

UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA
Departament de Genética i de Microbiologia
Facultat de Ciències

**Desenvolupament i avaluació d'un enzim
immunoassaig per al diagnòstic serològic de la
tuberculosi, utilitzant antígens glicolipídics.**

**Estudi comparatiu amb 9 kits
serològics comercialitzats.**

Esther Julián Gómez
2002

Índex	1
Presentació	5
Acrònims	7
INTRODUCCIÓ	11
A.1 LA MALALTIA TUBERCULOSA	11
A.1.1 Història i epidemiologia.....	11
A.1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
A.1.2.1 Característiques generals.....	16
A.1.2.2 Components de la paret cel·lular	16
A.1.2.2.1 Lípids	18
A.1.2.2.2 Glicolípidis	18
A.1.3 Immunopatologia.....	23
A.1.3.1 Infecció i malaltia.....	23
A.1.3.2 Resposta cel·lular	25
A.1.3.3 Resposta humoral.....	27
A.1.3.4 Relació amb el VIH.....	28
A.1.4 Diagnòstic.....	29
A.1.4.1 Característiques d'un test	29
A.1.4.2 Diagnòstic de la infecció.....	31
A.1.4.2.1 Test tuberculínic	31
A.1.4.2.2 Producció d'IFN- <i>in vitro</i>	33
A.1.4.3 Diagnòstic de la malaltia.....	35
A.1.4.3.1 Diagnòstic clínic	35
A.1.4.3.2 Diagnòstic microbiològic.....	36
A.1.4.3.2.1 Tinció.....	36
A.1.4.3.2.2 Aïllament	37
A.1.4.3.2.3 Identificació de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
A.2 DIAGNÒSTIC SEROLÒGIC	41
A.2.1 Potencial i interès	41
A.2.2 Tipus d'assajos	43
A.2.3 Detecció de diferents immunoglobulines.....	47
A.2.3.1 Immunocomplexos	47
A.2.3.2 Detecció d'IgM o IgA.....	48
A.2.4 Tipus d'antígens.....	49
A.2.4.1 Semipurificats i extractes crus	49
A.2.4.2 Purificats.....	50
A.2.4.2.1 Proteics i proteïnes recombinants	50
A.2.4.2.2 Glicolípidics i lipoglicans	52
A.2.4.2.2.1 CF.....	52
A.2.4.2.2.2 DAT.....	53
A.2.4.2.2.3 LAM.....	55

A.2.4.2.2.4 LOS	56
A.2.4.2.2.5 PGL	56
A.2.4.2.2.6 PIM.....	57
A.2.4.2.2.7 SL-I.....	57
A.2.4.2.2.8 TAT	58
A.2.4.2.2.9 Barreja de glicolípidis.....	59
A.2.5 Tests serològics comercialitzats	59
A.2.5.1 Els ELISA.....	62
A.2.5.1.1 Anda-TB	62
A.2.5.1.2 Tuberculosis IgA EIA.....	62
A.2.5.1.3 Pathozyme kits	64
A.2.5.1.4 Detect-TB	64
A.2.5.1.5 Anti-TBGL antibodies assay kit	65
A.2.5.2 Els DOT	65
A.2.5.2.1 MycoDot™ test	65
A.2.5.3 Immunocromatografies	66
A.2.5.3.1 ICT Tuberculosis diagnostic kit.....	66
A.2.5.3.2 Rapid Test TB.....	68
B. OBJECTIUS	71
C. RESULTATS I DISCUSSIÓ	75
C.1 DESENVOLUPAMENT D'UN ENZIM IMMUNOASSAIG PER A ANTÍGENS GLICOLIPÍDICS PURIFICATS DE LA PARET DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> (ARTICLE IV)	77
C.1.1 Solvent, tampó, concentració d'antigen i dilució d'anticossos.....	77
C.1.2 Bloquejador.....	79
C.1.3 Influència del detergent.....	80
C.2 DETECCIÓ D'IMMUNOGLOBULINA G, IGM I IGA ENFRONT DELS ANTÍGENS GLICOLIPÍDICS (ARTICLES V I VI)	81
C.2.1 Preabsorció d'IgG sèrica.....	85
C.3 RESULTATS AMB TESTS COMERCIALIZATS (ARTICLES I, II, III, I VI)	85
C.3.1 Antígens lipoglicans (LAM) (article D)	86
C.3.2 Antígens semipurificats-sonicats	87
C.3.2.1 A60	87
C.3.2.2 Kp-90 (articles II i III)	92
C.3.3 Antígens proteics (article VI).....	93
C.4 COMBINACIÓ DE TESTS (ARTICLE VI).	97
C.4.1 Diferents immunoglobulines.....	97
C.4.2 Diferents antígens	10
0	
C.5 ARTICLES	104
I. Julián, E.; Matas, L.; Ausina, V.; Luquin, M. (1997) "Detection of lipoarabinomannan antibodies in patients with newly acquired	

tuberculosis and patients with relapse tuberculosis". <i>Journal of Clinical Microbiology</i> . 35 (10): 2663-2664.....	106
II. Julián, E.; Matas, L.; Hernández, A.; Alcaide, J.; Luquin, M. (2000) "Evaluation of a new serodiagnostic tuberculosis test based on the immunoglobulin A detection against Kp-90 antigen". <i>International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases</i> . 4 (11): 1082-1085.....	110
III. Julián, E.; Luquin, M. (2001) "Serological diagnosis of tuberculosis using IgA detection against the mycobacterial Kp-90 antigen (letter)". <i>International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases</i> 5 (6): 585-586.....	116
IV. Julián, E.; Cama, M.; Martínez, P.; Luquin, M. (2001) "An ELISA for five glycolipids from the cell wall of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : Tween 20 interference in the assay". <i>Journal of Immunological Methods</i> . 251 (1): 21-30.	
V. Julián, E.; Matas, L.; Pérez, A.; Alcaide, J.; Lanéelle, M.A.; Luquin, M. "Potential Role of IgA / SL-I Test for the Serodiagnosis of Tuberculosis. Comparison with IgG and IgM Responses and DAT, TAT and CF Antígenos". [presentat al <i>Journal of Clinical Microbiology</i>].....	132
VI. Julián, E.; Matas, L.; Alcaide, J.; Luquin, M. "Combination of purified glycolipids and proteins improve the serological diagnosis of tuberculosis". [presentat al <i>Journal of Infectious Diseases</i>].....	148
D. CONCLUSIONS	167
E. BIBLIOGRAFIA	171
F. ANNEX	192
VII. Muñoz, M.; Luquin, M.; García-Barceló, M.; Julián, E.; Ausina, V.; Lanéelle, M.A. (1997) "Distribution of surface-exposed antigenic glycolipids in recent clinical isolates of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ". <i>Research in Microbiology</i> 148: 405-412.....	194
VIII. Muñoz, M.; Lanéelle, M.A.; Luquin, M.; Torrelles, J.; Julián, E.; Ausina, V.; Daffé, M. (1997) "Occurrence of an antigenic triacyl trehalose in clinical isolates and reference strains of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ". <i>FEMS Microbiology Letters</i> 157: 251-259. 204	
G. AGRAÏMENTS	216

