

ANTICUERPOS CONTRA LAS PROTEÍNAS 38 KDA Y 16 KDA EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS

Dra. Berta Elvia Cocotle Ronzón, Dr. Armando Méndez Pérez,
Quím. Clín. Nilda Alejandra Ramírez Rivera, Dr. José Arenas Benhumea
Departamento de Investigación de la Facultad de Medicina Xalapa.
Universidad Veracruzana.

Resumen:

Objetivos. Comparar el nivel de anticuerpos contra los antígenos de 16 y 38 kDa del *Mycobacterium tuberculosis* en personas con la enfermedad y sanas.

Material y métodos. Por ELISA se determinó el nivel de anticuerpos contra los antígenos de 16 y 38 kDa del *Mycobacterium tuberculosis* en 50 personas sanas y en 150 pacientes con tuberculosis.

Resultados. Los anticuerpos contra los antígenos de 16 y 38 kDa del *Mycobacterium tuberculosis* muestran elevación en mayor porcentaje en la sangre de los pacientes con la enfermedad que en los controles sanos. En el grupo control, los anticuerpos se encontraron elevados en una persona en la que posteriormente se demostró la enfermedad clínica.

Conclusiones. El estudio de los anticuerpos contra los antígenos de 16 y 38 kDa del *Mycobacterium tuberculosis* constituyen una herramienta diagnóstica útil para detectar tempranamente la presencia de la enfermedad y para evaluar la respuesta del paciente al tratamiento administrado

Palabras Clave: Tuberculosis, antígenos, anticuerpos, 38kDa, 16kDa, ELISA.

Introducción

La Tuberculosis es quizá la enfermedad más antigua que afecta a la humanidad, es causada por el *Mycobacterium tuberculosis* que es un microorganismo intracelular ácido alcohol resistente. A pesar de que existe un tratamiento específico y se emplea una vacuna para su prevención, la enfermedad continúa afectando a un gran número de personas; un tercio de la población mundial, 2,000,000,000 de personas está infectado con el *Mycobacterium tuberculosis*; de los cuales 16 millones tienen la enfermedad activa.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente se presentan a nivel mundial de 8 a 10 millones de nuevos casos (95% de ellos en países en desarrollo), de los cuales de 2 a 3 millones fallecen ^{1, 2}. Es considerada por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta como una enfermedad reemergente asociada a factores como la aparición de cepas resistentes del *Mycobacterium*, empleo de tratamientos incompletos, aumento de los grupos de riesgo, incremento en la epidemia de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, debilitamiento de los programas epidemiológicos y una susceptibilidad genética vinculada al gen Nramp-1.

El diagnóstico de la enfermedad evita el contagio y la diseminación al iniciarse el tratamiento específico. A pesar de contar con múltiples pruebas para el aislamiento e identificación del *Mycobacterium*, el diagnóstico de la enfermedad se dificulta debido al número de órganos que afecta, y esto provoca que los signos y síntomas sean variados e inespecíficos, a lo cual se agrega el lento crecimiento de la bacteria, lo que retarda su identificación.

El *Mycobacterium* produce, en el organismo humano durante la infección, una respuesta inmune de tipo celular debido a que posee en su estructura más de 1,000 sustancias antigénicas (proteínas, lipoproteínas y enzimas) que se han empleado para su identificación con técnicas como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) que determina la reacción antígeno anticuerpo, y con ello se realiza el diagnóstico de la enfermedad en corto tiempo.

Dentro de los antígenos del *Mycobacterium* empleados para el diagnóstico se encuentran el 38 kDa y el 16 kDa; el primero es una lipoproteína extracelular que es el más potente inmunógeno de la bacteria y es considerada específica para la enfermedad activa, mientras que el segundo es una proteína de la superficie que se utiliza para la detección precoz de la enfermedad, y su presencia se ha asociado con la enfermedad activa.

En este trabajo se comparó la presencia de anticuerpos contra los antígenos de 38 y 16 kDa del *Mycobacterium* en pacientes tuberculosos y en personas sanas para evaluar su utilidad diagnóstica.

