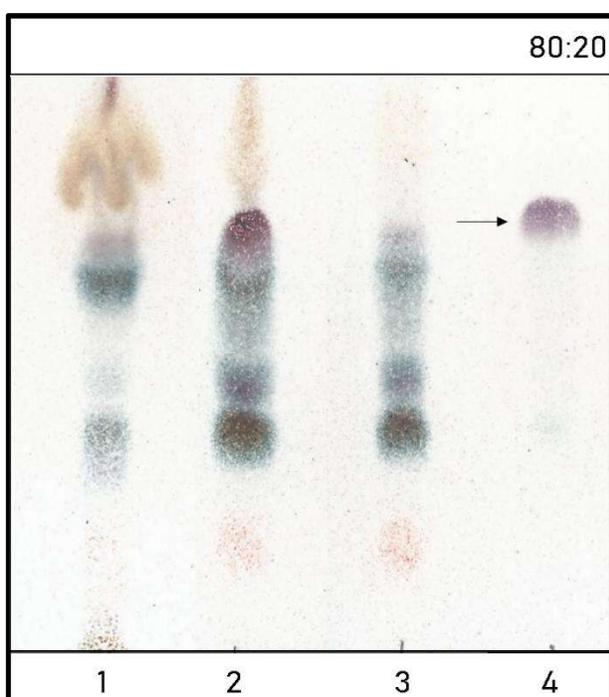


Figura 21. TLC analítica de la purificación por precipitación con acetona en frío de DMT. Orden de los carriles: 1) E.T., 2) Fracción 85:15 sin purificar, 3) Sobrenadante, 4) Precipitado. $R_f = 0.82$. La flecha en negro indica la separación del glicolípidos DMT de otras moléculas presentes en la fracción inicial.

5.1.5. Purificación de PIMs

La fracción obtenida con el eluyente cloroformo/metanol/agua 60:35:8 (vol/vol/vol) del extracto total fue purificada mediante cromatografía en columna Sep-pak. El análisis por TLC de las fracciones recuperadas con solventes destilados

(cloroformo, metanol y acetona) fue revelado con azul de molibdeno, antrona y ninhidrina. La Figura 22 muestra el corrimiento de las fracciones recuperadas y la fracción inicial de los PIMs. Las marcas azules en el revelado con antrona corresponden a la presencia de glicolípidos; las marcas del revelado con azul de molibdeno indican la presencia de grupos fosfato y la ninhidrina compuestos aminados. La información concuerda con la estructura propuesta en la Figura 11.

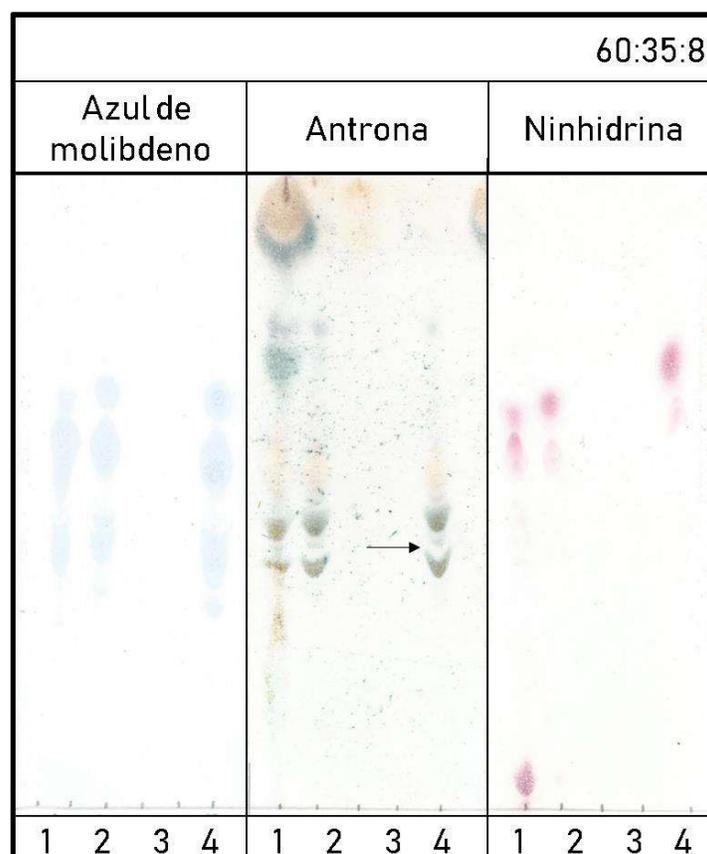


Figura 22. TLC analítica de purificación por columna Sep-pak de PIMs por 3 revelados: azul de molibdeno identificando grupos fosfato; antrona la presencia de glicolípidos; y ninhidrina indicando los grupos aminados. Fracción inicial cloroformo/metanol/agua 60:35:8 (vol/vol/vol). Orden de los carriles: 1) E.T., 2) Fracción inicial, 3) eluyente cloroformo, 4) acetona y 5) metanol. Rf en antrona = 0.4. Las marcas señaladas con la flecha en negro indican la presencia de glicolípidos con grupos fosfato presentes en su estructura.

Diferentes moléculas del grupo de los PIMs fueron obtenidas a partir del extracto total, separando con un eluyente más polar cloroformo/metanol/agua 50:50:10 (vol/vol/vol) (Martínez, 1998).

El análisis por TLC de la fracción purificada evidenció glicofosfolípidos de interés (carril #4 de la Figura 23) de manera similar que la Figura 22.

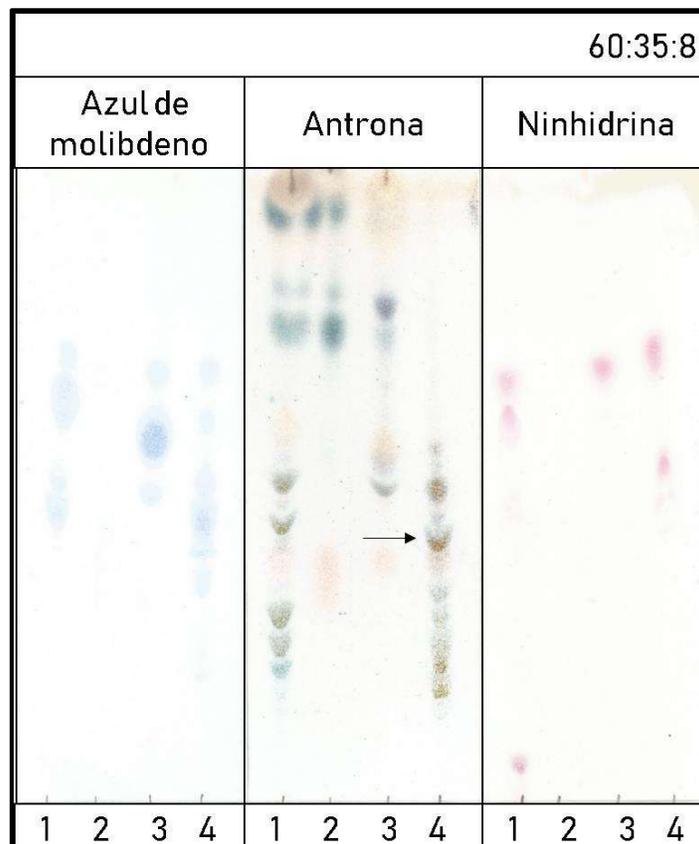


Figura 23. TLC analítica de purificación por columna Sep-pak de los PIMS: Fracción inicial cloroformo/metanol/agua 50:50:10 (vol/vol/vol). Orden de los carriles: 1) E.T., 2) Fracción inicial, 3) eluyente cloroformo, 4) acetona y 5) metanol.