Presentació

Fa més de cent anys que es va descobrir l'agent causant de la tuberculosi (TB), el *Mycobacterium tuberculosis*, des d'aleshores s'ha dut a terme una estreta lluita entre l'home i el bacteri a fi d'eradicar la malaltia.

Avui dia, però, encara guanya el microorganisme: malgrat que hi ha una vacuna des de fa setanta anys i un tractament efectiu des de fa més de cinquanta anys, la TB mata entre dos i tres milions de persones cada any a tot el món. El resurgiment de la malaltia degut a la coinfecció amb el Virus de la immunodeficiència humana (VIH), la poca efectivitat de la vacuna existent, l'aparició de soques resistents als antimicobacterians usuals i la inaccessibilitat a la medicació en algunes poblacions on la malaltia presenta una incidència elevada han fet que l'any 1993 l'Organització Mundial per la Salut (OMS) declarés la malaltia en un estat d'emergència mundial, un fet insòlit fins al moment.

Milers de laboratoris a tot el món treballen per tal d'aconseguir tres objectius bàsics per a poder doblegar el bacil de la tuberculosi:

- un diagnòstic ràpid, econòmic i específic, que estigui a l'abast del personal sanitari de qualsevol país del món, sense que calgui disposar d'un aparellatge complex per a la seva realització;
- un nou tractament més curt que l'actual (que consisteix en l'administració de tres fàrmacs durant dos mesos i dos d'ells durant quatre mesos més) i sense efectes secundaris, i
- una nova vacuna, més efectiva que l'actual i accessible a tota la població.

Aquesta tesi s'ha centrat en el primer d'aquests tres objectius. Actualment el problema del diagnòstic de la malaltia tuberculosa sembla que està resolt utilitzant tècniques basades en l'amplificació d'àcids nucleics, prou sensibles i gairebé 100% específiques, que poden proporcionar un resultat el mateix dia que arriba la mostra. Però aquesta tecnologia no està a l'abast de tots els laboratoris. Per exemple, als països sub-desenvolupats, on es donen el 95% dels casos, encara ara no hi ha una eina útil de diagnòstic. La serologia podria ser una solució. Des dels inicis del coneixement de l'etiologia de la malaltia s'ha intentat desenvolupar una prova serodiagnòstica que resoldria aquest problema. No caldria cap equipament costós i estaria a l'abast de gairebé tots els laboratoris.

En aquest sentit, ens hem proposat localitzar antígens glicolipídics de la paret de *M. tuberculosis* i comprovar la seva capacitat serodiagnòstica en el nostre entorn. Per a això hem desenvolupat un enzim immunoassaig (ELISA) per a

cinc molècules glicolipídiques diferents i l'hem avaluat amb un grup ampli de sèrums, tant de malalts tuberculosos com de població control. Paral·lelament, hem comparat aquests resultats amb els obtinguts amb un conjunt de nou tests comercialitzats que es basen en altres tipus d'antígens micobacterians: extractes cel·lulars, proteïnes recombinants o lipopolisacàrids estructurals.

Acrònims

- aa aminoàcid
- a.C. Abans de Crist
- ADN Àcid desoxiribonucleic
- AG Arabinogalactà
- ARN Àcid ribonucleic
- BCG Bacil de Calmette i Guérin
- BSA *Bovine serum albumin*, per “albúmina bovina sèrica”
- C Carboni
- CF *Cord factor*
- DAT *Diacyltrehaloses*, per “trehaloses diacilades”
- ELISA *Enzyme-linked immunosorbent assay*, per “enzim immunoassaig”
- HPLC *High pressure liquid cromatography*, per “cromatografia líquida d'alta afinitat”
- HUGTiP Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
- IFN-_γ Interferó-gamma
- Ig Immunoglobulina
- IL- Interleucina
- kDa Kilodaltons
- LAM Lipoarabinomanà
- LCR Líquid cefaloraquidi
- LJ Lowëstein-Jensen
- LOS Lipooligosacàrids
- MAIS *Mycobacterium avium-intracellulare -scrofulaceum*
- MHC *Major histocompatibility complex*, per “complex major d'histocompatibilitat”
- MOTT *Mycobacteria Other Than Tuberculosis*, per “un altre micobacteri diferent del *Mycobacterium tuberculosis*”
- OD *Optical density*, per “densitat òptica”
- OMS Organització Mundial per la Salut
- OT *Old tuberculin*, per “tuberculina vella”
- PCR *Polimerase chain reaction*, per “reacció en cadena de la polimerasa”
- PDIM *Phthiocerol dimycocerosates*, per “dimicocerosats de ftiocerol”
- PGL *Phenol glycolipid*, per “glicolípid fenòlic”
- PIM Fosfatidilinositol manòsids
- PPD *Purified protein derivative*, per “derivat proteic purificat”
- RIA Radioimmunoassaig

SIDA Síndrome de la immunodeficiència adquirida
SL-I Sulfolípid I
TAT *Triacyltrehaloses*, per “trealoses triacilades”
TB Tuberculosi
TBS Tris buffer saline, per “tampó Tris salí”
TGF *Tumor growth factor*, per “factor de creixement tumoral”
TLC *Thin-layer chromatography*, per “cromatografia en capa fina”
TNF- *Tumor necrosis factor- α* , per “factor de necrosi tumoral-alfa”
VIH Virus de la immunodeficiència humana

INTRODUCCIÓ

Introducció

A.1 La malaltia tuberculosa

A.1.1 Història i epidemiologia

Història

El *M. tuberculosis* és present en la població humana des de l'antiguitat. Estudis paleomicrobiològics amb teixits provinents d'individus momificats han demostrat que la infecció per *M. tuberculosis* era relativament freqüent a l'antic Egipte, aproximadament entre 4.000 i 2.000 anys a.C. (Zink, 2001).