Material y métodos

Se realizó un estudio prospectivo, transversal, comparativo, en el departamento de Investigación de la Facultad de Medicina de Xalapa de la Universidad Veracruzana de agosto de 1999 a diciembre del año 2000. Se incluyeron para el estudio 150 muestras de pacientes con tuberculosis con diferente expresión clínica obtenidas de manera multicéntrica en las instituciones de salud de la región, que son Secretaría de Salud (SSA), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), y 50 muestras de pacientes considerados sanos. Como criterios de inclusión para el grupo de estudio se requirió de que tuvieran signos y síntomas de la enfermedad y aislamiento del *Mycobacterium* independientemente de la edad y el sexo. Una vez establecido el diagnóstico de tuberculosis, se solicitó al paciente su consentimiento para ser incluido en el estudio, para lo que firmó la carta de aceptación, posterior a lo cual se tomó por punción venosa una muestra de 7 mililitros de sangre, la cual se recolectó en tubos de ensayo de cristal con tapón y con un contenido de 300 microlitros de Ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 150 milimolar, los cuales se identificaron con el

nombre, edad del paciente, número progresivo y grupo al que pertenece.

La muestra de sangre se centrifugó durante 5 minutos a 3,500 revoluciones por minuto, para separar el plasma que se almacenó en tubos eppendorf a -70°C .

Una vez obtenidas todas las muestras, el plasma se descongeló a temperatura ambiente para realizarle la detección de anticuerpos contra los antígenos de 16 y 38 kDa del *Mycobacterium tuberculosis* por medio de la técnica de ELISA.

El grupo control se constituyó de testigos obtenidos del personal médico y paramédico del Laboratorio Estatal de Referencia de Tuberculosis (LEDIRET) y del Hospital General de Zona "Dr. Luis F. Nachón", y de donadores de banco de sangre a los que después de la historia clínica y la exploración física, realizadas por un médico, se consideraron como sanos y en los que no existían factores de riesgo para el desarrollo de Tuberculosis. Posteriormente se solicitó su inclusión en el estudio y, en caso afirmativo, firmaron la hoja de aceptación; se les extrajo una muestra de 7 mililitros al momento de extraer la sangre para la donación, a la que se le realizó el mismo procedimiento que la muestra de los pacientes del grupo de estudio.

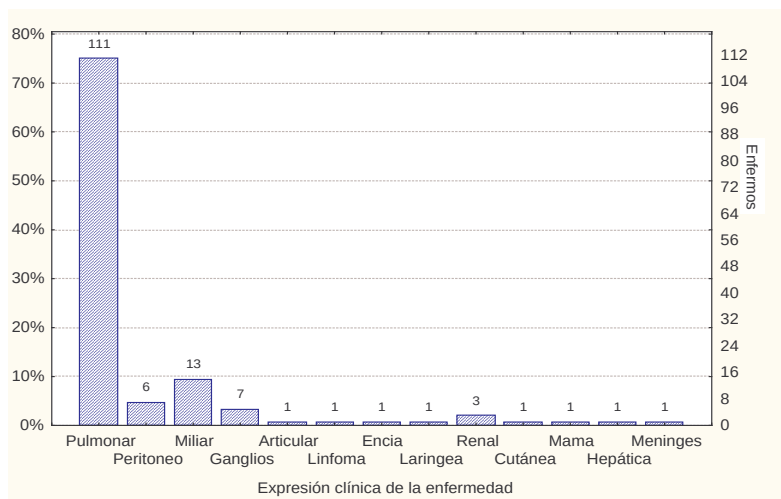
El método de ELISA emplea un anticuerpo o antígeno conjugado con una enzima, que reacciona con un sustrato, y forma un producto de reacción colorimétrico, el cual se observó por medio de un espectrofotómetro de marca multiskan labsystem. Los antígenos de 16 y 38 kDa empleados en el estudio fueron elaborados y donados por el Instituto Finlay de La Habana, Cuba.