5.2. Análisis por FT-IR

Mediante el análisis FT-IR se obtuvo FT-IR un espectro de las bandas de los grupos funcionales presentes en cada uno de los lípidos purificados. A continuación, se discuten las bandas más representativas de cada espectro y en el Cuadro 6 se explica más detallada y específicamente la absorción en el espectro IR de glicolípidos y fosfolípidos caracterizados para micobacterias.

Cuadro 4. Asignación tentativa de los grupos funcionales asociados a la vibración de bandas en el espectro infrarrojo para lípidos de micobacterias.

Número de onda (cm ⁻¹)	Definición de su asignación espectral	Referencia
3300 – 3400	N-H y O-H: ácidos grasos y proteínas.	(Socrates, 2001) (Tang y col., 2013)
2920	Estiramiento asimétrico de CH ₂ : en su mayoría cadenas lipídicas, con contribución de algunas proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos.	(Socrates, 2001) (Rebuffo-Scheer, 2007) (Tang y col., 2013)
2850	Estiramiento simétrico de CH ₂ : en su mayoría cadenas lipídicas, con contribución de algunas proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos.	(Bulkin, 1972) (Socrates, 2001) (Jastrzębski, 2011) (Tang y col., 2013)
1730	Estiramiento simétrico C=O, usualmente 2 o 3 componentes.	(Socrates, 2001) (Jastrzębski, 2011)
1650	Estiramiento simétrico R-C=O: ésteres de ácidos carboxílicos.	(Gautier, 1992) (Jastrzębski, 2011)
1465	Flexión CH ₂ : lípidos.	(Gautier, 1992)
1238	Estiramiento simétrico-asimétrico PO ₂ : fosfolípidos con contribución de ácidos nucleicos.	(Socrates, 2001) (Tang y col., 2013)
1130 – 1160	Estiramiento simétrico-asimétrico C-C.	(Bulkin, 1971) (Rebuffo-Scheer, 2006)
1084	Estiramiento simétrico PO ₂ : fosfolípidos.	(Socrates, 2001) (Tang y col., 2013)
1110-1090	Componentes ionizados P-O ⁻ en fosfolípidos.	(Abramson, 1965)
1040-1000	Componentes ácidos del grupo fosfato P-OH.	(Abramson, 1965)
900-1200	Rango espectral para oligo/polisacáridos.	(Rebuffo-Scheer, 2007)
700-900	Huella digital de micobacterias.	(Rebuffo-Scheer, 2007)

5.2.1. DAT

Las bandas obtenidas en el análisis por FT-IR de DAT (Figura 24) concuerdan con distintos espectros estudiados para glicolípidos, y lípidos de micobacterias (Gautier, 1992; Tang, 2013). Las dos bandas intensas en 2922 y 2852 corresponden a las vibraciones simétricas y asimétricas de los grupos metilo y metileno. Las señales en 1729 y 1649 indican el estiramiento simétrico del enlace C=O y del enlace C-O-C, (grupo éster), respectivamente (Czamara, 2014). Las señales se relacionan con el espectro para glicolípidos y la huella digital de DAT en *M. fortuitum* (Bulkin, 1972; Gautier, 1992; Rebuffo-Scheer y col., 2007).

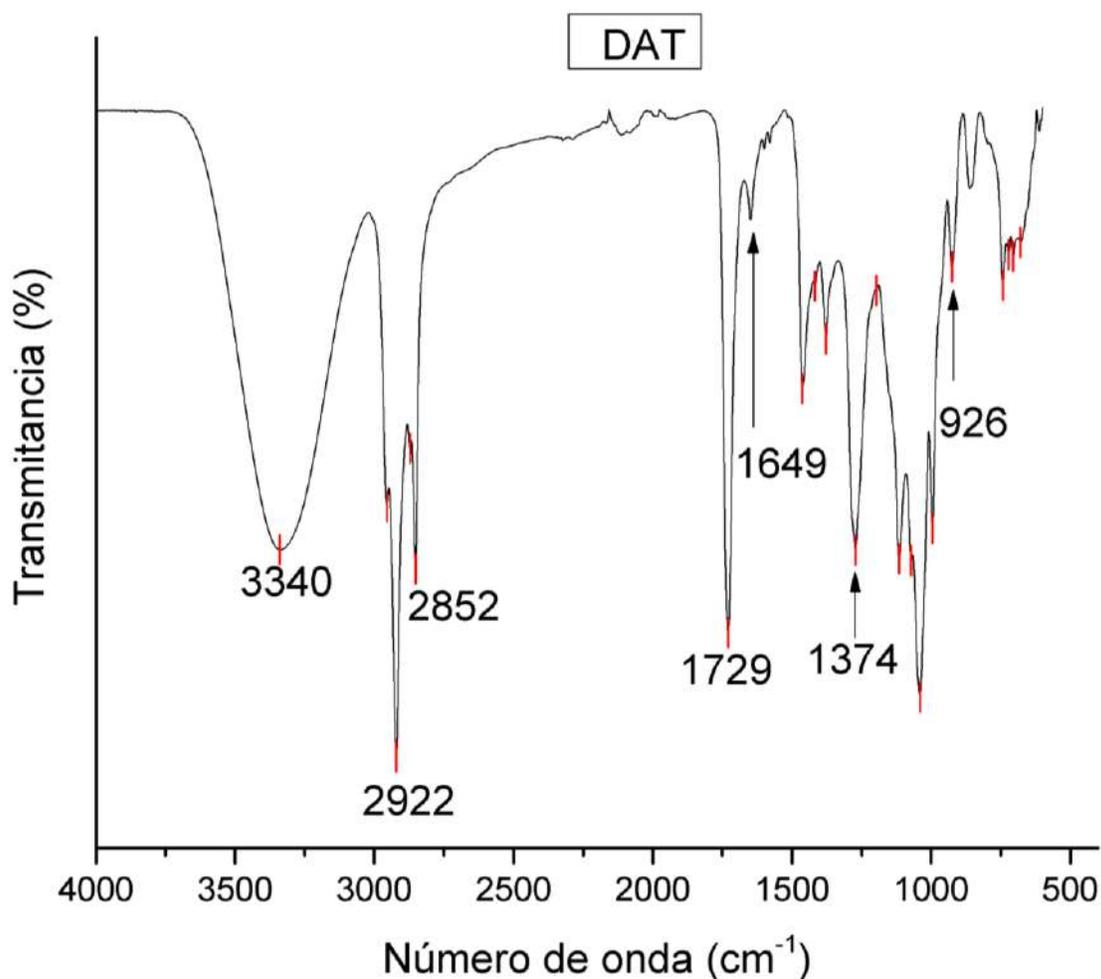


Figura 24. Espectro FT-IR de DAT purificado. Las señales más representativas se indican con líneas rojas. Las flechas negras indican las bandas de absorción características para el DAT en micobacterias.

