

Producción de los antígenos ESAT-6 y CFP-10 de *Mycobacterium tuberculosis* y evaluación de sus potencialidades en el serodiagnóstico de la tuberculosis activa en una población cubana

Elsa T. Pimienta-Rodríguez, Caridad Rodríguez-Valdés, Mónica Sarzo-Gómez y Carlos Vallín-Plou.

Grupo de Biotecnología, Centro de Estudios de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. Avenida 23 No. 21425 entre calles 214 Y 222, La Coronela, La Lisa, La Habana, Código Postal 13600, Cuba. epimienta@infomed.sld.cu

Recibido: 11 de noviembre de 2011

Aceptado: 10 de febrero de 2012

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, ESAT-6, CFP-10, serodiagnóstico, anticuerpos.
Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, ESAT-6, CFP-10, serodiagnosis, antibodies.

RESUMEN. *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es el agente causal de la tuberculosis humana (TB), la cual es la enfermedad infecciosa de mayor prevalencia mundial causada por una bacteria. En el 2009 hubo un estimado de 9,4 millones de nuevos casos y se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *Mtb*. Debido a esta situación, el diagnóstico temprano y eficaz de la TB es vital para controlar su expansión y mortalidad. En este trabajo se clonaron los genes *esat-6* y *cfp-10* del genoma de *Mtb* en los respectivos vectores plasmídicos pET3a y pET23d (Promega) de *Escherichia coli*. Ambas proteínas fueron expresadas en la fracción soluble, lo cual facilitó su purificación mediante la cromatografía de afinidad por quelatos metálicos en condiciones nativas con una pureza entre 90 - 94 %. Por primera vez, empleando la metodología de ELISA, se evaluó el potencial diagnóstico de estas dos proteínas recombinantes en una población cubana. La respuesta de anticuerpos reactivos contra ESAT-6 y CFP-10 recombinantes en los sueros de los enfermos fue significativamente mayor que la de los individuos sanos vacunados con BCG. El ensayo presentó una especificidad del 97,18 %, pero tuvo una baja sensibilidad del 32 %; valor que puede estar relacionado con el tratamiento de los pacientes con los medicamentos antituberculosos. Este parámetro pudiera incrementarse mediante la inclusión de otros antígenos inmunogénicos en la mezcla, considerando que la respuesta a anticuerpos en los pacientes de TB es heterogénea.

ABSTRACT. *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) is the etiological agent of human tuberculosis (TB), which globally is the most prevalent disease caused by a single bacterial pathogen. In 2009, worldwide there were an estimated 9,4 million of new cases and it is estimated that one third of the world population is latently infected with *Mtb*. Due to this situation, some rapid and accurate diagnostic method is required for controlling the morbidity and mortality of this disease. In this work, the genes *esat-6* and *cfp-10* were cloned in the *E. coli* plasmid vectors pET3a and pET23d (Promega), respectively. Both proteins were expressed in the soluble fraction, which facilitated their purification by means of the metal-chelate affinity chromatography under native conditions with a purity of 90 - 94 %. By the first time, using the methodology of ELISA, the serodiagnostic potential value of these two proteins was evaluated in a Cuban population. The antibody response against recombinant CFP-10 and ESAT-6 from the patients group was statistically higher than that from the healthy BCG-vaccinated individuals. The assays showed a specificity of 97,18 % and low sensitivity of 32 %, value that could be affected by the treatment of the patients with anti-TB drugs. This parameter might be increased by means of the inclusion of other immunogenic antigens in the cocktail, considering that antibody responses in TB patients are heterogeneous.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis pulmonar humana es la forma más común de tuberculosis (TB) y la más importante en términos epidemiológicos. Es una enfermedad infecciosa causada por diversas especies del género *Mycobacterium*, todas ellas pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La especie más importante y representativa es el *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) o bacilo de Koch. La TB es la enfermedad infecciosa, causada por una bacteria, que tiene la mayor prevalencia en el mundo. Se estima que alrededor de dos millones de personas mueren cada año por TB. En el 2009 hubo un estimado de 9,4 millones de nuevos casos y se estima que un tercio de la población mundial está infectada de forma latente por el microorganismo causal y entre un 5 y 10 % de esas personas infectadas desarrollarán la TB activa en algún momento de su vida.^{1,2}

La infección por el bacilo suele ocurrir por la vía aérea al ser fagocitado por los macrófagos alveolares. En un 30 % de los casos, estos macrófagos son incapaces de destruirlo. La respuesta inmunitaria controla, pero generalmente no elimina al patógeno. La falta de una respuesta inmunitaria apropiada, provoca como resultado una TB aguda

activa. Se plantea que con solo la inhalación de uno o dos bacilos viables se puede producir una infección activa. En la mayoría de los casos de infección por *Mtb*, el individuo permanece asintomático y no infeccioso. Esta latencia clínica a menudo se extiende durante toda la vida del individuo. Sin embargo, la reactivación de la infección latente puede ocurrir en respuesta a perturbaciones de la respuesta inmune, produciendo la enfermedad activa. La infección por VIH, la diabetes mellitus, el tratamiento con corticosteroides, el envejecimiento y el abuso de drogas o alcohol, aumentan el riesgo potencial de reactivación de la enfermedad latente.^{2,3}

La TB es considerada una enfermedad reemergente debido principalmente a la aparición de cepas de *Mtb* resistentes a los fármacos de primera línea utilizados en su tratamiento y a la incidencia del SIDA como enfermedad inmunocomprometedora.^{2,3} En este escenario, también ha influido la pérdida de eficacia de la vacuna actual (*Mycobacterium bovis* BCG) debido a mutaciones experimentadas por pases sucesivos para su conservación, lo cual ha conducido a la delección de antígenos importantes en la generación de la respuesta inmune.⁴ En Cuba, se han obtenido buenos resultados en el control de la diseminación de la TB durante las últimas décadas. La incidencia de TB se ha estimado en una razón de siete enfermos por cada 100 000 habitantes y se ha mantenido una disminución anual del 5 % en el número de casos.⁵