Resultados

Se incluyeron para el estudio 150 muestras de pacientes con tuberculosis con diferente expresión clínica obtenidas de manera multicéntrica en las instituciones de salud de la región, que son Secretaría de Salud (SSA), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Instituto de Seguridad Social al Servicio

de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), y 50 muestras de pacientes considerados sanos. De las 150 muestras incluidas, 2 fueron descartadas por dificultades en la identificación. La edad del primer grupo varió de 5 a 80 años de edad, y en el segundo

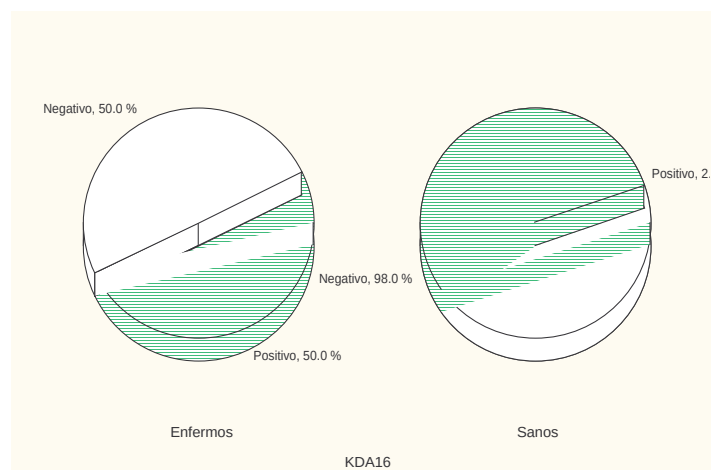
grupo varió de 18 a 57 años de edad. La distribución por sexo correspondió en el grupo de enfermos a 77 masculinos (53%) y 71 femeninos (47%); mientras que en el grupo de sanos correspondió a 9 femeninos (18%) y 41 masculinos (82%).



Gráfica 1. Se muestra la cantidad y el porcentaje de cada expresión clínica encontrada en el estudio. Se observa que se expresa en mayor porcentaje a nivel pulmonar.

Se encontraron diferentes expresiones clínicas de la enfermedad: 111 pulmonares (75%), 7 peritoneales (4.7%), 14 miliars (9.5%), 5 ganglionares (3.4%), 1 articular

(0.7%), 1 linfoma (0.7%), 1 gingival (0.7%), 1 laríngea (0.7%), 3 renales (2%), 1 cutánea (0.7%), 1 mamaria (0.7%), 1 hepática (0.7%) y 1 meníngea (0.7%). Gráfica 1.



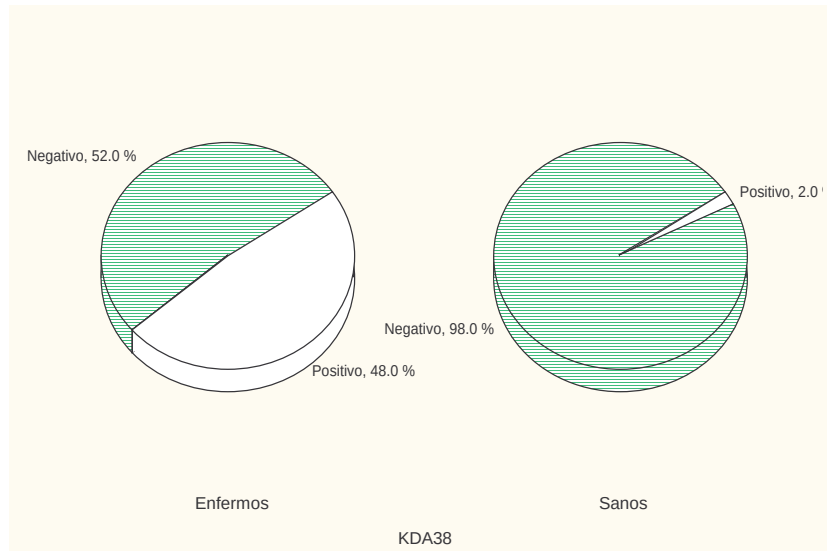
Gráfica 2. Positividad al antígeno de 16 kDa al comparar los enfermos de tuberculosis con los controles sanos.