5.2.2. TAT

El espectro de TAT (Figura 25) muestra una menor intensidad en la señal de 3330, en relación con la señal de 3340 de DAT, correspondientes al estiramiento O-H, lo que podría indicar un menor porcentaje de hidroxilos libres en el disacárido de trealosa. Esto concuerda con la identidad asignada para el producto purificado. Una trealosa con tres acilos grasos que sustituyen los grupos hidroxilos de la trealosa, a diferencia de dos acilos para el DAT. Además, la señal en 1646 es característica para enlaces éster insaturados α, β , correspondiente a la absorción de los glicolípidos en *M. fortuitum* (Gautier, 1992).

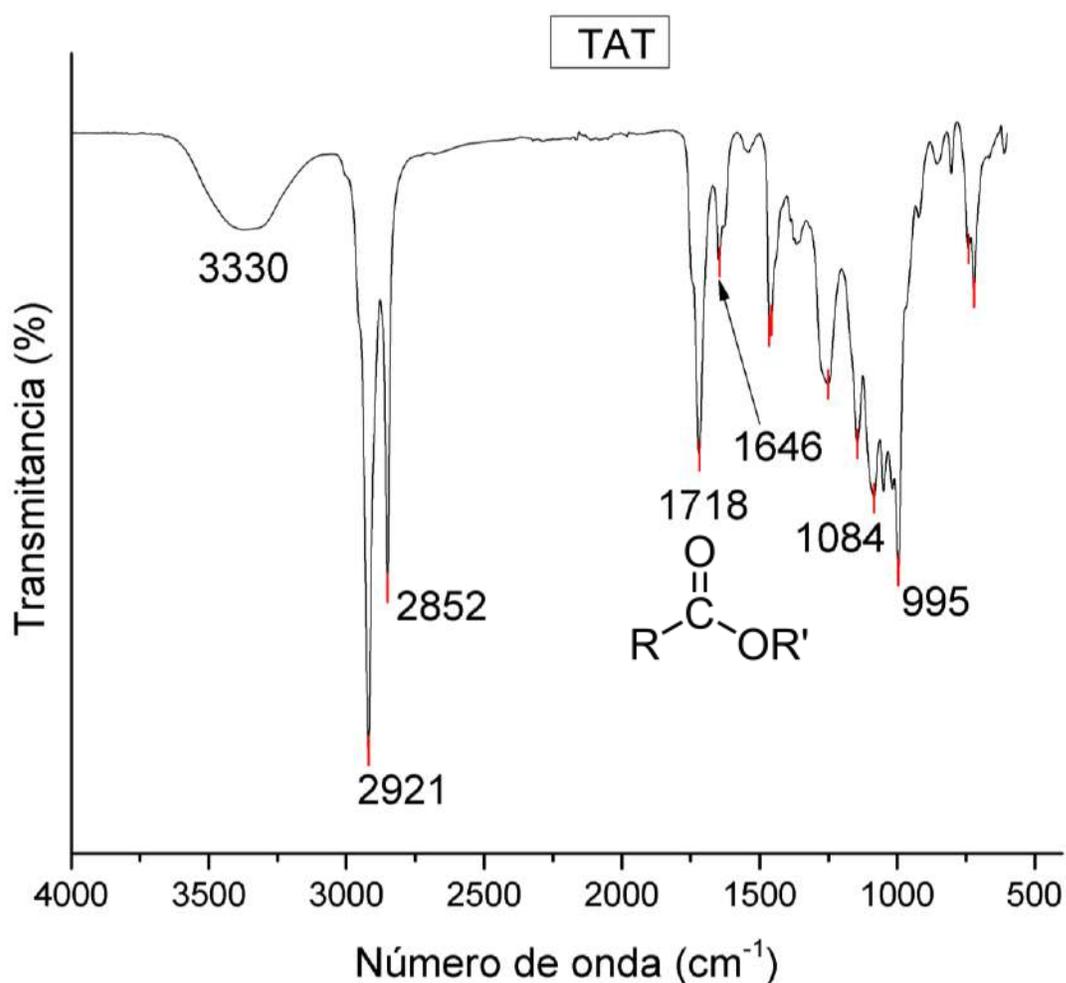


Figura 25. Espectro FT-IR de TAT purificado. Las señales más representativas son indicadas con líneas rojas. Se puede observar la señal del grupo éster en las señales en 1718 y 1646.

5.2.3. DMT

El espectro del antígeno DMT purificado reflejó señales muy intensas para el estiramiento simétrico y asimétrico del CH₂, probablemente debido a la presencia de largas cadenas hidrocarbonadas en su estructura (Figura 26). Además, la señal en 1722 estaría indicando la vibración de algunos componentes C=O; la banda en 1467, característica de la flexión de CH₂, sugieren el arreglo estructural a manera de cordón de los ácidos grasos propuesto para esta molécula (Figura 12).

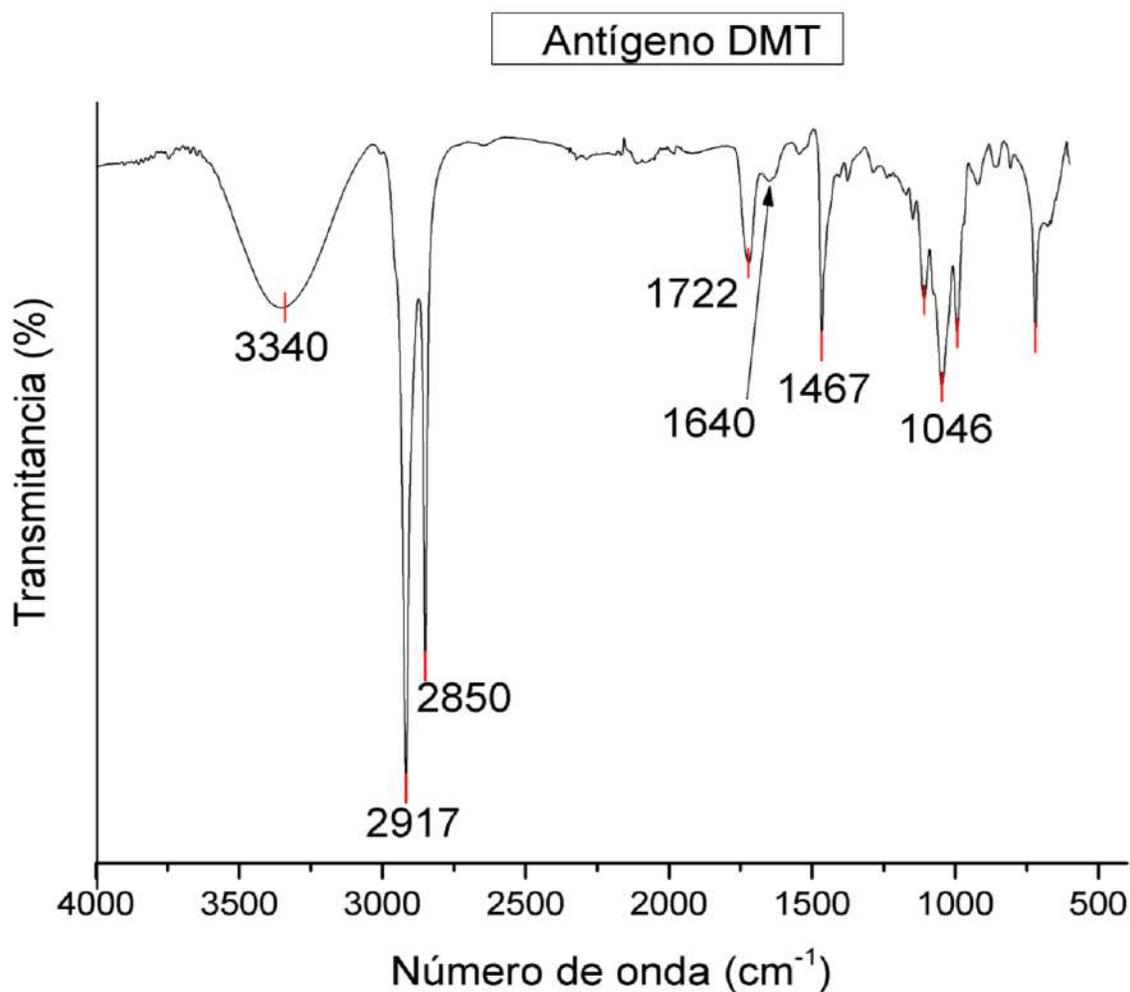


Figura 26. Espectro FT-IR de DMT purificado. Las señales más representativas se indican con marcas rojas. La flecha indica la señal característica para glicolípidos en micobacterias.