Els termes *tisi* o *consumpció* (del grec “consumir-se”) apareixen per primera vegada a la literatura grega clàssica, tot i que també se'n troben referències en texts hindús antics. Cap al 460 a.C., Hipòcrates la identificà com la malaltia més estesa, i destacava que gairebé sempre era fatal (Bloom i Murray, 1992). Fins al segle XVII no n'apareixen les primeres descripcions anatòmiques i patològiques exactes. Sylvius, al seu tractat *Opera Medica* (1679), identifica els tubercles com un canvi consistent i característic en els pulmons i altres àrees dels malalts tísics, i la progressió cap a abscessos i cavitats. Les primeres referències de la naturalesa infecciosa de la malaltia apareixen en el Decret de Lucca de 1699, on se'n suggereixen les primeres mesures de desinfecció. El 1722, B. Marten, un metge anglès, publica *A new theory of consumption* on hipotetitza que la TB pot ser causada per “meravelloses criatures diminutes vivents” que poden generar les lesions i els símptomes de la malaltia, i suggereix que la malaltia la pot contraure una persona sana dormint, menjant, bevent o conversant amb un malalt tísic (Doetsch, 1978).

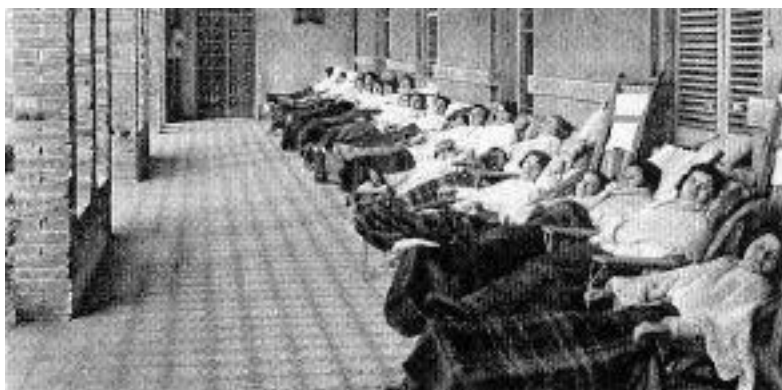
A diferència d'aquest nivell de coneixement de l'origen de la malaltia, que ja havia permès un trencament en la cadena de contagis, la primera cura no es va produir fins a la introducció dels sanatoris. Brehmer, un estudiant de botànica tuberculós, va vèncer la malaltia viatjant a les muntanyes. En va tornar sa, estudià medicina, i el 1854 presentà la seva tesi doctoral, que portava el títol vaticinador: “La tuberculosi és una malaltia curable”. El mateix any, va construir el primer sanatori, on els malalts respiraven contínuament aire fresc i gaudien d'una bona alimentació.

A partir d'aleshores, els avenços s'esdeveniren ràpidament. El 1865, el doctor Villemin mostrà a l'Acadèmia Francesa de Medicina que havia infectat conills amb sang i esputs trets de malalts tuberculosos o vaques, i va demostrar que era una malaltia infecciosa (Collins, 1998). Postulà que un microorganisme específic era la causa de la malaltia, amb la qual cosa va posar fi a la creença centenària que la consumpció sorgia espontàniament en cada organisme afectat.

El 1882 tres investigadors alemanys van veure, independentment i gairebé simultàniament, el bacil de la TB (Chadwick, 1981). Però el 24 de març de 1882, Robert Koch fou el primer a presentar el seu treball a la Societat de Fisiologia de Berlín, en un famós article sobre l'etiologia de la TB (Koch, 1932). Koch va descriure l'aïllament del *M. tuberculosis* a partir d'animals infectats i persones malaltes, el seu cultiu *in vitro* i l'exitosa reinfecció en animals experimentals. A partir d'aquests treballs, elaborà els seus postulats amb relació a la malaltia. En aquell moment, la TB era responsable d'un terç de les morts d'adults a les capitals europees (Kaufman, 2001b). L'any 1890 Koch anuncià que tenia la cura per a la malaltia: un extracte de glicerina del bacil tuberculós anomenat *old tuberculin* (OT). Malgrat que aconseguí recuperar malalts injectant-lo, la majoria morien. Més tard, aquest extracte, modificat, es va fer servir com a eina diagnòstica.

Durant aquest temps, centenars de sanatoris per tot Europa acomplien una doble funció: aïllar els malalts (la font d'infecció) de la població i avançar en la cura amb un descans forçat i una dieta apropiada (figura 1). El 1884, el doctor Trudeau, animat per la seva pròpia cura, establí el primer sanatori als Estats Units, que ha acabat esdevenint un centre de referència en clínica i recerca de la TB (Daniel, 1994).

Figura 1. Hospital-Sanatori de l'Esperit Sant (Santa Coloma de Gramenet, Barcelona) (Cid, 1993)



El 1882, Forlanini hi introduí la teràpia activa: el pneumotòrax artificial i mètodes quirúrgics per a reduir el volum pulmonar (Chadwick, 1981). Tretze anys després, W. K. von Rontgen va descobrir els raigs X, que van permetre veure l'agudesa de la malaltia i el seu progrés.

Més tard, un altre desenvolupament important el proporcionaren el bacteriòleg francès Albert Calmette i Camille Guérin, que observaren un canvi en la morfologia colonial després de 39 passos diferents d'una soca virulenta de *Mycobacterium bovis*. Van utilitzar un medi de cultiu basat en glicerina-patata amb bilis de bou i van aconseguir disminuir la seva virulència: infectant animals, observaren que no era virulent i que incrementava la resistència a patir la malaltia. Aquests assajos van assentar les bases per a la vacuna BCG (bacil de Calmette-Guérin), obtinguda finalment després de 231 ressembres (Bloom i Murray, 1992). Malgrat que la seva

eficàcia continua essent debatuda (des d'un 80% d'eficàcia fins a no detectar protecció), encara avui dia és l'única vacuna de què es disposa contra la TB.