En la actualidad, los métodos de diagnóstico de la TB presentan disímiles dificultades. En países subdesarrollados, el diagnóstico de TB se basa primariamente en el examen al microscopio de las tinciones de bacilos resistentes a ácido y alcohol en muestras de esputo y ocasionalmente, por radiografías de tórax. Las tinciones resultan positivas solamente en TB activa avanzada.⁶ Además, las muestras de esputo positivas a *Mtb*, constituyen alrededor del 50 % de los casos de TB pulmonar activa y la sensibilidad de las tinciones oscila entre el 22 y el 78 % de los casos probados de cultivo.^{6,7} El cultivo de la bacteria es el llamado "gold standard" para el diagnóstico de la TB activa, por demostrar la presencia del bacilo y de la infección. Sin embargo, esta prueba tiene desventajas, entre ellas: el resultado puede tardar entre 6 y 8 semanas (debido al crecimiento lento del microorganismo) y generalmente se obtienen resultados negativos en pacientes pauci-bacilares (baciloscopia negativa o BK-negativo) como los niños aquejados de TB. En el caso del análisis de las radiografías de tórax, las imágenes pertenecientes a pacientes con TB son en ocasiones similares a las observadas en otras patologías como la neumonía y las neoplasias del pulmón.^{7,8}

Hasta hace poco tiempo, la prueba de la tuberculina era la única disponible para el diagnóstico de la TB latente. Su mayor limitación es que es una mezcla cruda de antígenos, varios de los cuales son comunes a *Mtb*, *M. bovis* BCG y varias micobacterias no tuberculosas. Por esta razón, posee bajo porcentaje de especificidad en países donde se realiza la vacunación con BCG, hay exposición a micobacterias ambientales y donde la TB es endémica o ambas.⁹

Contar con un método de diagnóstico rápido, reproducible y confiable, que permita detectar la enfermedad en sus primeros estadios, es esencial para controlar la incidencia y propagación de la TB. Por ello, otras técnicas más precisas y específicas están siendo evaluadas; tales como la reacción en cadena de la polimerasa de la transcripción reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés, *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*), los ensayos de inmunidad celular basados en la estimulación de la producción de interferón γ (IFN γ) en células T^{6,10,11} y por ensayos inmunoenzimáticos (ELISA, por sus siglas en inglés, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).¹²⁻¹⁴

El ELISA de captura de anticuerpos constituye uno de los más atractivos por su bajo costo, su reproducibilidad, corta duración y el gran número de muestras que permite procesar. Esta metodología ha sido evaluada para el diagnóstico de la TB empleando los antígenos de 38 kDa, Mtb81, ESAT-6, CFP-10, el complejo Ag85 y TB16.3, entre otros.¹³⁻¹⁷ Particularmente, los antígenos ESAT-6 (*Early Secretory Antigenic Target-6*, Rv3875,) y CFP-10 (*Culture Filtrate Protein-10*, Rv3874) han recibido mucha atención en los últimos años debido a que son antígenos inmunodominantes secretados tempranamente por *Mtb*, se encuentran dentro de la región de diferencia 1 (RD1) de su genoma y están ausentes en *M. bovis* BCG, *Mycobacterium avium* y la mayoría de las micobacterias no tuberculosas.^{18,19} La región RD1 ha sido delecionada de manera natural en la cepa vacunal BCG como consecuencia de los múltiples pases a que ha sido sometida para su conservación.²⁰ La pérdida de eficacia protectora de la vacuna se relaciona con esta delección, por ello, los genes presentes en esta región constituyen candidatos importantes para el desarrollo de futuras vacunas, ya sean de subunidades proteicas, de ADN desnudo o de cepas recombinantes del propio *M. bovis* BCG.²¹⁻²⁴ Estudios realizados en modelos animales inmunizados con los antígenos ESAT-6 y CFP-10 han demostrado que estimulan una potente respuesta celular, caracterizada por elevados niveles de IFN γ , y que protegen contra la infección por *Mtb*.²⁵

De manera similar se ha estudiado la utilidad de los antígenos ESAT-6 y CFP-10 en el diagnóstico de la TB activa al estimular de forma significativa la secreción de IFN γ por linfocitos aislados de pacientes.²⁶ Considerando estos resultados, los objetivos de este trabajo fueron obtener las proteínas ESAT-6 y CFP-10 de *M. tuberculosis* por vía recombinante en *Escherichia coli* y evaluar su potencial uso como antígenos de captura, empleando la metodología de ELISA, para el diagnóstico serológico de la TB activa en una población cubana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plasmidios y medios de cultivo

Las características de las cepas bacterianas y plasmidios utilizados en este trabajo se relacionan más adelante (Tabla 1). Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio Luria Bertani (LB) (triptona, 10 g/L; extracto de levadura, 5 g/L; cloruro de sodio, 10 g/L; agar 1,5 g/L para medio sólido) ajustado a pH 7,4. Según los requerimientos, el medio de cultivo fue suplementado con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 0,1 mmol/L, 2-indolgalactosa (Xgal) a 50 μ g/mL y ampicilina (Amp) a 100 μ g/mL. Las placas de *E. coli* fueron incubadas a 37 °C y los cultivos líquidos, a la misma temperatura y 240 r/min de agitación. Los componentes del medio de cultivo y los reactivos utilizados fueron adquiridos de las firmas Oxoid (U. K.) y Promega (EE. UU.), respectivamente.

Técnicas usadas en el trabajo con ADN

Para amplificar los genes *esat-6* y *cfp-10* mediante PCR se utilizó como molde ADN cromosómico de *Mtb* H37Rv, el cual fue donado por el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y otras

Micobacterias del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). Se diseñó un protocolo de PCR estándar²⁷ y una pareja de oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes. En el caso de *esat-6*, el oligonucleótido directo utilizado fue 5'-TACATATGCATCACCATCACCATCACACAATGACAGAGCAGCAG-3' y el reverso fue 5'-TAGGATCCCTATGCGAACATCCCAGTGACGTTGCCTTCGGTC-3. En el extremo 5' de los cebadores se incorporaron sitios de reconocimiento (en cursiva) para *NdeI* y *BamHI*, respectivamente para facilitar la clonación posterior del gen amplificado. En el caso de *cfp-10* se utilizaron los cebadores 5' GGATCCATGGCAGAGATGAAGACC 3' y 5' GGATCCGAAGCCCATTGCGAGG 3' como oligonucleótidos directo y reverso, respectivamente. En este caso, se incluyó el sitio de restricción *BamHI* en el extremo 5' de ambos oligonucleótidos (en cursiva) para facilitar el clonaje posterior del gen.