5.2.4. PIMs

En el caso de los PIMs, se identificó la presencia del grupo fosfato al corroborar las señales en 1038, 1103 y 1284 con análisis de FT-IR reportados para fosfolípidos en bacterias (Figura 27), correspondientes respectivamente a la vibración de los enlaces H-P, P=O y P-OH bacterias (Abramson, 1965; Bulkin, 1972; Socrates, 2001).

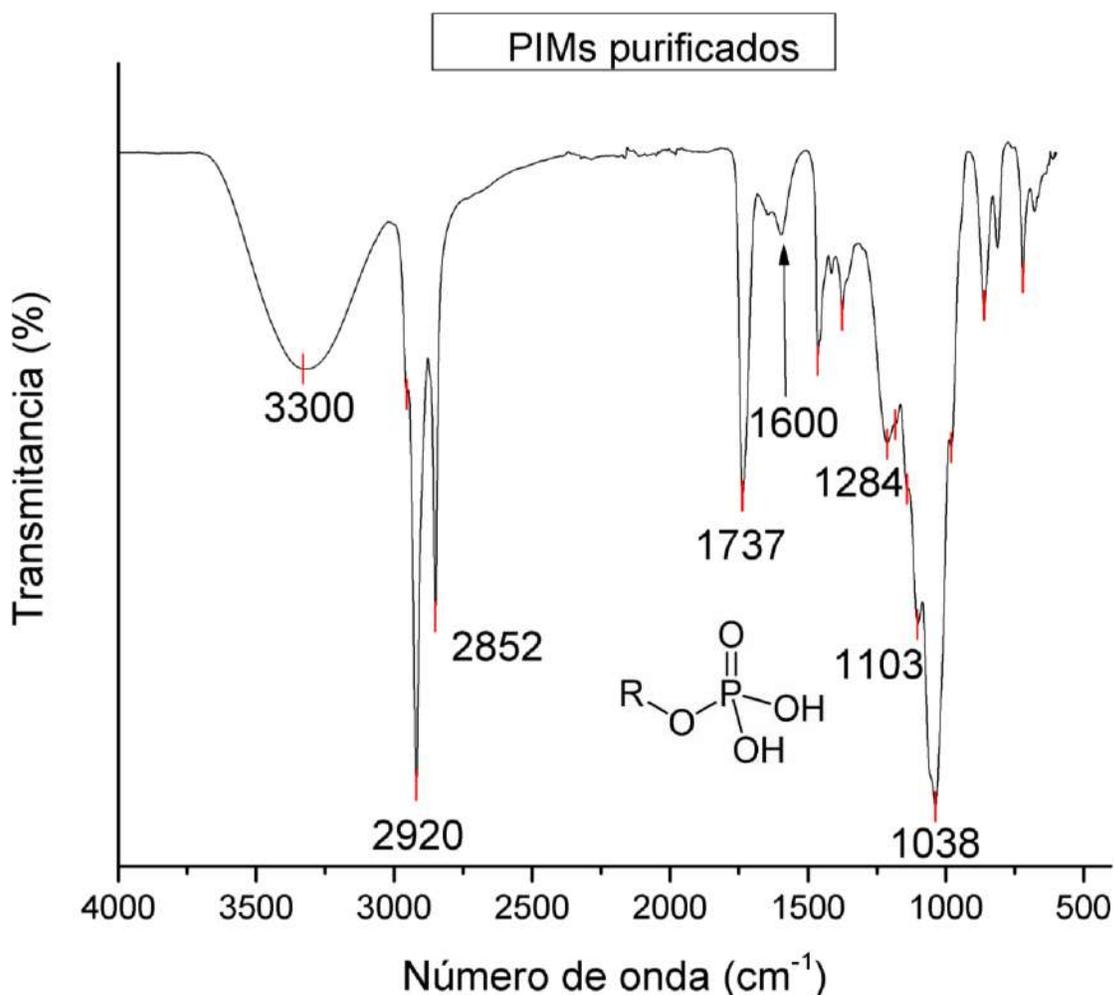


Figura 27. Espectro FT-IR de PIMS purificados. Las bandas rojas indican las señales más representativas para los grupos de éstas moléculas. Las vibraciones de los enlaces referentes al grupo fosfato están presentes en 1038, 1103 y 1284.

5.3. ELISAs

La respuesta del sistema inmune contra el extracto total de los lípidos y los lípidos purificados fue evaluada realizando inmunoensayos acoplados a enzimas. Se utilizaron sueros de conejos inmunizados con la fracción de glicolípidos totales (fracción acetónica – FA) y PIMs totales (fracción metanólica – FM) o la fracción acetónica (FA) del extracto total de *M. fortuitum*. Todos los sueros fueron analizados por triplicado.

5.3.1. Extracto total

Al utilizar el extracto de lípidos totales como antígeno, la reactividad de los sueros de conejo mostró una reactividad importante, es decir que el conjunto de lípidos extraídos fue capaz de reaccionar con todos los sueros de conejo estudiados, incluyendo los dirigidos contra distintos tipos de lípidos. El suero de un conejo no inmunizado (suero control) también presentó una gran reactividad (Figura 28). Este hallazgo es explicable debido a la posible concurrencia de antígenos en la bacteria utilizada para este estudio y otros gérmenes del medio ambiente, ante los cuales un conejo sano podría haber estado expuesto.