Aleshores, enmig de la II Guerra Mundial aparegué la quimioteràpia, que esdevingué l'única arma contra el bacteri que havia amenaçat a la humanitat durant centenars d'anys. Després de provar la sulfonamida i penicilines (utilitzades per a altres malalties), i l'actinomicina (tòxica a humans), l'èxit vingué quan Waksman *et al.* administraren l'estreptomicina purificada a partir d'*Streptomyces griseus* a un malalt al qual se li aturà la progressió de la malaltia, l'any 1943. Els anys següents van aparèixer noves drogues que ajudaren a desenvolupar la teràpia combinada entre 2 o 3 fàrmacs, ja que amb la monoteràpia per estreptomicina aparegueren els primers mutants als pocs mesos. Així sorgiren: l'àcid p-aminosalicilic (1949), la isoniazida (1952), la pirazinamida (1954), la cicloserina (1955), l'etambutol (1962) i la rifampicina (1963). Actualment, amb un règim de 3 drogues, al cap d'un mes el malalt se sent millor, guanya pes, disminueix la tos i s'observen millores per raigs X. Tot i que el bacteri és present en les tincions, el cultiu es va negativitzant. Als dos mesos cal un canvi de teràpia, amb només 2 fàrmacs fins als sis mesos, per a curar la malaltia (Rufí, 2000).

Epidemiologia

La TB és una malaltia contagiosa que es transmet mitjançant aerosols. Només les persones amb una TB pulmonar són infeccioses i quan tusen, esternuden, parlen o escupen, propaguen els bacils a l'aire. Altres vies de contagi són la ingestió de material contaminat, normalment llet, i la inoculació directa, que usualment té lloc per accidents en treballadors sanitaris.

A tots els països desenvolupats els indicadors epidemiològics de la TB mostraven una davallada progressiva de la malaltia des de començaments del segle XX. Però, a partir de mitjan anys vuitanta, totes les dades començaren a indicar un increment imprevisible dels casos a tot el món. Als Estats Units, entre 1985 i 1992, el nombre de casos va augmentar un 20% (CDC, 1999). Com a raó principal d'aquest canvi se situà la infecció pel VIH, a més d'altres factors com la disminució dels esforços de salut pública, l'aparició de soques del bacil resistents als fàrmacs, l'addicció a drogues per via parenteral, la indigència, l'emigració i la pobresa.

D'altra banda, en els registres de l'OMS es pot veure que no hi havia hagut cap davallada significativa a escala mundial de la mortalitat deguda a la TB des de l'època dels descobriments de Koch. L'aparició dels sanatoris i la quimioteràpia, que van reduir dràsticament la TB en els països desenvolupats, no van tenir un efecte en la globalitat del problema. Per exemple, només a l'Índia la situació és la mateixa des de la seva independència a final dels anys quaranta. Aleshores i ara, aproximadament 13 milions de persones (un 1,5% de la població) pateixen una TB activa, dels quals 6 milions són casos d'esput positiu i, consegüentment, infecciosos

(Brennan, 1997).

El 1993 l'OMS, en un fet sense precedents, va declarar la TB d'emergència global, la qual cosa manifesta la gran preocupació sobre l'epidèmia actual. Fins ara, ha estat l'única malaltia que ha rebut aquesta qualificació. Actualment les dades que es manipulen són esgarrifoses:

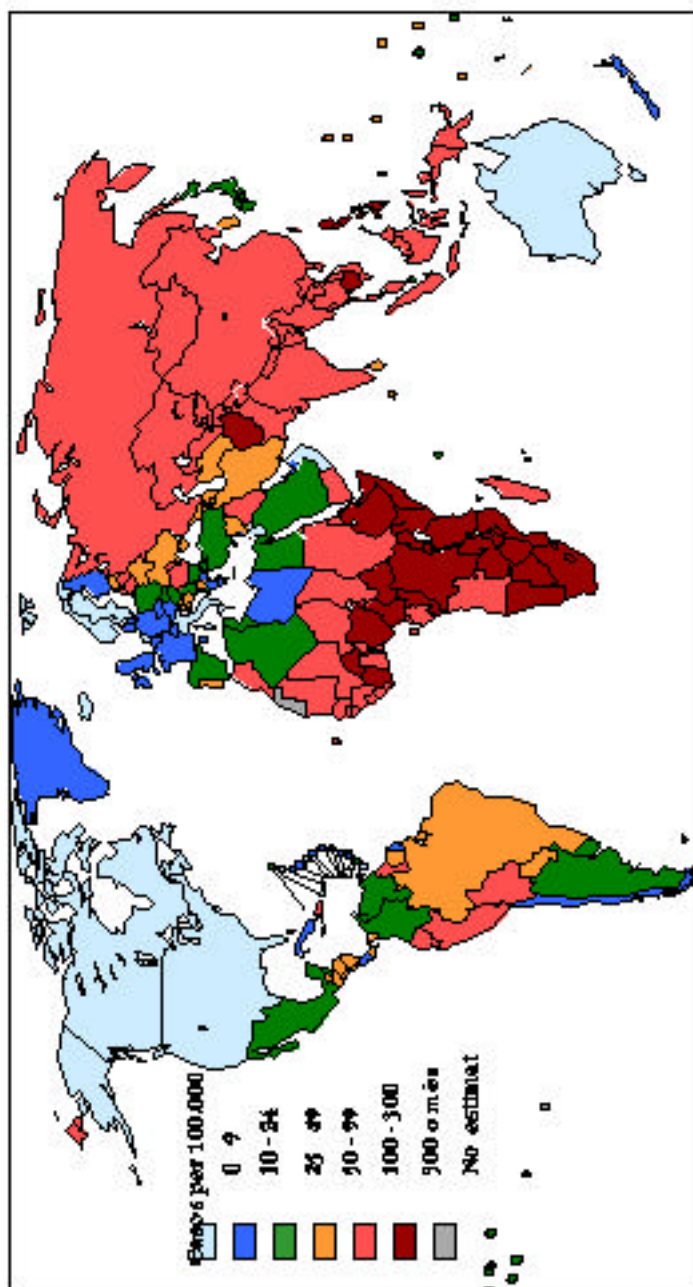
- cada segon hi ha algú al món que s'infecta per primera vegada. Aproximadament un 1% de la població mundial s'infecta novament cada any (WHO, 1997);
- en total, un terç de la població mundial és portadora del bacil de la TB (n'està infectada). D'aquests, entre un 5 i un 10% esdevindran malalts alguna vegada al llarg de la seva vida;
- la TB mata entre 2 i 3 milions de persones cada any (Dye, 1999). És responsable de la mort de més persones que qualsevol altra malaltia infecciosa;
- s'estima que, entre l'any 2000 i el 2020, gairebé mil milions de persones s'infectaran per primera vegada; 200 milions de persones emmalaltiran, i 35 milions moriran a causa de la TB, si el control sobre la malaltia no s'enforteix (WHO, 2000b).

