

PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ESAT-6 Y CFP-10 PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

²Susana Flores-Villalva*, ¹Mauricio A. Trujillo-Roldán**, ¹Antonio, J. Vallecillo, ¹Cristina Parada, ¹Clara Espitia, ²Francisco Suárez Güemes, ²José Ángel Gutiérrez-Pabello.

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM. ²Laboratorio de Investigación en Tuberculosis y Brucelosis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Ciudad de México. Teléfono: (52) 55-56225896. Fax: (52) 55-56225971. E-mail: *fv.susana@gmail.com, **maurotru@gmail.com.

ESAT-6, CFP-10, Mycobacterium bovis.

Introducción. La tuberculosis (TB) bovina es una de las enfermedades más importantes del ganado y es una amenaza para la salud humana (1). Una de las principales limitantes en la erradicación es la incapacidad de la prueba cutánea derivada de proteínas purificadas (PPD) de detectar a los animales infectados. Por esto, es necesario mejorar la capacidad diagnóstica sobre la enfermedad (2). Estudios *in vitro* han demostrado que los antígenos ESAT-6 y CFP-10 mejoran la sensibilidad y especificidad como prueba diagnóstica, por lo que su uso podrían ser de gran valor en las pruebas de rutina (3). El objetivo de este trabajo es determinar la utilidad del cóctel ESAT-6 y CFP-10 en el diagnóstico *in vivo* de la TB bovina, por lo que un objetivo específico es la producción de de las proteínas recombinantes.

Metodología. Se utilizaron dos cepas recombinantes *E.coli* Rosetta™ (DE3) bajo el plásmido de expresión pET15b. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron con 6M de urea y las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad a níquel. La concentración de biomasa se midió por espectrofotetría, la concentración e identidad de la proteína se determinó por densitometría en geles de poliacrilamida, Bradford y Western-blot (WB). La purificación se efectuó mediante cromatografía de afinidad en una columna His-trap™ HP (GE healthcare) y se siguió por Dot-blot. Después de verificar la pureza de las proteínas se realizarán los estudios inmunológicos en bovinos naturalmente infectados.

Resultados y discusión. El sistema de expresión de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 se optimizó en matraces, se escaló a biorreactor de 1.0 L de volumen de trabajo controlando el pH, temperatura, y oxígeno disuelto. Los cultivos en biorreactores presentaron velocidades de crecimiento mayores que aquellos llevados en matraz (Cuadro 1), superando por más del doble la biomasa obtenida de los cultivos en matraces (fig. 1)

Cuadro 1. Velocidades específicas de crecimiento (h^{-1}) de las cepas en los sistemas de producción

Rosetta (DE3)	Matraz	Biorreactor
ESAT-6	0.34	0.80
CFP-10	0.50	0.75

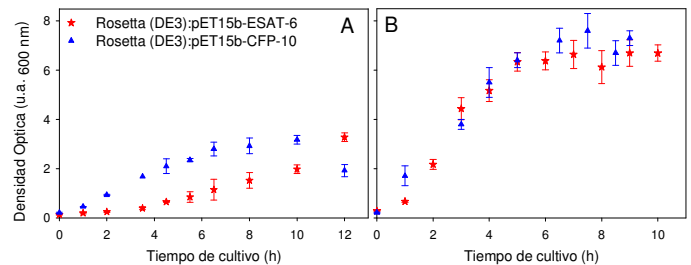


Fig. 1. Cinéticas de crecimiento de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 en matraz (A) y en biorreactor de 1.0 L (B).

La inducción y expresión de las proteínas se hizo con 1mM de IPTG a las 3 horas de cultivo y confirmando en geles de acrilamida y W.B. (Fig. 2).

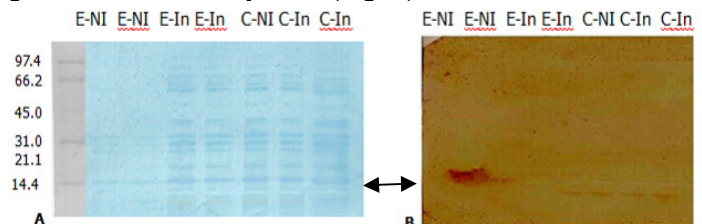


Fig. 2. SDS-PAGE (A) y Western blot (B) de las proteínas ESAT-6 (10-12 kDa) y CFP-10 (12-14 kDa). No se observa producción de las proteínas cuando no hay inducción.

Conclusiones. Se logró obtener altas concentraciones de ESAT-6 y CFP-10 en cultivos en matraces y en biorreactor controlado. Estas proteínas podrán evaluarse en el diagnóstico *in vivo* de la tuberculosis bovina.

Agradecimiento. Macroproyecto línea 2 Tuberculosis PAPIIT IN222306. PAPIIT IN228509, CONACyT 82533. SFV agradece la beca de maestría CONACyT (214579).

Bibliografía.

- Collins, J.D. (2006). Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. *Vet. Microbiol.* 112: 369-381.
- Gormley, E. Doyle, M.B. *et al.* (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Vet Microbiol.* 112: 171-179.
- Aagaard, C. Govaerts, M.M. *et al.* (2006). Optimizing Antigens Cocktails for Detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT-6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* 44:4326-4335.