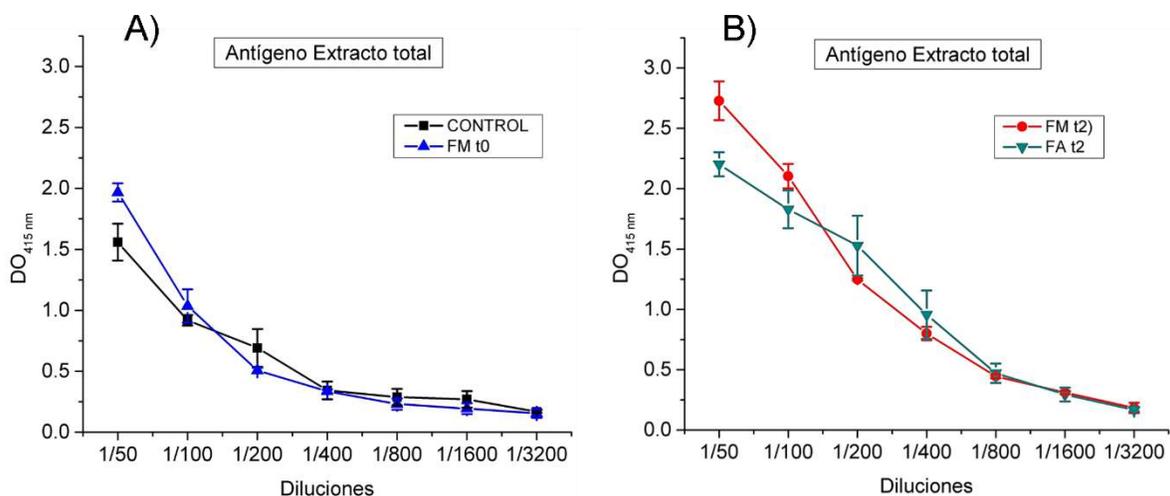


Figura 28. Evaluación del extracto total de lípidos de *M. fortuitum* como antígeno contra sueros de conejos: A) Sin inmunización (control-línea negra); Inmunizado contra FM del E.T. (preinmune-línea azul); B) 30 días después de la inmunización con FM (hiperinmune-línea roja) y el conejo inmunizado con la FA (hiperinmune-línea verde).

En conclusión, estos resultados, es decir, la reactividad del extracto total con cualquier suero de conejo, muestran la gran inespecificidad de los lípidos totales como reactivos de diagnóstico de TB.

Decidimos evaluar si la reactividad de los antígenos purificados resulta específica hacia sueros dirigidos contra fracciones específicas. Con ello, la identidad de las moléculas purificadas englobaría también la reactividad a anticuerpos específicos, lo cual permitiría futuros estudios para evaluar su potencial para uso diagnóstico.

Se realizaron diluciones seriadas del suero de los conejos, que fueron disminuyendo sucesivamente la concentración de anticuerpos; el título del suero se define como la última dilución de suero que da una reacción positiva.

5.3.2. DAT

La Figura 29 muestra el título del suero contra la fracción acetónica del extracto total de lípidos. Se identificó el título en la dilución 1/600, tomando como punto de corte un valor de 0.2 DO entre el control sin inmunizar y el suero hiperinmune (FAt2), como se ha reportado para muestras positivas (Silva, 2017).

La línea roja confirma la especificidad de los anticuerpos generados contra la fracción acetónica, ya que contiene lípidos medianamente polares, como los antígenos DAT, TAT y DMT únicamente. Por ende, un conejo inmunizado con esta fracción generaría anticuerpos en contra de estos glicolípidos, pero no contra el grupo de los PIMs. Esto se confirmó mediante la evaluación contra una fracción hiperinmune de la fracción metanólica (FM t2) (línea verde), la cual no tuvo una respuesta significativa comparando con el suero preinmune a la fracción acetónica (FAt0) (línea azul) y el suero control (línea negra).

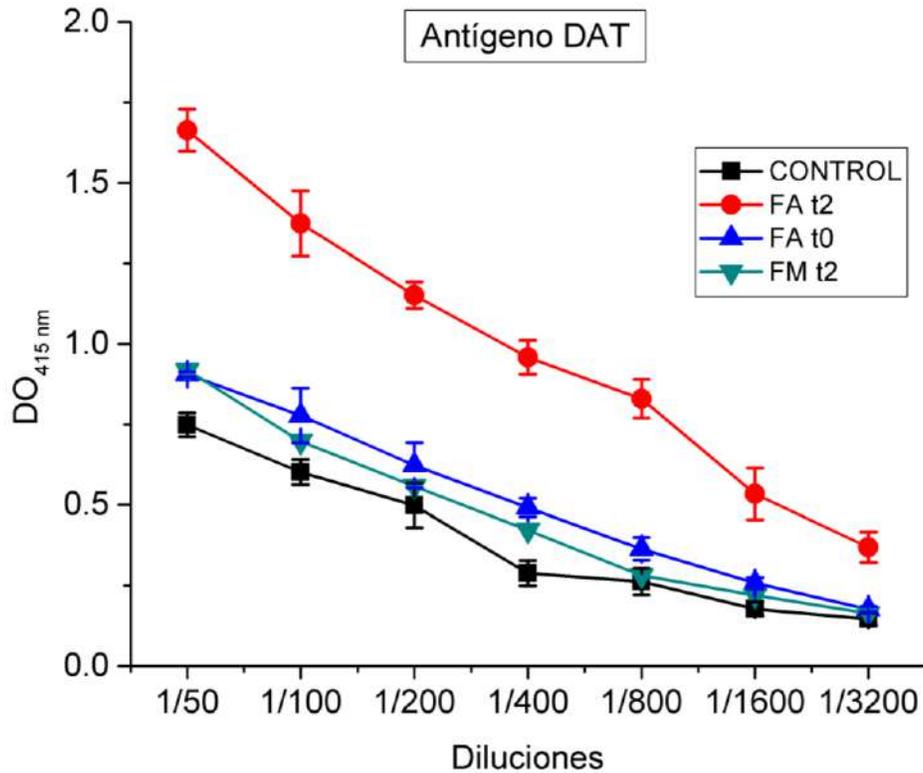


Figura 29. Evaluación del antígeno DAT contra sueros de conejo. La respuesta de la línea roja, claramente mayor, corresponde a la señal del suero hiperinmune, inmunizado con la fracción acetónica (FA t2) del extracto total de *M. fortuitum*.

5.3.3. TAT

De la misma manera, se evaluó la respuesta de los sueros de conejo contra el antígeno TAT (Figura 30). Nuevamente, un conejo inmunizado con la fracción acetónica de los lípidos totales generaría anticuerpos específicos contra las moléculas de naturaleza medianamente polar, como TAT y DMT.

La línea roja obtenida en la gráfica nos permite concluir que hay una mayor respuesta por la fracción acetónica hiperinmune (FA t2). El título del anticuerpo puede observarse en la dilución 1/600.

La respuesta del antígeno TAT contra los sueros FMt2, FAt0 y el suero control fue notablemente menor, como esperábamos, debido a que no se habrían generado anticuerpos contra lípidos más polares, como los PIMs.