L'epidèmia global continua creixent i tornant-se cada cop més perillosa. Per a empitjorar la situació, un tractament interromput afavoreix el desenvolupament de bacils resistents al tractament farmacològic estàndard. Així, una preocupació fonamental és aconseguir que els malalts compleixin el règim terapèutic, ja que no fer-ho comporta un perill, no tan sols per al malalt, sinó per a la resta de la població (cadascun infectarà una mitjana d'entre 10 i 15 persones cada any). Han hagut d'adoptar mesures dràstiques a escala mundial com el Tractament directament observat que duu a terme l'OMS des de fa uns quants anys (Nunn, 2001).

La major càrrega de TB al món es dona al Sud-est asiàtic i a l'Àfrica (figura 2), però aspectes socials estan fent incrementar el nombre de casos en altres àrees. Així, a l'Europa de l'Est el nombre de morts està augmentant després de 40 anys de davallada progressiva (Dye, 1999). La situació a Espanya és sorprenent: tot i que es disposen de tots els mitjans sanitaris d'un país desenvolupat, el nivell de TB és molt alt. La incidència de la TB a Espanya l'any 1999 va ser de 40 casos per cada 100.000 habitants (Caminero, 1998). A la ciutat de Barcelona, la incidència el 1991 fou del 67,1 per 100.000 habitants. El Programa per a la prevenció i control de la tuberculosi a Barcelona, constituït en 1987, va promoure una tasca que ha permès disminuir la incidència al voltant d'un 5% cada any en els últims 6 anys, fins a reduir-la al 37,5 per 100.000 habitants l'any 1999 i 2000 (Rius, 2001). Tot i així, cal continuar exercint un control estricte a fi d'eradicar la malaltia en la nostra àrea, ja que el constant degoteix d'immigrants d'àrees amb elevada prevalença de la

malaltia, i les condicions socials desfavorables són una font contínua de nous malalts tuberculosos.

Figura 2. Mapa de la incidència global de la TB l'any 2000 (Modificat a partir de WHO, 2002)



A.1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

A.1.2.1 Característiques generals

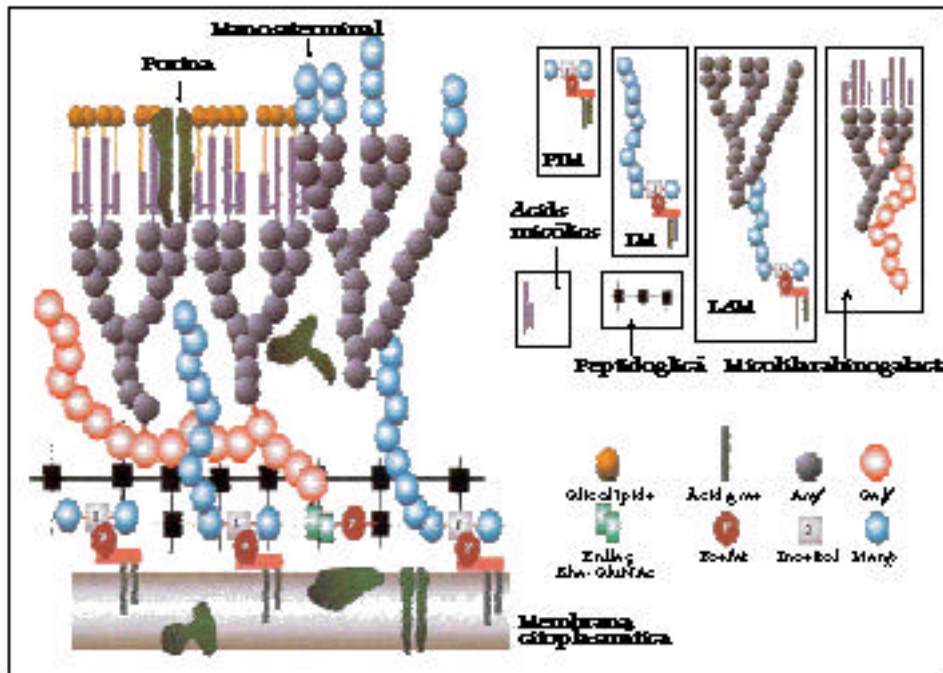
El gènere *Mycobacterium* comprèn més de 100 espècies <<http://www-sv.cict.fr/bacterio/m/Mycobacterium.html>>, que es poden classificar en sis grups, a partir de la velocitat de creixement (ràpid o lent segons sigui inferior o superior a una setmana en medi sòlid) i la producció o no de pigments en presència o absència de llum (fotocromògens, escotocromògens, i no cromògens) (Koneman, 1997). Es caracteritzen perquè són àcid-alcohol resistents (tinció Ziehl-Neelsen o fenol auramina). Són microorganismes aerobis o microaeròfils, amb un alt contingut de %G+C (entre el 62 i el 72%). Alguns són patògens obligats, com el complex *M. tuberculosis* i *Mycobacterium leprae* altres són patògens oportunistes i la majoria són espècies sapròfites. El *M. tuberculosis* acostuma a presentar-se com a bacils prims de forma recta o lleugerament corbada, que fan entre 0,2 i 0,5 µm d'ample i entre 1 i 4 µm de llarg. És un creixedor lent; fins i tot en condicions òptimes de creixement el temps de duplicació és de 15 a 18 hores, i requereix entre 2 i 3 setmanes d'incubació a 37°C per a donar lloc a colònies visibles en medis de cultiu sòlid.