Para las transformaciones de las cepas de *E. coli* con ADN se prepararon células competentes por tratamiento con CaCl₂, de acuerdo con lo descrito por Ausubel y cols.²⁷

Construcciones genéticas

Obtención de un plasmidio de expresión de *esat-6* fusionado a una cola de seis histidinas

Se amplificó el gen *esat-6*, que codifica para la proteína madura, como un fragmento de aproximadamente 290 pb, siguiendo los procedimientos descritos en la sección anterior. Este fragmento fue clonado en el plasmidio pGEM[®]-T Easy (Tabla 1). El plasmidio resultante se denominó pGEMesat6 y fue posteriormente digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* para extraer el fragmento correspondiente al gen *esat-6* y ligarlo al vector pET3a (Tabla 1), previamente digerido con las mismas enzimas. El plasmidio resultante se denominó pETesat6, en el cual el gen *esat-6* se encontraba fusionado en su extremo 5' a una secuencia codificante para seis histidinas y bajo la regulación del promotor inducible del fago T7.

Obtención de un plasmidio de expresión de *cfp-10* fusionado a una cola de seis histidinas

El gen *cfp-10*, que codifica para la proteína madura, fue amplificado como un fragmento de aproximadamente 300 pb, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. Este fragmento fue clonado en el plasmidio pGEM[®]-T Easy (Tabla 1) y el plasmidio resultante se denominó pGEMcfp-10. A continuación, el fragmento de 300 pb *NcoI*/*BamHI*-klenow del pGEMcfp10 fue clonado en el vector comercial pET23d (Tabla 1), previamente tratado con las mismas enzimas. El plasmidio resultante fue denominado pETcfp-10, en el cual el gen *cfp-10* se encontraba bajo la regulación del promotor inducible del fago T7 y su extremo 3' estaba fusionado a una secuencia codificante para seis histidinas.

Expresión de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 de *M. tuberculosis* en *E. coli*

La expresión de las proteínas fue inducida en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS transformadas con los plasmidios pETesat6 o pETcfp10. Una colonia de cada cepa fue inoculada en 5 mL de LB, suplementado apropiadamente con ampicilina e incubada con agitación por 16 h a 37 °C y 240 r/min. Al cabo de ese tiempo, el cultivo fue inoculado al 1 % en 50 mL de LBamp e incubado en iguales condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm entre 0,4 y 0,6. En ese momento, se indujo la expresión de las proteínas de interés por la adición de IPTG a 0,1 mmol/L de concentración final y se incubó durante 4 h con agitación a 28 °C. Transcurrido este tiempo, la biomasa fue recobrada y mediante un procedimiento estándar de sonicación, se procedió a la ruptura total de las células.²⁷

Análisis de la expresión de ESAT-6 y CFP-10

La producción recombinante de ESAT-6 y CFP-10 fue analizada por electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE con geles al 15 % de acrilamida, de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli.²⁸

Tabla 1. Cepas y plasmidios utilizados

Cepas/Plasmidios	Genotipo o fenotipo	Origen/Referencia
Cepas		
<i>Escherichia coli</i> TG1	[K12, <i>lac-pro supE thi hsdD5</i> (F' <i>traD36 proA+B+ lacI^q lacZ</i> M15)]	27
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/pLysS	Deficiente en las proteasas lon y OmpT	Stratagene
Plasmidios		
pGEM [®] -T Easy	Vector para la clonación de productos de PCR, Amp-r, con sitio múltiple de clonación	Promega
pET3a	Vector que porta una secuencia T7·Tag	Novagen
pET32d	Vector que porta una secuencia T7·Tag [®] y una secuencia His·Tag [®]	Novagen

En la inmunodetección, se utilizó la técnica de *Western blotting*. Para ello, las muestras de proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a filtros de nitrocelulosa, según lo descrito por Towbin y cols.²⁹ Los sitios libres de las membranas se bloquearon con leche descremada al 5 % en disolución salina estabilizada con fosfato (PBS: NaCl, 137 mmol/L; Na₂HPO₄, 9,58 mol/L; KCl, 2,68 mmol/L; KH₂PO₄, 1,47 mmol/L; pH 7,2) por una hora a 37 °C. En las dos horas siguientes, las membranas se incubaron a 37 °C con una dilución 1 : 10 de anticuerpos primarios IgG sérica de ratón dirigida contra CFP-10 (cortesía del Dr. J.S. Spencer, Universidad del Estado de Colorado, Lote 12-5-00JS) o anticuerpo monoclonal anti-ESAT-6 HYB 076-08 (Gentofte, Dinamarca) a una dilución 1 : 200 en disolución estabilizadora PBS/leche descremada al 2 %. A continuación, se lavaron tres veces en una disolución de PBS-Tween 20 al 0,05 %²⁷ y se incubaron con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa diluidos 1 : 5000 (Promega). Las membranas se revelaron por incubación en H₂O₂ al 0,012 % disuelto en PBS en presencia de 3,3-diaminobenzidina (0,5 mg/mL).

Purificación de las proteínas recombinantes ESAT-6 y CFP-10

El sobrenadante de ruptura de sonicación, clarificado por centrifugación a 14 000 g a 4 °C por 40 min, fue sometido a una cromatografía de afinidad de quelatos metálicos empleando el sistema comercial de purificación Ni-NTA Sepharose® (IBA BioTAGnology), según las recomendaciones del fabricante. Se empleó imidazol (50 mmol/L) en la disolución de lavado y entre 100 y 250 mmol/L de imidazol para la elución de las proteínas de interés. La desalinización de las proteínas se realizó mediante el sistema de columnas PD-10 (GE Healthcare) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La concentración de proteínas totales en los extractos proteicos y eluatos cromatográficos fue determinada de acuerdo con el método de Bradford.³⁰ La predicción de tallas o porcentajes de pureza, se realizó por análisis de densitometría de imágenes mediante el programa bioinformático *GeneTools* de la compañía *SynGene*.