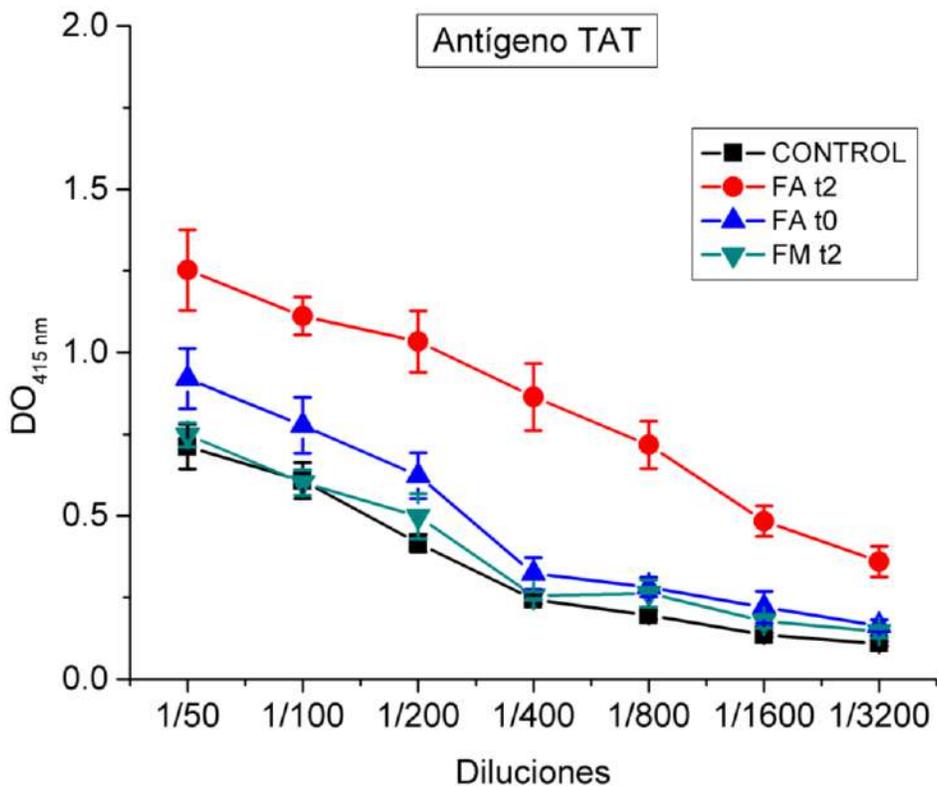


Figura 30. Evaluación del antígeno TAT contra sueros de conejo. La respuesta de la línea roja corresponde a la señal del suero hiperinmune, inmunizado con la fracción acetónica (FA t2) del extracto total de *M. fortuitum*.

5.3.4. DMT

A continuación, se analizó la respuesta del antígeno DMT. El inmunoensayo contra este glicolípido (Figura 31) reflejó un aumento en el título de anticuerpos, comparando con la respuesta de DAT y TAT. El título del anticuerpo se conservó aún en la dilución 1/3200.

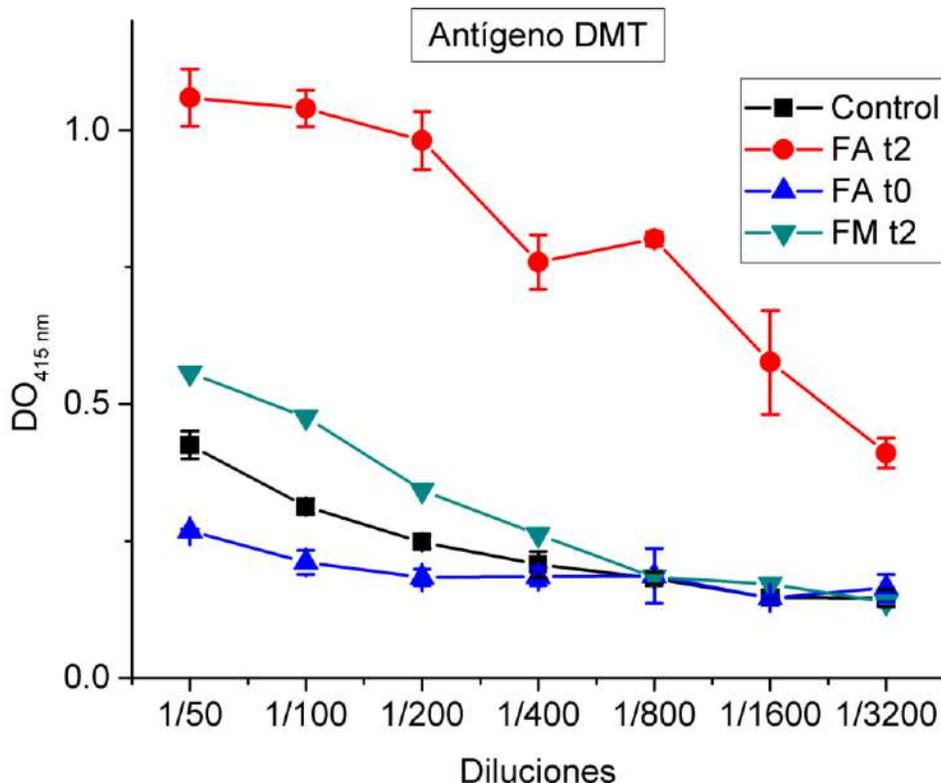


Figura 31. Evaluación del antígeno DMT contra sueros de conejo. La respuesta de la línea roja corresponde a la señal del suero hiperinmune, inmunizado con la fracción acetónica (FA t2) del extracto total de *M. fortuitum*.

El DMT parece ser un antígeno más bioactivo que los otros glicolípidos evaluados de polaridad semejante: DAT y TAT.

5.3.5. PIMs

Podemos observar en los resultados del ELISA de los sueros de conejo probados contra los PIMs (Figura 32) un reconocimiento diferencial por parte del suero hiperinmune de la fracción metanólica; el título del anticuerpo se presenta en la dilución 1/800. La respuesta de los fosfolípidos como antígenos fue mínima para FA t2, en FM t1 y el suero control, en contraste con FM t2 (línea roja). Estos resultados indican que el suero hiperinmune del conejo inmunizado con la fracción metanólica del extracto total generó más anticuerpos específicos contra estos antígenos más polares.

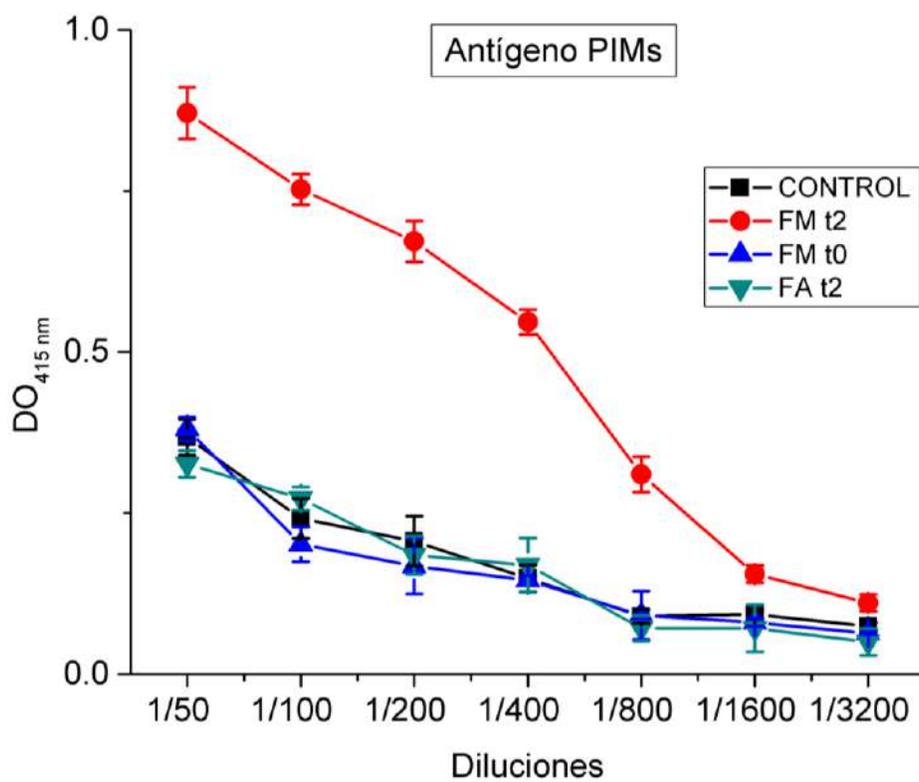


Figura 32. Evaluación del antígeno PIMs contra sueros de conejo. La señal en rojo es mayor debido a un reconocimiento diferencial de los fosfolípidos por los anticuerpos en el suero hiperinmune de la fracción metanólica.