El *M. tuberculosis* és l'agent causal de la TB a l'espècie humana, tot i que altres membres del complex *M. tuberculosis* també produeixen la malaltia. El "*Mycobacterium canettii*" (van Soolingen, 1997), el *Mycobacterium africanum* que provoca TB humana en països de l'Àfrica tropical; el *M. bovis* produeix fonamentalment la malaltia a animals, tot i que pot ser adquirit per l'home; el *M. bovis*BCG, és la vacuna de virulència atenuada.

A.1.2.2 Components de la paret cel·lular

L'estructura cel·lular del *M. tuberculosis* consta d'una paret gruixuda formada per diferents polímers, separats de la membrana cel·lular per l'espai periplàsmic. A grans trets, la zona més interna està constituïda per peptidoglicà, format per molècules d'N-acetilglucosamina i àcid N-glucolilmuràmic (en lloc de l'habitual N-acetilmuràmic) unides per cadenes curtes de quatre aminoàcids diferents (Crick, 2001). Aquesta capa és l'esquelet del bacteri que li dona forma i rigidesa. La capa següent està formada per l'arabinogalactà, un polímer d'arabinosa i galactosa unit covalentment al peptidoglicà. Unida a aquest complex es troba una barrera espessa, constituïda bàsicament per lípids (àcids micòlics) i, a la part més externa altres lípids, glicolípid i carbohidrats units no covalentment, que són fàcilment extraïbles amb solvents orgànics. Aquesta estructura es pot observar a la Figura 3.

Figura 3. Representació esquemàtica de la paret dels micobacteris. Modificada a partir de Liu *et al.* (1999)



Aquesta paret complexa és una de les característiques més importants del gènere, i fins a un 60% del seu pes correspon a lípids i glicolípids (Liu, 1999). Aquests són responsables de la seva hidrofobicitat i, en part, de la seva resistència als antibiòtics.

L'any 1982 Minnikin proposà un model de distribució d'aquests lípids i glicolípids que consisteix en una bicapa asimètrica, i sembla que és àmpliament acceptat, tot i que hi ha experiments que el ratifiquen i d'altres que n'estan en contra, però no n'hi ha de consensuat definitivament (McNeil i Brennan, 1991). Recentment s'ha proposat que és possible que hi hagi una barreja de proteïnes-polisacàrids (principalment glucà i arabinomanà), exposats a la superfície que constitueixen una envolta externa, coneguda com a càpsula (Ortalo-Magné, 1995). Al llarg de l'estructura de la paret també trobarien un elevat nombre de proteïnes. Primer, proteïnes en el procés de ser exportades des de la cèl·lula cap a l'exterior i que han de travessar la paret; segon, enzims necessaris per a la construcció i reconstrucció dels polímers de la paret durant el creixement i la divisió cel·lular; i finalment, s'ha descrit en diferents espècies del gènere la presència de porines: proteïnes especials que formen canals hidrofílics a través de la paret i que deixen passar petits soluts carregats (sobretot diferents ions)

(Brennan i Nikaido, 1995).

La composició de la paret i les diferents hipòtesis sobre la seva estructura es troben descrits àmpliament en diversos treballs de revisió: Baulard, 1999; Besra i Chatterjee, 1994; Brennan i Nikaido, 1995; Daffé i Draper, 1998; Liu, 1999.

A.1.2.2.1 Lípids

Els àcids micòlics són un dels constituents principals de la paret cel·lular. Són àcids grassos -alquil ramificats, -hidroxilats de pes molecular elevat, i formats per llargues cadenes d'entre 70 i 90 àtoms de C. Es diferencien per la seva longitud dels àcids micòlics d'altres gèneres, com *Corynebacterium*, *Nocardia*, o *Rhodococcus*. Hi ha set tipus d'àcids micòlics diferents atenent el grup funcional oxigenat que presenten. Cada espècie del gènere té un patró d'àcids micòlics característic però no exclusiu de l'espècie (Hinrikson i Pfyffer, 1994). Es troben covalentment units mitjançant enllaços èster a l'arabinosa de l'arabinogalactà, o esterificant sucres lliures sobre la paret (mono- i dimicolat de trealosa).

Altres lípids que formen part de la paret, units no covalentment, són els dimicocerosats de tiocerol (PDIM), que han estat identificats fins ara en vuit espècies de micobacteris: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. leprae*, *Mycobacterium gastri* i *Mycobacterium kansasii*, i els ftiocerol diftioceranats a *Mycobacterium marinum* i *Mycobacterium ulcerans*. Tant per als àcids micòlics com pels PDIM, la mutació de gens involucrats en la seva síntesi ha demostrat, recentment, la seva implicació en la patogenicitat del bacil tuberculós. Se'ls atribueix una funció passiva a la paret, i tenen un paper important en l'arquitectura i la permeabilitat de la paret (Camacho, 1999 i 2001; Cox, 1999; i Dubnau, 2000).

A.1.2.2.2 Glicolípid

Entre la resta de molècules unides no covalentment trobem glicolípid, alguns dels quals són característics i exclusius del *M. tuberculosis*, com ara les poliftenoïl trealoses i els sulfolípid (taula 1). Malgrat que la seva estructura es conegui, la disposició d'aquestes molècules a la paret ha estat molt discutida. El que és clar és que la seva disposició externa els fa components clau en les interaccions amb l'hoste, i el seu coneixement amb profunditat és molt important per a comprendre millor les relacions patogen-cèl·lula hoste.