Preparación de las serotecas

Las muestras de sueros de 64 pacientes con diagnóstico confirmado de TB activa fueron colectadas en el Hospital Nacional de Neumología Benéfico Jurídico de La Habana, Cuba. Las edades de los pacientes oscilaron entre los 17 y 80 años. La enfermedad fue confirmada en todos los casos clínica, radiológica y microbiológicamente. A todos los enfermos, se les había realizado la prueba de la tuberculina y fueron vacunados con *M. bovis* BCG. El segundo grupo estuvo compuesto por un total de 143 sueros correspondientes a individuos sanos, sin historia previa de TB, vacunados con BCG, procedentes del Banco de Sangre del Municipio de Marianao, La Habana. Ambos grupos de sueros fueron conservados a -20° C.

ELISA

Se diseñó un sistema ELISA de tipo indirecto para la determinación de anticuerpos séricos anti-ESAT-6 y anti-CFP-10. Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de gran capacidad de acoplamiento (MaxiSorp NUNC™ Serving Life Science). Las placas fueron recubiertas con 100 μL de una disolución de CFP-10 y ESAT-6 a concentraciones finales de 1 y 2,5 μg/mL en disolución estabilizadora carbonato/hidrógenocarbonato de sodio, pH 9,6 por 16 h a 4 °C. Seguidamente, los sitios libres fueron bloqueados mediante la adición de 200 μL de una disolución de leche descremada al 3 o 5 % en disolución estabilizadora PBS-Tween20 0,05 % en cada pocillo. Posteriormente, 100 μL de los sueros por duplicado fueron diluidos 1 : 100 o 1 : 200 en disolución estabilizadora PBS-Tween 20 0,05 % - leche 3 % e incubados una hora a 37 °C. También se ensayaron las mismas diluciones de los sueros, pero cuando estos fueron neutralizados por preincubación durante 30 min a 37 °C con un extracto celular de *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS a 0,5 mg/mL de concentración final. Después de cuatro lavados con PBS-Tween 20 0,05 %, las placas fueron incubadas con 100 μL de una disolución de anticuerpo anti-IgG humano conjugado a peroxidasa (Promega) diluido 1 : 8000 o 1 : 10 000 por una hora a 37 °C en disolución estabilizadora PBS-Tween20 0,05 % - leche 3 %. Después de seis lavados de las placas, la reacción fue revelada con 100 μL de una disolución de *o*-fenilendiamina y H₂O₂, al 1,015 % por 15 min a 37 °C. La reacción fue detenida por adición de H₂SO₄ 2,5 mol/L. La determinación de la absorbancia de las placas fue realizada a 492 nm en un equipo Titertek Multiskan® PLUS. El valor de corte del ensayo se calculó mediante la suma de la media de la absorbancia de los sueros de individuos sanos más dos desviaciones estándar.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el paquete de programas Prism para Windows utilizando el método no paramétrico Mann-Whitney. La especificidad (E) y sensibilidad (S) del método, se definieron a partir de los individuos sanos y enfermos respectivamente, que fueron identificados como tales por el ELISA. Ambos indicadores fueron determinados mediante las expresiones siguientes:

$$S = \frac{\text{muestras positivas correctamente detectadas}}{\text{muestras positivas determinadas por el método de referencia}} \times 100$$

$$E = \frac{\text{muestras negativas correctamente clasificadas}}{\text{muestras negativas determinadas por el método de referencia}} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSION

Expresión y purificación de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 de *Mtb* en *E. coli*

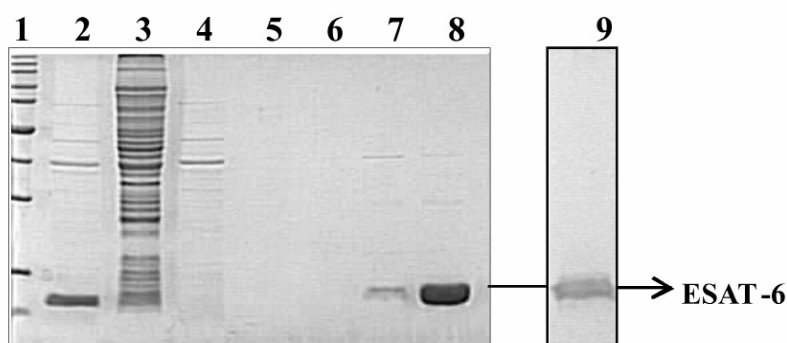
La TB pulmonar activa es una enfermedad contagiosa que contribuye considerablemente a la propagación de *Mtb*, razón por la cual es necesario la implementación de métodos de diagnóstico rápidos para su control y tratamiento. Varios estudios se han centrado en el desarrollo de ensayos de diagnóstico utilizando proteínas secretadas

por *Mtb* conocidas como antígenos inmunodominantes y biomarcadores de la TB.¹³⁻¹⁸ Dentro de ellas, las proteínas ESAT-6 y CFP-10 son conocidas como antígenos específicos de *Mtb* que están ausentes en BCG y en la mayoría de las micobacterias no patógenas. ESAT-6 y CFP-10 son antígenos capaces de levantar respuestas potentes de células T y recientemente se ha informado que ambas proteínas son secretadas al medio extracelular a través de un sistema especializado denominado ESX-1 o tipo VII, el cual es esencial para la virulencia de *Mtb*.¹⁹ Ambas proteínas son secretadas por *Mtb* en bajas cantidades y formando un complejo en proporciones 1 : 1. El estudio de este complejo se realizó con las proteínas recombinantes obtenidas a partir de *E. coli* y se detectó que su constante de disociación es muy baja (menor que 10^{-8} mol/L). Estos hallazgos han contribuido a que ambas proteínas recombinantes hayan sido utilizadas en métodos recientes como el ELISPOT y el QuantiFERON-TB, los cuales se fundamentan en la medición de la estimulación de la producción de IFN γ en células T.^{6,18}