6. CONCLUSIONES

Las técnicas de extracción de lípidos y purificación por cromatografía de adsorción sobre sílice y silicato de magnesio (florisil) son capaces de generar fracciones de alta pureza, con la copurificación de moléculas de polaridad similar, pero distinta identidad química.

El aprovechamiento de las diferencias estructurales entre moléculas semejantes en polaridad, más no en abundancia de motivos hidrofóbicos, da origen a la posibilidad de purificación mediante equilibrios de precipitación en solventes medianamente polares, tales como la acetona. Mediante este tipo de equilibrios fue posible purificar el antígeno DMT a partir de una mezcla con TAT.

La espectroscopía FT-IR resulta una técnica altamente recomendable para visualizar la presencia de finas diferencias estructurales entre antígenos purificados de micobacterias.

La purificación de glicolípidos de micobacterias generó la obtención de antígenos con reactividad serológica específica, sin reacción cruzada con glicolípidos con distinto contenido de azúcares (lípidos de trealosa y lípidos con manósidos).

Los protocolos de purificación descritos en este trabajo han permitido generar antígenos bioactivos con la pureza necesaria para ser evaluados como posibles reactivos para el inmunodiagnóstico de TB.

7. REFERENCIAS

- Abbas** AK, Lichtman AH y Pillai S. Inmunología celular y molecular. 8va edición. Barcelona, España: ELSEVIER. **2015**:259-262.
- Abel** L, El-Baghdadi J, Aziz Bousfiha A, Casanova J-L y Schurr E. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philosophical Transactions Royal Society*. **2014**;369:1-9.
- Abramson** Morris B, Norton William T y Katzman R. Study of Ionic Structures in Phospholipids by Infrared Spectra. *The Journal of Biological Chemistry*. **1965**;6:2389-2397.
- Anderson** GF. Expanding Priorities – Confronting Chronic Disease in Countries with Low Income. *The New England Journal of Medicine*. **2007**;356:3.
- Arinaminpathy** N y Dowdy D. Understanding the incremental value of novel diagnostic tests for tuberculosis. *Nature Diagnostics-modeling*. **2015**;528:60-67.
- Asensio** J, Malagac W, Pawlike y Astarie-Dequeker. Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. *Microbiologia PNAs*. **2014**;31:11491-11496.
- Blanco-Guillot** F., Delgado-Sánchez G., Mongua-Rodríguez N., Cruz-Hervert Pablo, Ferreyra-Reyes Leticia, Ferreira-Guerrero Elizabeth, Torres-González Pedro, Ponce-de-León Alfredo, Sifuentes-Osornio José, García-García Lourdes. Molecular clustering of patients with diabetes and pulmonary tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. **2017**;9:1-12.
- Brown** Timothy H. The rapidly growing mycobacteria--*Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. *Infect Control*. **1985**;6:283-288.
- Bulkin** Bernand J. y Krisnamachari N. Vibrational Spectra of Liquid Crystals. IV. Infrared and Raman Spectra of Phospholipid-Water Mixtures. *Journal of the American Chemical Society*. **1972**;94:4.
- Camirero** JA. Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas. París, Francia. UICTER, **2003**.
- Carel** C, Nukdee K, Cantaloube S, Bonne M, Diagne Cheikh T, Laval F, Daffé M, Zerbib D. *Mycobacterium tuberculosis* Proteins involved in mycolic acid synthesis

and transport localize dynamically to the old growing pole and septum. PLoS ONE. **2014**;9:5.

Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). Programa de Acción Específico. Prevención y Control de la Tuberculosis 2013-2018. **2017** octubre 24 [consultado 2018 febrero 27]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/266405/PAE_Prevencion_ControlTuberculosis2013_2018.pdf

Chen X, Sakamoto K, Quinn FD, Chen H y Fu Z. Lack of intracellular replication of *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG caused by delivering bacilli to lysosomes in murine brain microvascular endothelial cells. *Oncotarget*. **2015**;32:56-67.

Cliff JM., Kaufmann SH., McShane H., van Helden P., O'Garra A. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood. *Immunological Reviews*. 2015;264:88-102.

Czamara K., Majzner K., Pacia M. Z., Kochan K., Kaczor A., Baranska M. Raman spectroscopy of lipids: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*. **2015**;46:4-20.

Datta D, Khatri P, Singh A, Saha DR, Verma G, Raman RI y Mazumder S. *Mycobacterium fortuitum*-induced ERMitochondrial calcium dynamics promotes calpain/caspase-12/caspase-9 mediated apoptosis in fish macrophages. *Cell Death Discovery*. **2018**;4:30-36.

Delogu G, Sali M y Fadda G. The Biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. **2013**;5:1-8.

Domenech Pilar, Reed Michael B., Dowd Cynthia S., Manea Claudia, Kaplan Gilla y Barry Clifton E. Sulfatide Biogenesis and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biology and Chemistry*. **2004**;279:257-265.

Driessen N, Ummels R, Maaskant J, Gurcha S, Besra GS, Ainge GD, Larsen DS, Painter GF, Vandenbroucke-Grauls C, Geurtsen J y Appelmelk BJ. Role of Phosphatidylinositol Mannosides in the interaction between mycobacteria and DC-SIGN. *Infection and Immunity*. **2009**;77:4538–4547.

Engvall Eva y Perlmann Peter. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. **1971**;8:874-879.

Escamilla L, Mancilla R, Glender W y López-Marín LM. *Mycobacterium fortuitum* glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. **1996**;154:1864-1867.

Espinosa-Cueto P, Escalera-Zamudio M, Magallanes-Puebla A, López-Marín LM, Segura-Salinas E y Mancilla R. Mycobacterial glycolipids di-O-acylated trehalose and tri-O-acylated trehalose downregulate inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in macrophages. BMC Immunology. **2015**:16:38.

FIND. Foundation for Innovative New Diagnostics. The Diagnostic Path to a better world. **2008**:4-15.

Folch J., Lee M. y Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biology and Chemistry, **1957**;226:497-509.

Fong-Fu Hsu, Turk John, Owens Róisín M., Rhoades Elizabeth y Russell David. Structural characterization of phosphatidyl-myo-inositol. Journal of American Society of Mass Spectrometry. **2007**;18:466-478.

Forbes Betty A. Mycobacterial taxonomy. Journal of Clinical Microbiology, **2017**; 55:380-383.

Forrellad Mariana A., Klepp Laura I., Giofré Andrea, Sabio García Julia, Morbidoni Hector R, Santangelo María de la Paz, Cataldi Angel A. y Bigi Fabiana. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Virulence, **2013**;4:3-66.

Gautier N, López-Marín LM, Lanéelle MA y Daffé M. Structure of mycoside F, a family of thealose-containing glycolipids of *Mycobacterium fortuitum*. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters. 1992:81-88.

Harriff MJ, Wolfe LM, Swarbrick G, Gwendolyn Swarbrick, Megan N, Meghan EC, Canfield ET, Vogt T, Gardner TK, Li W, Jackson M, Lewinsohn DA. y Lewinsohn DM. HLA-E presents glycopeptides from the *Mycobacterium tuberculosis* protein MPT32 to Human CD8⁺ T cells. Scientific Reports. **2017**;7:1-16.