Los niveles de anticuerpos contra los antígenos de 16 y 38 kDa fueron mayores en

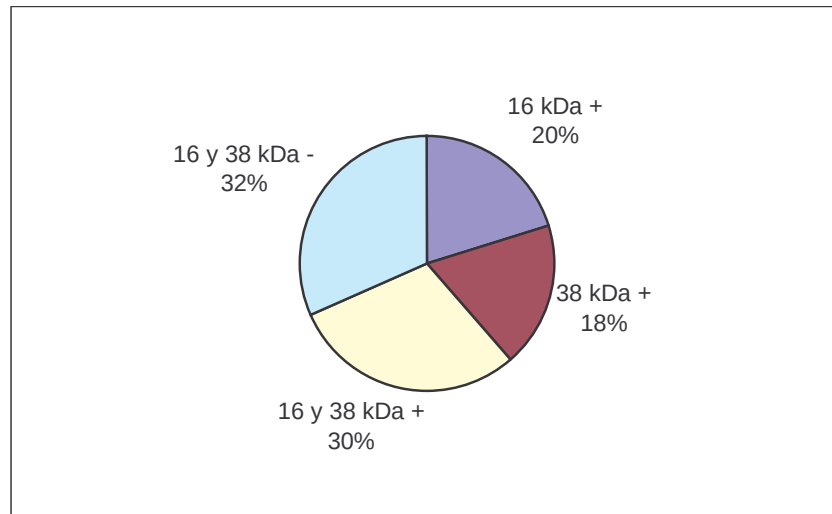
el grupo de enfermos; el nivel de 16 kDa se encontró elevado en el 50% de los enfermos

(Gráfica 2), mientras que el nivel de 38 kDa estuvo elevado en el 48% de los casos (Gráfica 3). De los controles, 49 salieron

negativos a las proteínas 16 y 38kDa (98 %) y sólo uno salió positivo a ambas proteínas (2%). Gráficas 2, 3.



Gráfica 3. Positividad al antígeno de 38 kDa al comparar los enfermos de tuberculosis con los controles sanos.



Gráfica 4. Se muestra el porcentaje de positividad a los antígenos *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes enfermos.

Los anticuerpos contra los antígenos de 16 y 38 kDa del *Mycobacterium* mostraron elevación en la sangre de pacientes con la enfermedad; se observó que 30 muestras (20%) fueron positivas al antígeno de 16 kDa, (16 kDa +), 27 (18%) fueron positivas a la proteína de 38 kDa, (38 kDa +), mientras que 44 muestras (30%) fueron positivas a ambas proteínas (16 y 38 kDa +) y 47 (32%) fueron negativas a ambas proteínas (16 y 38 kDa -). Gráfica 4.

Discusión y conclusión

La tuberculosis es un problema importante de salud pública, que afecta a un tercio de la población mundial; a pesar de existir múltiples estudios de diagnóstico, continúa diagnosticándose en forma tardía. En este estudio, la expresión clínica principal en las muestras obtenidas en la región de Xalapa es la pulmonar, aunque se halló que también existe la enfermedad en otras localizaciones, lo que se explica por la afinidad que presenta el bacilo por el oxígeno.

En este trabajo, se analizó la utilidad de los anticuerpos contra los antígenos de 16 y 38 kDa como metodología diagnóstica. Se ha mencionado que los anticuerpos dirigidos contra el antígeno de 38 kDa se presentan en un alto porcentaje de pacientes con tuberculosis, y tiene una alta especificidad para la enfermedad activa;^{7, 8} además de que la mayoría de pacientes producen anticuerpos contra el antígeno de 38 kDa, mientras que en los controles sanos no se encuentra. Estos datos concuerdan con los hallazgos de este estudio, ya que el porcentaje de casos positivos dentro del grupo de enfermos fue mucho mayor que los encontrados en el grupo control, lo que nos habla de la utilidad durante la presencia de la enfermedad activa.
4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 14

Los niveles de anticuerpos contra el antígeno de 16 kDa estuvieron más elevados, en un porcentaje mayor, dentro del grupo de enfermos que dentro de los integrantes del grupo control, lo cual concuerda con reportes previos que han mencionado su elevación en

casos de enfermedad activa o en caso de recaída, o cuando el bacilo se vuelve resistente a los antifímicos.^{13, 14}

Aunque en el grupo de enfermos se encontró mayor positividad a los anticuerpos contra los antígenos, no todos los casos la presentaron, lo que se explica porque, en su mayor parte, los pacientes se encontraban recibiendo tratamiento antifímico de duración no determinada. Se ha observado que en los pacientes que tienen la enfermedad activa y se encuentran en tratamiento, la positividad a los antígenos disminuye por inactivación del genoma del *Mycobacterium*, lo que propicia una disminución en la transducción y transcripción, en el bacilo, para la síntesis del antígeno de 16 kDa, el cual se depleta y no se detecta; esto es un buen signo para el seguimiento y éxito en el tratamiento, y en este caso explica porque las proteínas se encuentran por debajo de lo esperado.