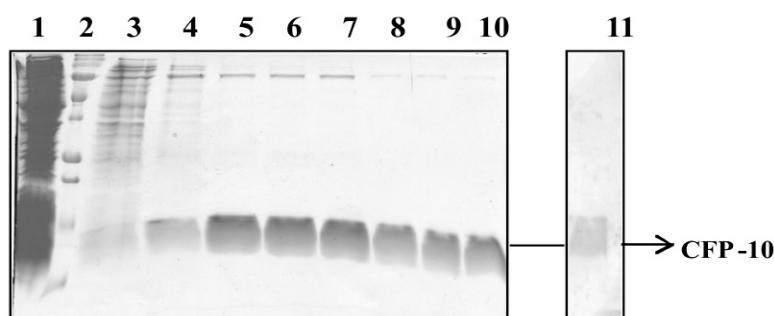
En este trabajo, la expresión de CFP-10 y ESAT-6 por las respectivas cepas de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS [pETcfp-10] y BL21(DE3)/pLysS [pETesat-6] fue analizada mediante SDS-PAGE y confirmada mediante *Western blotting*. Después de inducir su expresión, ambas proteínas fueron detectadas en la fracción soluble del citoplasma en las dos cepas analizadas. Los resultados de este trabajo sobre la expresión soluble de ESAT-6 por *E. coli* (Fig. 1A, carriles 2 y 3) difieren de los reportados, pues solo se ha informado sobre la detección insoluble de ESAT-6 en cuerpos de inclusión de *E. coli*.^{31,32} El estudio más exhaustivo fue el reportado por Wang y cols. (2005), en el que obtuvieron una preparación de elevada pureza (aproximadamente 100 %), aunque involucró la utilización de agentes caotrópicos fuertes como la urea (8 mol/L) o el hidrocloreuro de guanidina (6 mol/L) para la solubilización de los cuerpos de inclusión. Por ello fue necesario ejecutar un paso posterior de renaturalización *in vitro* para el repliegamiento adecuado de ESAT-6 en condiciones muy controladas.³¹ Solamente del 66 al 69 % de ESAT-6 fue satisfactoriamente renaturalizada como una proteína monomérica, el resto fue obtenido como agregados moleculares y poblaciones de moléculas modificadas.

La expresión soluble de ESAT-6 en el citoplasma de *E. coli* pudiera relacionarse con las condiciones utilizadas en la inducción de su expresión con concentraciones bajas del inductor (0,1 mmol/L) y temperaturas más bajas (28 °C) que las reportadas.^{31,32} A diferencia de ESAT-6, CFP-10 ha sido obtenida generalmente soluble en el citoplasma de *E. coli*, lo cual ha facilitado su purificación con una pureza y rendimientos similares a los obtenidos en este trabajo.^{32,33}

Las proteínas ESAT-6 y CFP-10 fueron purificadas en condiciones nativas mediante la cromatografía de afinidad por quelatos metálicos. ESAT-6 fue detectada en las fracciones correspondientes a 250 mmol/L de imidazol (Fig. 1A, carriles 7 y 8), mientras que CFP-10 eluyó en el intervalo de 100 a 250 mmol/L de imidazol (Fig. 1B, carriles 5-10). ESAT-6 fue detectada como una banda de aproximadamente 12 kDa en SDS-PAGE y CFP-10 tuvo un peso molecular



(A)



(B)

Fig. 1. Purificación de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 mediante cromatografía de afinidad de quelatos metálicos. A. Análisis de las muestras del proceso de purificación de ESAT-6 mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE al 15 % teñido con azul de Coomassie R-250. Carriles: 1) Patrón de peso molecular (10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 y 225 kDa). 2) Fracción soluble *E. coli* BL21 DE3 pLysS/pETesat6 inducida. 3) fracción insoluble *E. coli* BL21 (DE3)pLysS/pETesat6 inducida. 4) Fracción de proteínas no enlazadas al gel. 5) Fracción de lavado con 50 mmol/L imidazol. 6) Fracción de elución con 100 mmol/L imidazol. 7-8) Fracción de elución con 250 mmol/L imidazol. 9) Inmunodetección de ESAT-6 presente en la colecta de las fracciones después de la cromatografía. B. Análisis de las muestras del proceso de purificación de CFP-10 mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE al 15 % teñido con azul de Coomassie R-250. Carriles: 1) Fracción de proteínas no enlazadas al gel. 2) Patrón de peso molecular (10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 y 225 kDa). 3 y 4) Fracción de lavado con 50 mmol/L imidazol. 5 a 7) Fracción de elución con 100 mmol/L imidazol. 8 a 10) Fracción de elución con 250 mmol/L imidazol. 11) Inmunodetección de CFP-10 presente en la colecta de las fracciones después de la cromatografía.

aparente de 13 kDa. El proceso de purificación de ESAT-6 tuvo un rendimiento de 2,67 mg/L de cultivo y en el caso de CFP-10, el rendimiento fue mayor, (15 mg/L de cultivo) (Tabla 2). El análisis densitométrico realizado mostró que ESAT-6 y CFP-10 fueron purificadas con un intervalo de pureza entre 90 y 94 % (Tabla 2).

Tabla 2. Purificación de las proteínas recombinantes CFP-10 y ESAT-6 de *M. tuberculosis* a partir de *E. coli*.

Antígeno	Rendimiento (mg de proteína/L de cultivo)	Pureza (%)	Peso molecular aparente (kDa)	Pasos de purificación
CFP-10	15	92	13	1) sonicación 2) IMAC
ESAT-6	2,67	93,3	12	1) sonicación 2) IMAC

La concentración de proteínas totales en los extractos proteicos y eluatos cromatográficos fue determinada por el método de Bradford.³⁰ Los datos representan la media de tres purificaciones. La talla y pureza de las proteínas purificadas fue determinada mediante análisis de densitometría a geles de SDS-PAGE con el programa bioinformático GeneTools del sistema de documentación de geles *Gene Genius* de la casa comercial *Syngene* (UK). La sonicación fue realizada siguiendo un procedimiento estándar de acuerdo con lo descrito por Ausubel y cols.²⁷ IMAC Cromatografía de quelatos metálicos.

Ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos contra los antígenos recombinantes ESAT-6 y CFP-10

Teniendo en consideración que un ensayo serológico pudiera ser el método ideal para el diagnóstico de TB por su bajo costo, simplicidad y fácil implementación, los antígenos ESAT-6 y CFP-10 recombinantes fueron ensayados como una mezcla de proteínas de captura de anticuerpos IgG en un ensayo ELISA, el cual fue diseñado de tipo indirecto variando la concentración de los antígenos en el recubrimiento y la del agente bloqueador, así como realizando diluciones a los sueros humanos y al anticuerpo anti-IgG humano conjugado a la peroxidasa. La determinación de los niveles de anticuerpos contra la mezcla de las proteínas ESAT-6 y CFP-10, tanto en los sueros de pacientes aquejados de TB como en los individuos sanos vacunados con BCG, evidenció que la respuesta de los enfermos contra las proteínas recombinantes fue significativamente mayor que la de los sanos vacunados solamente cuando la concentración de las proteínas fue 2,5 µg/mL, la disolución estabilizadora de bloqueo fue utilizada al 5 %, los sueros fueron diluidos 1 : 100 y el conjugado 1 : 10 000 ($p < 0,05$) (Fig. 2).

Posteriormente, se procedió a evaluar el efecto de la neutralización de los anticuerpos reactivos contra proteínas de *E. coli* que pudiesen constituir contaminantes de las proteínas purificadas y pudieran contribuir al fondo de respuesta elevado en el ensayo de ELISA. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los sueros sin tratar y los neutralizados frente a las proteínas de *E. coli* ($p = 0,55$). Al no existir diferencias significativas entre las dos condiciones ensayadas, se desestimó utilizar los sueros neutralizados, ya que la neutralización consume tiempo y recursos.

El análisis de los resultados permitió establecer un valor de corte para el ensayo de 0,668 unidades de densidad óptica, a partir del cual se establecieron la especificidad y la sensibilidad. La especificidad fue del 97,18 %, lo cual indicó que esta prueba diagnóstica tiene una buena capacidad para detectar correctamente a los individuos sanos de los enfermos aquejados de TB. Sin embargo, la sensibilidad fue del 32 %, el cual es

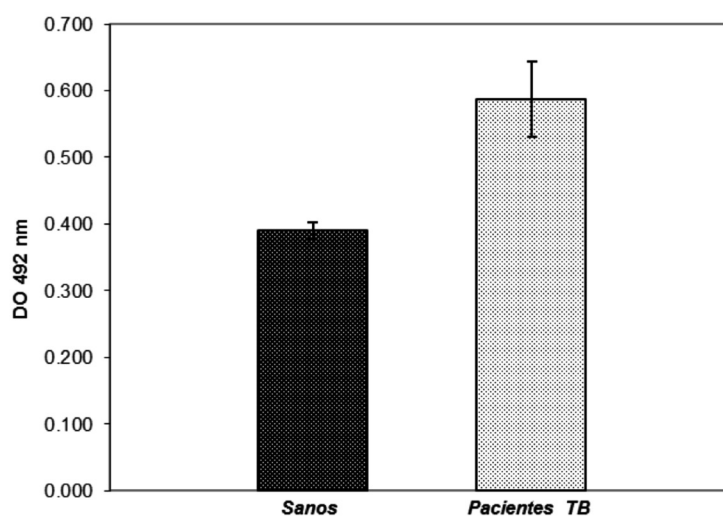


Fig. 2. Reactividad determinada por ELISA de los sueros de individuos sanos y enfermos de TB frente a una mezcla de los antígenos recombinantes ESAT-6 y CFP-10. Sueros de pacientes con TB ($n = 64$) y sanos ($n = 143$). Los datos se muestran como la media (barra) \pm el error estándar (barra de error). Representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

un valor bajo y permite inferir que no fue posible detectar todos los anticuerpos levantados contra las proteínas de *Mtb* en el suero de los pacientes aquejados de TB.

Estudios previos realizados con los antígenos ESAT-6 y CFP-10 recombinantes en el serodiagnóstico de la TB en otros países han mostrado especificidades y sensibilidades variables. Dentro de los estudios más recientes, se destaca el ELISA para el serodiagnóstico de la TB en China. Este estudio arrojó una especificidad del 73,8 % y una sensibilidad del 60,4 %.¹³ En otro estudio realizado en la India, donde la TB es endémica, se evaluaron independientemente las proteínas recombinantes ESAT-6 y CFP-10 y se obtuvieron sensibilidades del 64,9 % y 66 %, respectivamente y la especificidad fue similar para ambos antígenos (ESAT-6: 88,9 % y CFP-10: 85,2 %).¹⁴ De estos y otros estudios reportados, se hace notable que especificidad se comporta de acuerdo con la condición de que tanto ESAT-6 como CFP-10 son considerados antígenos específicos de *Mtb*.¹⁸⁻²⁰

Los resultados que han sido reportados en la última década sobre la sensibilidad de los estudios de serodiagnóstico, varían entre 23 y 83,8 %; mientras que la especificidad oscila entre 84 y 98 %.^{4,12-15,17,34} Lamentablemente, no existe hasta el momento ningún ensayo comercial que ofrezca valores aceptables de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la TB pulmonar activa. Las normas para el registro de los diagnosticadores requieren que sensibilidad y especificidad sean mayores del 85 % y 95 %, respectivamente.³⁵

De forma general, la sensibilidad de los ensayos serológicos es modesta cuando se utilizan mezclas de antígenos o poliproteínas y es generalmente baja cuando se utiliza un solo antígeno en el inmunoensayo.¹³⁻¹⁷ Por las razones antes mencionadas, la generalidad de los estudios de diagnóstico requieren que la colecta de los sueros de pacientes portadores de TB activa se realice de forma uniforme, con especial énfasis en que el enfermo no haya recibido tratamiento con medicamentos anti-tuberculosos. Sin embargo, en el presente estudio, los sueros de los pacientes aquejados de TB fueron colectados en diferentes etapas de la enfermedad y del tratamiento con las drogas antituberculosas, ya que en Cuba los individuos comienzan a recibir el tratamiento de manera preventiva desde el momento en que se sospecha la enfermedad. En este particular, ha sido reportado que los títulos de anticuerpos disminuyen con el tratamiento de antibióticos,¹⁵ efecto que pudo estar presente en el grupo de pacientes que sufren TB y que puede influir en el valor real de la sensibilidad del ensayo.