Hnasko R. ELISA Methods and Protocols. California, Estados Unidos. Springer.Human Press. **2015**; 5-6(54-76)

Horton Katherine C., MacPherson Peter, Houben Rein M. G. J., White Richard G., Corbett Elizabeth L. Sex Differences in Tuberculosis Burden and Notifications in

Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Metaanalysis. PLoS Medicine. **2016**;13:1-23.

Indrigo Jessica, Hunter Robert L. y Actor Jeffrey K. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. Journal of Microbiology. **2003**;1490:49-59.

Jastrzębski W., Sitarz M., Rokita M. y Bułat K. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. **2011**;79:722-727.

Kamariza M, Shieh P, Ealand CS, Peters JS., Chu B, Rodriguez-Rivera FP, Babu Sait MR, Kana BD y Bertozzi C. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum with a solvatochromic trehalose probe. Science Translational Medicine. **2018**;10:1-12.

Lee Oona Y-C, Wu Houdini H.T., Helen D. Donoghue, Spigelman Mark, Greenblatt Charles L., Bull Ian D., Rothschild Bruce M., Martin Larry D., Minnikin David E., S. Besra Gurdyal. *Mycobacterium tuberculosis* complex lipid virulence factors preserved in the 17,000-year-old skeleton of an extinct bison, *Bison antiquus*. PLoS One. **2012**;7:1-23.

Marrakchi H, Lanéelle MA y Daffé M. Mycolic Acids: structures, biosynthesis, and beyond. Cell Press. **2014**;21:67-86.

Minnikin DE, Oona Y-C L, Houdini H.T. W, Nataraj V, Donoghue HD, Malin R, Motoko W, Alderwick L, Bhatt A y Gurdyal SB. Chemical principles in the organization of lipid components in the mycobacterial cell envelope. Research Microbiology. **1991**;142:423-427.

Minnikin DE. Pathophysiological implications of cell envelope structure in *Mycobacterium tuberculosis* and related taxa. INTECH. **2015**;10:772-785.

Muñoz M, Lanéelle MA, Luqin M, Torrelles J, Julián E, Ausina V y Daffé M. Occurrence of an antigenic triacyl trehalose in clinical isolates and reference strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Federation of European Microbiology Societies. Microbiology Letters. **1997**;157:251-259.

Murray J. A century of tuberculosis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. **2004**;169:1181-1186.

Ndlovu H y Marakalala M J. Granulomas and Inflammation: host-directed therapies for tuberculosis. *Frontiers in Immunology*. **2016**;7:434-443.

Nhamoyebonde S y Alasdair L. Biological differences between the Sexes and Susceptibility to Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*. **2014**;209:100-106.

a) **Organización Mundial de la Salud (OMS).** Estadísticas Sanitarias Mundiales 2014. **2014**

b) **Organización Mundial de la Salud (OMS).** Día mundial de la Tuberculosis. **2014** marzo 24 [consultado 2018, noviembre 27]. Disponible en: <http://www.who.int/campaigns/tb-day/2014/event/es/>

Organización Mundial de la Salud (OMS). Informe mundial de la tuberculosis 2016. **2016**

a) **Organización Mundial de la Salud (OMS).** Global Tuberculosis Report 2018. **2018**

b) **Organización Mundial de la Salud (OMS).** Tuberculosis: Datos y cifras. **2018** septiembre 18 [consultado 2018, noviembre 27]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>

Orgeur M y Brosch R. Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Current Opinion in Microbiology*. **2018**;41:68-75.

Pesala B, Gavarna H, Kumar A, Kumaravelu C, Scaria V y Sivasubbu S. Non-invasive detection of *Mycobacterium Tuberculosis* using IR and NIR spectroscopy. 37th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, **2012**. Delhi, India.

Pilheu J. A. Tuberculosis 2000: problems and solutions. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*. **1998**;9:696-703.

Rabuffo-Scheer CA, Kirschner, Staemmler M y Naumann D. Rapid species and strain differentiation of non-tuberculous mycobacteria by Fourier-Transform Infrared microspectroscopy. *Journal of Microbial Methods*. **2007**;68:282-290.

Ridell M, WÅllerström G, Minnikin DE, Bolton RC y Magnusson MA. Comparative serological study of antigenic glycolipids from *Mycobacterium. Tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease*. **1992**;73:101-105.

Romero CR. Microbiología y parasitología humana. 3a edición. México: Editorial Panamericana. **2007**:980.

Saavedra R, Segura E, Leyva R, Esparza LA y López-Marín LM. Mycobacterial di-O-acyl-trehalose inhibits mitogen and antigen-induced proliferation of murine T cells *in vitro*. Clinical Diagnostics Laboratory Immunology. **2001**;8:81-88.

Sakula A. Robert Kock: Centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. The Canadian Veterinary Journal La Revue Vétérinaire Canadienne. **1983**;24:127-131.

Schulz KF y Grimes D. The Lancet Handbook for Essential Concepts in Clinical Research. 2002: 84-87.

Secretaria de Salud, Dirección General de Epidemiología. Boletines Caminando a la Excelencia 2017. 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} Trimestre. **2018**.

Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana para la Prevención de la tuberculosis NOM006-SSA2-2013. Ciudad de México. **2013**.

Secretaria de Salud. Programa de Acción: Tuberculosis. **2001** [consultado 2018, enero 15]. Disponible en:

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/tuberculosis.pdf>

Silva RA, Queiroz A, Marcos F, Ishikawa EA, Silvestre SA y Marília BX. Evaluation of agreement between tests for the diagnosis of leprosy. The Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. **2017**;53:100-107.

Simeone R., Huet G., Constant P, Malaga W, Laval AF, Daffé M, Guilhot C y Chalut C. Functional characterisation of three O-methyltransferases involved in the biosynthesis of phenoglycolipids in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS ONE. **2013**;3:1-13.

Singh S. Commercial serological tests for the diagnosis of active tuberculosis in India: Time for introspection. The Indian Journal of Medical Research. **2011**; 13:583-587.

Steingart KR, Nandini D, Megan H, Schiller I, Payam N y Hopewell PC. Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: A Meta-analysis. Clinical and vaccine immunology. **2009**;260–276.

Socrates George. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Third Edition. West Sussex, England. JOHN WILEY & SONS, LTD. **2001**;23:335-339.

Tang M, McEwen GD, Wu Y, Miller CD y Zhou A. Characterization and analysis of mycobacteria and Gram-negative bacteria and co-culture mixtures by Raman microspectroscopy, FTIR, and atomic force microscopy. Anal. Analytical and Bioanalytical Chemistry. **2012**;405:1577–1591.

Thomas M. Daniel. Antibody and antigen detection for the immunodiagnosis of tuberculosis: why not? What more is needed? Where do we stand today?. Journal of Infectious Diseases. **1988**: 678-680.

Wang B, Gu J, Chen B, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay and gold-labelled immunochromatographic strip assay for the detection of ancient wool. Journal of Analytical Methods in Chemistry. **2018**:1-9.

Zuber B, Chami M, Christine H, Dubochet J, Griffiths G y Daffé M. Direct visualization of the outer membrane of Mycobacteria and Corynebacteria in their native state. Journal of Bacteriology. **2008**;190:5672–5680.