En este estudio, se encontró que en las muestras de los controles sanos se detectó la presencia de ambos antígenos en un porcentaje mucho menor que en los enfermos de tuberculosis. En la persona en la que se encontró la positividad a ambos antígenos, los estudios posteriores permitieron diagnosticar la enfermedad activa. Esto concuerda con lo reportado previamente: que se muestra elevación de los anticuerpos contra el antígeno de 16 kDa en respuesta a la infección aun sin que la tuberculosis sea clínicamente aparente, por lo que se considera como un marcador temprano de enfermedad.

Con base en lo anterior nos permitimos considerar a estos anticuerpos como una medida de diagnóstico precoz de la enfermedad, cuya utilidad servirá para establecer el tratamiento oportuno, con lo que se disminuirá la transmisibilidad y se permitirá lograr un seguimiento del paciente, tanto en su respuesta a la terapéutica como en la detección en forma temprana de la aparición de resistencia del *Mycobacterium* a los antifímicos.

El estudio de los anticuerpos contra las proteínas de 16 y 38 kDa del *Mycobacterium tuberculosis* constituye una herramienta diagnóstica útil para detectar tempranamente la presencia de la enfermedad y para evaluar la respuesta del paciente al tratamiento administrado.

Agradecimientos:

Dr. Guillermo Rodríguez Magaña del banco de sangre del Hospital General de Zona "Dr. Luis F. Nachón" y Q. C. José Hernández Cruz, del LEDIRET, por su ayuda en la obtención de las muestras sanguíneas.

Bibliografía

1. Nature. 2000; 403 (6771): 687
2. Maher D. "Letters to editor". The Lancet. 344; 1994: 610.
3. Tuberculosis. Sociedad Iberoamericana de Información científica (SIIC). Consejo de Dirección. relacien@siicsalud.com. 1998.
4. Behr MA, Wilson MA, Salamon H, Gill WP, Schoolnik GK, Rane S, Small PM Science 1999; 284: 1520–1523.
5. Chang Z, Primm TP, Jakan J, Lee IH, Serysheva I, Chiu W, Gilbert HF, Quijcho FA Journal of biological chemistry. 271; 12:
6. Murray P. Mycobacterium. En: Murray P, et al. Manual of clinical microbiology. 1999. 17ª edición. 370–421.
7. Rojas EO. "Desarrollo de inmunógenos y vacunas contra Lepra y Tuberculosis". En: Cabrera CR. Vacunas. 2000. 249 – 260.
8. Vordermeier HM, Harris DP, Roman E, Lathigra R, Moreno C Ivanyi J. The journal of Immunology, 1991; 147: 1023 – 1029
9. Kadiva GB, Charapas SV, Hussong D. "Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of the 38 kDa antigen isolated from *Mycobacterium tuberculosis*". J Immunol. 1987; 139: 2447 – 2451.
10. Xiaojin Z, Stauss HJ, Ivanyi J, Vordermeier HM. International Immunology, 1997. 9; 11: 1669-1676.
11. Gururaj VK, Sotiros DCh, Hussong D. Journal of immunology. 1987. 139; 7: 2447-2451.
12. Harboe M, Wiker HG The Journal of Infectious Diseases. 1992; 166: 874 – 884.
13. Kadival GJ, Chaparas SD, Hussong D. The Journal of Immunology, 1987, 139: 2447 – 2451.
14. Ramírez RA, Cocotle RB, Méndez PA, Arenas BJ. "*Mycobacterium tuberculosis*: Su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa". Rev Med UV. 2002. 2; 2: 36-40.