En aquest apartat de la introducció descrivim l'estructura dels diferents glicolípid de la paret i incidim en els que seran objecte d'estudi en aquesta tesi. La funció que se'ls atribueix dins el metabolisme i la patogènia del bacil s'especifica a la taula 1. Així doncs, segons la seva estructura els podem

diferenciar en:

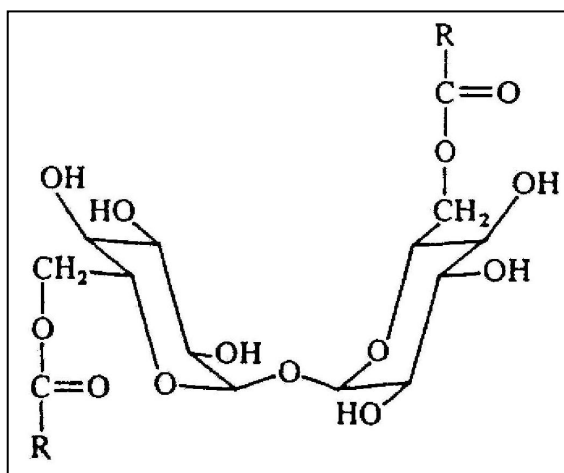
1. Trealoses acilades:
 - 1.1. Dimicolat de trealosa (CF)
 - 1.2. Sulfàtids (SL)
 - 1.3. Altres èsters de trealosa (DAT i TAT)
2. Lípids que contenen oligosacàrids:
 - 2.1. Lipooligosacàrids (LOS)
 - 2.2. Glicolípids fenòlics (PGL)
3. Lipoglicans. Derivats glicosilats dels fosfatidilinositols:
 - 3.1. Fosfatidilinositol manòsids (PIM)
 - 3.2. Lipoarabinomanan i lipomanans (LAM i LM)

1. Trealoses acilades

Aquests glicolípids tenen en comú una unitat d' , ' -trealosa (-D-glucopiranosil -D-glucopiranòsid o -D-trealosa) (Asselineau i Lanéelle, 1998). Segons si la molècula de trealosa és esterificada per àcids micòlics o altres cadenes d'àcids grassos, diferenciem:

1.1. Dimicolat de trealosa o *cord factor*

Està constituït per una molècula de trealosa esterificada per dos àcids micòlics: 6,6'-dimicoloil- , ' -D-trealosa (figura 4). Se l'anomena *cord factor* perquè inicialment se li atribuï l'organització del creixement en forma de corda típica de *M. tuberculosis* (Bloch, 1950), cosa que posteriorment es desmentí, ja que és present a tots els micobacteris (excepte al *M. leprae*). Aquest glicolípid es presenta com una mescla on uns es diferencien dels altres en els grups químics presents en els substituents dels àcids micòlics (Vergne i Daffé, 1998). El CF ha estat una de les molècules de superfície més estudiades, i se li han atribuït moltes funcions, que s'indiquen a la taula 1. *In vivo* és difícil imaginar-se aquests



papers si no es troba exposat a la part externa de la paret, ja que estudis recents el situen en capes internes de la paret cel·lular i no a la superfície (Ortalo-Magné, 1996).

Figura 4. Estructura molecular del CF

1.2. Sulfàtids

La família dels sulfolípid (SL-I, II i III) es va descobrir en buscar l'origen de l'absorció del colorant catiònic roig neutre en *M. tuberculosis*. És una trealosa

sulfatada esterificada per àcid palmític, àcid esteàric i dos altres àcids grassos polimetil ramificats (Goren, 1976) (figura 5). L'anomenat SL-I: 2,3,6,6'-tetraacil-, 'D-trealosa 2' sulfat, és el principal a *M. tuberculosis* H37Rv. Aquests glicolípid només s'han trobat en soques virulentes de *M. tuberculosis* (taula 1). És una molècula atípica ja que a part que de derivats sulfats n'hi ha pocs a la natura, tampoc no són gaire comunes les cadenes acilades que l'esterifiquen. Recentment s'han aconseguit soques mutants per a la síntesi del SL-I (Sirakova, 2001), que probablement permetran conèixer més acuradament el seu paper en la patogènia del bacil.

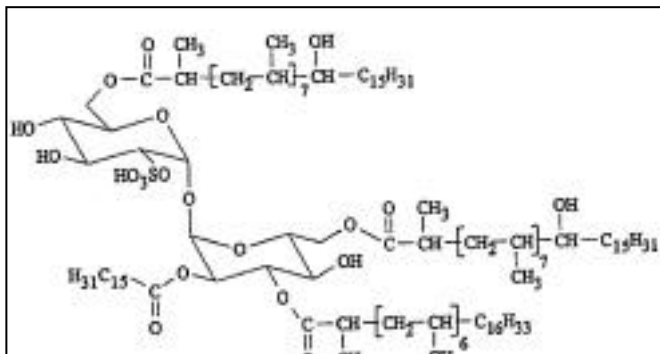


Figura 5. Estructura molecular del SL-I de *M. tuberculosis*

1.3. Altres èsters de trealosa

Dins el gènere *Mycobacterium* trobem trealoses esterificades amb àcids fleics (*Mycobacterium phei* i *Mycobacterium smegmatis*) i polifiteinoil trealoses que només es troben al *M. tuberculosis* (Daffé, 1988). A més trobem:

- 2,3-diaciltrealosa (DAT), constituïda per àcids grassos, principalment branques polimetilades en el seu extrem carboxil, esterificant una molècula de trealosa (Baer, 1993) (figura 6). Inicialment es va descriure com un sulfolípid, el que a la bibliografia s'anomena SL-IV, i ha estat molt estudiada com a antigen per al serodiagnòstic de la TB (apartat 2.4.2.2.2), i
- 2,3,6-triaciltrealoses (TAT), que tenen una estructura similar a les DAT però amb un tercer àcid gras esterificat la molècula de trealosa (Muñoz, 1997a).

Les seves funcions es detallen a la taula 1.

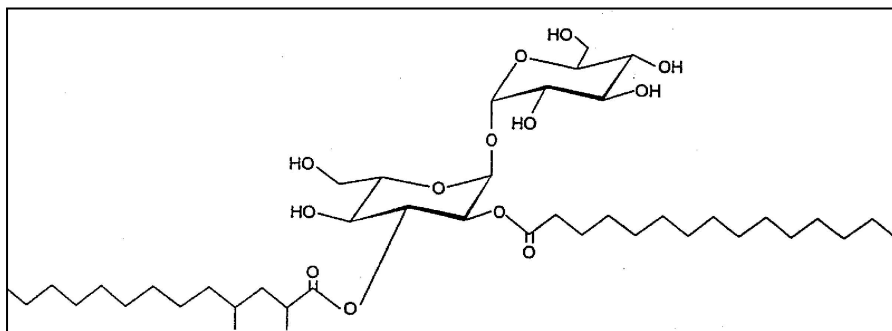


Figura 6.
Estructura molecular de les DAT de *M. tuberculosis*

2. Lípids que contenen oligosacàrids

2.1. Lipooligosacàrids (LOS)

Trealosa poliàcilada per 2 o 3 cadenes d'àcids grassos metilats de cadena llarga i glicosilada per una o més unitats oligosacàrides. Els diferents LOS específics d'espècie difereixen principalment en la composició sacàrida. La seva distribució i funcions es detallen a la taula 1.

