

ELABORACIÓN DE UN MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA *Mycobacterium tuberculosis* POR HEMOAGLUINACIÓN USANDO ANTICUERPOS DE TIBURÓN *Heterodonthus francisci*.

Pavel Hayl Lugo Fabres¹, Rafael Laniado², Alexei Licea Navarro¹. ¹CICESE.

Carretera Tijuana-Ensenada km 107; (646) 175-05-69; ²alicea@cicese.mx. ² Hospital General de Tijuana.

Palabras clave: *Tuberculosis, Hemoaglutinación, Heterodonthus francisci*.

Introducción. Hoy en día, aproximadamente la tercer parte de la población mundial es portadora de *Mycobacterium tuberculosis*. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (O. M. S. 2006), cada año mueren 3 millones de personas a causa de esta enfermedad y aparecen alrededor de 8 millones de casos nuevos de tuberculosis pulmonar anualmente. *Mycobacterium tuberculosis*, posee el antígeno de secreción temprana ESAT-6 codificado por el gen esat-6 Rv3875 de 285pb. Esta proteína se ha encontrado en cepas de *M. tuberculosis*, *M. africanum* y cepas virulentas de *M. bovis*, pero, no se ha encontrado en cepas de *M. bovis* no patógenas con las cuales se elabora la vacuna BCG¹ lo cual, hace a ESAT-6 candidata para métodos diagnósticos². Los anticuerpos de tiburón denominados IgNAR de 95kDa (nuevo receptor de antígeno) carecen de dominios variables ligeros y su reconocimiento se centra principalmente en el CDR3. Los eritrocitos humanos poseen una glucoproteína en superficie llamada glicoforina A la cual se utilizó para hacer rondas de bioselección de una biblioteca no inmune de tiburón y así obtener una fracción de anticuerpo V_HNAR específico y fusionarlo con ESAT-6, para elaborar un método diagnóstico para tuberculosis humana basado en la hemoaglutinación.

Metodología. De una muestra de ADN genómico de *M. tuberculosis*, se aisló y reamplificó el gen codificante para ESAT-6 por PCR; de una biblioteca no inmune de tiburón *H. francisci* se obtuvo un anticuerpo con capacidad aglutinante. Se fusionaron ambos genes por PCR y se expresó la proteína quimérica en *E. coli* Top10F' con el objetivo de usarla como método diagnóstico para tuberculosis basándose en el reconocimiento de ESAT-6 por las Ig humanas presentes en el paciente contra este antígeno y el reconocimiento de glicoforina A por el anticuerpo de tiburón, causando hemoaglutinación *ex vivo*.

Resultados y discusión. Se lograron fusionar por PCR los genes codificantes para ESAT-6 y V_HNAR-Antiglicoforina así como expresarlos de manera heteróloga en *E. coli* Top10F'. Los ensayos de hemoaglutinación consistieron en eritrocitos lavados; sueros positivos a tuberculosis facilitados por el Departamento de Epidemiología del Hospital General de Tijuana y la proteína quimérica ESAT6-V_HNAR.

Los ensayos de hemoaglutinación se analizaron bajo un estudio doble ciego, obteniendo una eficiencia de detección de sueros positivos del 82%.

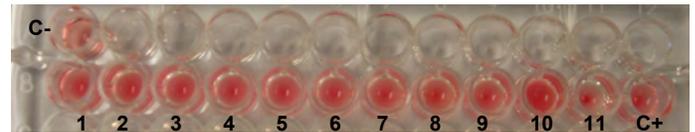


Fig. 1 Ensayo de hemoaglutinación de sueros problema, pozo superior control negativo, pozos del 1 al 10 positivos, 11 negativo, 12 control positivo.

Cuadro 1. Resultados del estudio doble ciego

Total de sueros	Resultados positivos	No determinados	Negativos	Eficiencia
50	41	3	6	82 %

Conclusiones. Se aisló, amplificó y expresó el gen de ESAT-6 partiendo de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis*; por medio de la técnica de despliegue en fagos, se obtuvo de una biblioteca no inmune, un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer glicoforina A eritrocitaria e inducir aglutinación. Se estandarizó la técnica de hemaglutinación con el anticuerpo tipo V_HNAR y se logró hacer la construcción del gen quimérico de V_HNAR-ESAT-6 así como expresarlo en *E. coli* TOP10F'. Con la proteína quimérica se logró la detección por hemoaglutinación de sueros de pacientes infectados con *Mycobacterium tuberculosis* con una eficiencia del 82%. En base a estos resultados podemos considerar esta técnica como una alternativa viable para el diagnóstico de tuberculosis humana.

Agradecimiento. Al Hospital General de Tijuana. A Laboratorios SILANES S. A.

Bibliografía.

- Lalvani A., Pathan A., Mc Shane H., Wilkinson R., Latif M., Conlon C., Pasvol G., Hill A. 2001. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 163:pp 824-828.
- Cockle P., Gordon S., Lalvani A., Buddle B., Hewinson R., Vordermeier H. 2002. Identification of Novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit Vaccine candidates by comparative genomics. *IAI.* 70 (12): 6996-7003.