Es importante destacar que la contribución de la respuesta inmune mediada por anticuerpos en la protección contra la TB es un tema que ha sido muy debatido. Sin embargo, en los últimos años se ha esclarecido que la exposición al *Mtb* provoca la formación de anticuerpos contra los antígenos y estos pueden ser utilizados como marcadores en la protección y detección de la enfermedad. Se ha descrito que las respuestas de anticuerpos a antígenos de *Mtb* son muy heterogéneas entre individuos y varía de forma importante de un individuo a otro, de una región o país a otro.^{7,13-14}

A pesar de que la sensibilidad del ensayo fue baja, este trabajo realiza contribuciones al conocimiento del comportamiento de la respuesta de anticuerpos frente a proteínas de *Mtb* en la población cubana. Además, constituye el primer reporte de la obtención de una mezcla de antígenos específicos de *Mtb* por vía recombinante para su evaluación en el serodiagnóstico de TB en Cuba. Anteriormente, en 2004, se evaluó el antígeno APA de *Mtb* para el serodiagnóstico de TB en una población cubana. El método presentó una especificidad del 86 % y una sensibilidad del 39 %. La baja sensibilidad obtenida fue explicada por la presencia de anticuerpos generados por el antígeno nativo durante la infección natural que no son detectados cuando se emplea el antígeno APA recombinante, el cual no posee los residuos glicosilados de la proteína APA nativa.³⁴

Dada la importancia que tiene el establecimiento de un método de diagnóstico confiable, rápido y sensible para la TB activa en Cuba y para la comunidad internacional, actualmente los esfuerzos para darle continuidad a este trabajo están encaminados a la recolección de sueros de individuos con síntomas de TB activa antes de recibir el tratamiento con medicamentos anti-tuberculosos, con la finalidad de utilizar el método en las condiciones para las cuales fue diseñado y en las que sería usualmente utilizado.

También sería interesante obtener las proteínas nativas ESAT-6 y CFP-10 de *Mtb* para su utilización como antígenos de captura del sistema ELISA con el propósito de evaluar la respuesta humoral de la población cubana frente a los dos antígenos nativos de *Mtb* y compararla a la obtenida frente a los antígenos recombinantes. De esta forma, se contribuiría al estudio de la respuesta humoral de la población cubana frente a antígenos inmunodominantes de *Mtb* y se estimaría el porcentaje de equivalencia de los antígenos recombinantes obtenidos en este trabajo respecto a los nativos.

De acuerdo con los resultados reportados, una posible estrategia para incrementar la sensibilidad de los métodos serológicos pudiera ser la inclusión en la mezcla de otros antígenos inmunogénicos de *Mtb*, que se han utilizado frecuentemente en otros estudios como recombinantes del complejo Ag85, MTB48 y el de 38 kDa. De este último, se ha descrito que los anticuerpos que lo reconocen se encuentran frecuentemente en pacientes que padecen de TB.¹⁵