2.2. Glicolípidis fenòlics

Van estar descrits per primera vegada al *M. bovis*. Estan constituïts per un grup fenol i un ftiocerol (ω-diol de cadena llarga, 33C-41C) esterificat per dos àcids grassos polimetil ramificats (àcids micoceròsics o ftiocerànics). Aquest nucli lipídic (PDIM) es troba unit pel fenol a un mono-, di-, tri- o tetrasacàrid. S'han descrit les diferents variacions d'aquesta estructura en diverses espècies del gènere. El PGL-I de *M. leprae* és un dels constituents principals de la seva paret (el 2% de la massa del bacil). Les funcions que se'ls atribueixen es mostren a la taula 1. L'estructura del PGL-Tb1 de "*M. canettii*" es representa a la figura 7.

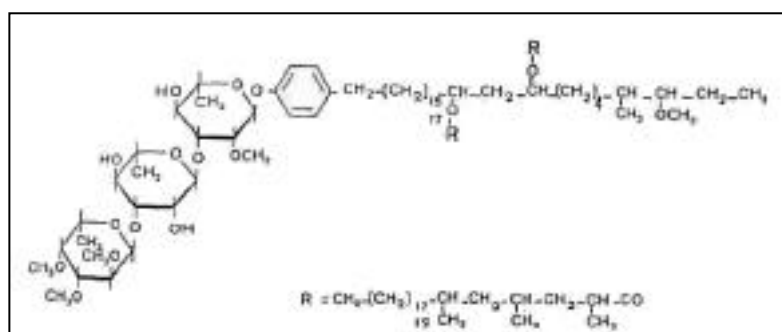


Figura 7. Estructura molecular del PGL-Tb1 de "*M. canettii*"

3. Derivats glicosilats dels fosfatidilinositols

3.1. Fosfatidilinositolmanòsids (PIM)

Són, juntament amb la fosfatidiletanolamina, els fosfolípids principals de la paret dels micobacteris. Són derivats glicosilats (d'1 a 5 residus de manosa) del fosfatidilinositol (Asselineau i Lanéelle, 1998).

3.2. Lipoarabinomanan i lipomanans (LAM i LM)

S'ha proposat que aquests lipoglicans es constitueixen per successives addicions de residus manosa i arabinosa a PIM, mitjançant un transportador poliprenil (Besra, 1997). Tant els PIM com els manans, arabinomanans, LM i LAM-Man tenen residus de manosa al seu extrem no reductor. Se'ls atribueixen diferents funcions en la interacció amb l'hoste (taula 1), ja que el receptor de manosa és considerat una de les claus d'entrada del micobacteri al macròfag.

TAULA 1. Distribució del glicolípide dins el gènere *Mycobacterium* i funcions que se li atribueixen

Glicolípide	Distribució	Funció
CF	Tots els membres del gènere, excepte <i>M. leprae</i>	Antigènic a infeccions micobacterianes (apartat A.2.4.2.2.1). Immunestimulació; activitat antitumoral; formació de granuloma; estimulació a macròfags; inducció de IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 i IL-10; alteració de fibrinògen; toxicitat en ratolins; alteracions bioquímiques de la fosforilació i respiració mitocondrial; inhibició de la fusió entre membranes adjacents; inducció d'apoptosi (Lima, 2001; Ozeki, 1997; Ryll, 2001). Reconèixement i presentació per CD1 (Beckman, 1994).
SL	Soques virulentes de <i>M. tuberculosis</i>	Antigènic a TB (apartat A.2.4.2.2.7). Inhibició de la fagocitació de macròfags per IFN- γ , IFN- β , IL-1 i TNF- α ; supressió de la formació d'origen reactiu (Brosna, 1991; Fabel, 1988); activació de neutròfils humans (Zhang, 1991); sinèrgic de la toxicitat del α -Favos.
DAT	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. fortuitum</i>	Antigènic a TB (apartat A.2.4.2.2.2). Inhibició de la proliferació de cèl·lules T CD4 (Saavedra, 2001).
TAT	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. fortuitum</i>	Antigènic a TB (apartat A.2.4.2.2.8).
LOS	Moltes espècies del gènere, entre elles <i>M. tuberculosis</i>	Antigènic a TB (apartat A.2.4.2.2.4); receptor de micobacteriòfags (Bera, 1994); possible implicació en la mortologia colonial (Bell-Brennan, 1989).
PGL	<i>M. bovis</i> , <i>M. leprae</i> , <i>M. neoaurum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. goodii</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. neoaurum</i>	Antigènic a TB i lepra (apartat A.2.4.2.2.5); inhibició de la resposta limfoproliferativa (part sacàrida) (Fournis, 1989); regulador de radical d'origen (Chan, 1989); activació del complement per a fagocitosis de <i>M. leprae</i> (Schlesinger i Horvitz, 1991); activació de cèl·lules T CD4 humans (Fildt, 1999); tropisme neural de <i>M. leprae</i> (Ng, 2000).
PIM	Tots els membres del gènere	Antigènic a infeccions micobacterianes (apartat A.2.4.2.2.6); adhesió a cèl·lules no fagocítiques (Hoppe, 1997); inducció NO sintasa (Te 1995).
IAM i IM	Tots els membres del gènere	Antigènic a infeccions micobacterianes (apartat A.2.4.2.2.5). Lligan en la fagocitosis de <i>M. tuberculosis</i> ; inducció de la secreció de citoquin TNF- α , IL-6, GM-CSF, IL-8, IL-10; supressió de la secreció IL-12; neutralització de radical lliure de O_2^- citotòxic; supressió de la limfoproliferació de cèl·lules T; supervivència del micobacteri al macròfag (Bera, 1997; Chan, 1991; Nigou, 2001; Vercellone, 1998). Bloqueig de l'activació transcripcional de l'IFN- γ (Kiedel i Kaufmann, 1997).

Taula modificada a partir de Vergne i Daffé (1998)