CONCLUSIONES

Las proteínas ESAT-6 y CFP-10 de *Mtb* fueron expresadas satisfactoriamente en la fracción soluble de *E. coli*, lo cual facilitó su purificación en condiciones nativas mediante la cromatografía de afinidad por quelatos metálicos. Ambos antígenos fueron purificados con una pureza adecuada, entre el 90 y 94 %, para la posterior evaluación de su potencialidad en el serodiagnóstico de la TB en una población cubana. La evaluación de los dos antígenos recombinantes, como una mezcla de captura, para el reconocimiento de anticuerpos anti-ESAT-6/CFP-10 presentes en sueros de individuos cubanos evidenció que la respuesta de anticuerpos en los enfermos de TB contra ESAT-6 y CFP-10 fue significativamente mayor que la de los sanos vacunados con BCG. El método presentó una especificidad del 97,18 % y una sensibilidad del 32 %, la cual pudiera estar afectada por el tratamiento con medicamentos antituberculosos que recibían los enfermos de TB, dado que generalmente los títulos de anticuerpos disminuyen con este tratamiento. Este indicador pudiera incrementarse a través de la inclusión de otros antígenos inmunogénicos de *Mtb* en la mezcla, considerando el carácter heterogéneo de la respuesta humoral de los pacientes portadores de TB.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kesavan AK, Brooks M, Tufariello J, Chan J and Manabe YC. Tuberculosis genes expressed during persistence and reactivation in the resistant rabbit model. *Tuberculosis*. 2009;89:17-21.
2. Araujo Z, Acosta M, Escobar H, Baños R, Fernández de Larrea C and Rivas-Santiago B. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico. *Revisión. Invest. Clin.* 2008;49:411-441.
3. McNerney R, Wondafrash BA, Amena K, Tesfaye A, McCash EM and Murray NJ. Field test of a novel detection device for *Mycobacterium tuberculosis* antigen in cough. *BMC Infectious Diseases*. 2010;10:161-167.
4. Verma RK and Jain A. Antibodies to mycobacterial antigens for diagnosis of tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;51:453-461.
5. Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. Anuario Estadístico de Salud en Cuba. Incidencia de algunas enfermedades de declaración obligatoria. 2005.
6. Prisco J and Bocanegra-García V. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. *Arch Bronconeumol.* 2007;43:225-32.
7. Rao PVR, Murthy MK, Basirudeen S, Sharma P, Swaminathan S and Raja A. Improved diagnosis of tuberculosis in HIV-positive patients using RD1-encoded antigen CFP-10. *International Journal of Infectious Diseases*. 2009;13:613-622.
8. Clare HS, Pickard D, Clark SO, Kelly DLE, Ghany MA, Hale C, Dietrich J, Andersen P, Marsh PD and Dougan G. Characterization of a live *Salmonella* vaccine stably expressing the *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-ESAT6 fusion protein. *Vaccine*. 2009;27:6894-6904.
9. Roupie V, Romano M, Zhang L, Korf H, Lin MY, Franken K, Ottenhoff T, Klein MR and Huygen K. Immunogenicity of eight dormancy (DosR) regulon encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA vaccinated and TB infected mice. *Infect. Immun.* 2007;75:941-949.
10. Walzl G, Ronacher K, Siawaya JFD, Dockrell HM. Biomarkers for TB treatment response: Challenges and future strategies. *Journal of Infection*. 2008;57:103e109.
11. Codecasa L, Mantegani P, Galli L, Lazzarin A, Scarpellini P and Fortis C. An In-House RD1-Based Enzyme-Linked Immunospot-Gamma Interferon Assay Instead of the Tuberculin Skin Test for Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44:1944-1950.
12. Imaz MS, Schmelling ME, Kaempfer S, Spallek R and Singh M. Serodiagnosis of Tuberculosis: Specific Detection of Free and Complex-Dissociated Antibodies Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Recombinant Antigens. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2008;3:234-244.
13. Wu X, Yang Y, Zhang J, Li B, Liang Y, Zhang Ch *et al.* Humoral Immune Responses against the *Mycobacterium tuberculosis* 38-Kilodalton, MTB48, and CFP-10/ESAT-6 Antigens in Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010;17:372-375.
14. Kumar G, Kumar P, Kumar P, Shankar H, Yadav VS, Katoch VM *et al.* Serodiagnostic Efficacy of *Mycobacterium tuberculosis* 30/32-kDa Mycolyl Transferase Complex, ESAT-6, and CFP-10 in Patients with Active Tuberculosis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2010;58:57-65.
15. Steingart KR, Dendukuri N, Henry M, Schiller I, Nahid P, Hopewell PC, Ramsay A, Pai M, and Laal S. Performance of Purified Antigens for Serodiagnosis of Pulmonary Tuberculosis: a Meta-Analysis. *Clinical Vaccine Immunology*. 2009;16:260-276.
16. Goletti D, Vincenti D, Carrara S, Butera O, Bizzoni F, Bernardini G. *et al.* Comparison of a Gamma Interferon Whole-Blood Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and an Enzyme-Linked Immunospot Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2005;12:1311-1316.
17. Weldingh K, Rosenkrands I, Okkels LM, Doherty TM and Andersen P. Assessing the Serodiagnostic Potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* Proteins and Identification of Four Novel Serological Antigens. *J. Clinical Microbiol.* 2005;43:57-65.
18. Bottai D and Brosch R. Mycobacterial PE, PPE and ESX clusters: novel insights into the secretion of these most unusual protein families. *Mol. Microbiol.* 2009;73:325-328.
19. Abdallah AM, van Pittius NCV, DiGiuseppe PA, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CJE *et al.* Type VII secretion — mycobacteria show the way. *Nature reviews microbiology*. 2007;5:883-891.
20. Philipp WJ, Nair S, Guglielmi G, Lagranderie M, Gicquel B, Cole ST. Physical mapping of *Mycobacterium bovis* BCG pasteur reveals differences from the genome map of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and from *M. bovis*. *Microbiol.* 1996;142:3135-45.
21. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol. Microbiol.* 2002;46:709-717.
22. Romano M, Rindi L, Korf H, Bonanni D, Adnet P, Juriona F, Garzelli C and Huygen K. Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis subunit vaccines expressing PPE44 (Rv2770c). *Vaccine* 2008;26:6053-6063.
23. Vallin C, Ayala JC, Garcia-Rivera D, Jones J, Rodríguez C, González L, Hernández I, Pimienta E, Vila A, Sarmientos ME, Acosta A, Anné J and Mellaert L. Immune response to *Streptomyces lividans* in mice: A potential vaccine vehicle against TB. *The Open Vaccine Journal*. 2009;2:85-91.
24. Romano M, Aryan E, Korf H, Bruffaerts N, Franken CL, Ottenhoff TH and Huygen K. Potential of *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factors as antigens in novel tuberculosis sub-unit vaccines. *Microbes Infect.* 2012;14:86-95.
25. Weinreich A, Van Pinxteren L, Meng L, Rasmussen P, Andersen P. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of Antigen 85B and ESAT-6. *Infection and Immunity*. 2001;69:2773-2778.
26. Goletti D, Vincenti D, Carrara S, Butera O, Bizzoni F, Bernardini G, *et al.* Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunospot assay. *Clin Diag Lab Immunol.* 2005;12:1311-6.
27. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG y cols. *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: John Wiley and Sons, 1994.
28. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 1970;227:680-685.
29. Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:4350-4354.
30. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
31. Wang BL, Xu Y, Wu Ch, Xu Y and Wang H. Cloning, expression, and refolding of a secretory protein ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expression and Purification*. 2005;39:184-188.
32. Meher AK, Bal N CH, Chary KVR and Arora A. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ESAT-6-CFP-10 complex formation confers thermodynamic and biochemical stability. *FEBS Journal*. 2006;273:1445-1462.
33. Okkels LM, Muller E, Schmid M, Rosenkrands I, Kaufmann SHE, Andersen P and Jungdblut PR. CFP10 discriminates between nonacetylated and acetylated ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* by differential interaction. *Proteomics*. 2004;4:2954-2960.
34. Ramos A, Jones J, Izquierdo LA, del Sol R, Milanés MT, Rodríguez C and Vallin C. Assessment of serodiagnostic potential value for tuberculosis in Cuba of APA 45/47 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2004;35:83-87.
35. Thielmann K. *Principios de Metodología en Bioquímica Clínica*. La Habana: Editorial Instituto Cubano del Libro. 1973.