204
265

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIOS SOBRE EL DIAGNOSTICO DE DERMATOFILOSIS POR PRUEBAS SEROLOGICAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

ARTURO CRUZ

DIRECTORES:

PH. D. ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES
D. V. M.C. JORGE LUIS TORTORA PEREZ

V N A M

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO **1989**

FALLA DE ORIGEN

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Introducción 1

Objetivos 13

Material y métodos 14

Resultados 24

Discusión 28

Conclusión 32

Apéndice 33

Bibliografía 35

INTRODUCCION

Dentro de las enfermedades bacterianas de la piel, la Dermatofilosis ha cobrado interés no solo por su frecuencia, sino por la variedad de lesiones que produce, las cuales en algunas etapas son parecidas a las provocadas por otras etiologías (p. ej. tiña, sarna, etc.).

Esta enfermedad genera alteraciones de los hábitos de descanso y alimentación del animal, con la consecuente pérdida de peso, lo cual coincide con otras infecciones de la piel, que provocan prurito, por lo cual es importante el diagnóstico certero de la enfermedad.

Así mismo en diversos países, donde los ovinos son una gran industria, este padecimiento es de considerable importancia económica. Las pérdidas económicas son principalmente por daños en la piel y lana de los animales infectados. (2, 22)

Además del daño a los animales, la enfermedad también es de importancia para la salud pública ya que se han reportado algunos casos en humanos. (10)

La primera comunicación de la enfermedad ocurrió en 1915 por René Van Saceghen en el antiguo Congo Belga (hoy Zaire), logró entonces aislar el agente causal al que nombró *Dermatophilus*

congolensis "Dermatofilosis", como una entidad especifica del ganado bovino, y que posteriormente fue descrita en ovinos, caprinos, equinos y animales salvajes. Después a la enfermedad se le introdujo el término "Streptotricosis cutánea" y al agente *Streptothrix congolensis* el cual no fue aprobado. (16)

Aunque algunos autores han estudiado el género *Dermatophilus* tratando de ampliarlo con otras dos especies *D. pedis* y *D. dermatonomus*, estudios serológicos y bacteriológicos han demostrado que estas cepas pertenecen a *D. congolensis*, siendo esta la única especie del género, la cual es finalmente establecida en la familia *Dermatophilaceae* dentro del orden *Actinomycetales*. (16)

La Dermatofilosis ha sido detectada en diversos animales domésticos y salvajes, y se ha encontrado que está diseminada mundialmente, tanto en regiones templadas como tropicales. (5, 16)

El microorganismo *Dermatophilus congolensis* a pesar de su apariencia de hongo, y de su ciclo de vida multimorfico, es una bacteria Gram positiva, ácido resistente negativo, microaerofílico. Este agente presenta características especiales en cuanto a su forma de reproducción. En el estado infectivo se presenta como cocos móviles, llamados zoosporas, éstas crecen y germinan dando lugar a filamentos ramificados

(hifas). éstos se alargan y se forman tabiques transversos. Las hifas se ensanchan y se produce una tabicación adicional en varios planos hasta que las hifas se dividen en una serie de agrupaciones formando paquetes de cocos que llegan a formar hasta ocho esporas, se liberan las esporas de los polos de algunos filamentos y el ciclo prosigue. En condiciones favorables de crecimiento maduran y los delgados filamentos se rompen liberando zoosporas activas, posteriormente las hifas maduras y las esporas jovenes se encapsulan en la piel del animal. (5, 16, 32)

Crece microaerofilicamente a 37°C en un medio enriquecido sólido o liquido. En medio sólido como agar sangre su crecimiento depende del tipo de inóculo; si éste contiene forma filamentosa de la lesión, la colonia se desarrollará aproximadamente de 0.5-1.0 mm de diámetro dentro de las 24-48 horas, las colonias son de superficie rugosa, semejante a "encaje" y de consistencia dura de color blanco-grisácea. En cambio en los subcultivos las colonias son planas, brillantes y de consistencia cremosa, coloración amarillo-anaranjada, con un rápido crecimiento a las 24 horas de inoculadas y la bacteria es predominantemente cocoide. Ambas formas tienden a adherirse en la superficie del agar, dando una beta-hemólisis. (9, 24)

Su crecimiento es más rápido en un medio líquido como infusión cerebro-corazón (BHI). Dentro de las primeras 24 horas las

colonias pequeñas, vellosas, son visibles en el fondo del medio. Algunos aislamientos forman películas en la superficie del líquido. No crece en medios conteniendo antibiótico. (5,16)

Bioquímicamente, fermenta la glucosa, fructosa, galactosa, inulina y maltosa. Este germen es bastante proteolítico, desdobla la urea, peptoniza la leche tornasolada, licúa la gelatina y el medio de Loeffler, produce catalasa, pero no reduce los nitratos, ni forma indol. (9, 16, 17, 24, 32)

EPIDEMIOLOGIA Y PATOGENESIS

Aún existen muchas dudas acerca de la transmisión del agente. se sabe que las costras y escamas de animales infectados generalmente contienen elementos vivos, aún cuando los animales se están recuperando las costras y escamas se desprenden, sugiriendo que un animal contaminado podría infectar a otros con el microorganismo, pero investigaciones ralizadas, han intentado aislar el germen del medio ambiente con resultados infructuosos, dada por su pobre capacidad de sobrevivencia cuando está fuera de la integridad del animal: sin embargo los animales contraen la enfermedad al exponerse a un animal enfermo que actúa como fuente de infección, ya que las zoosporas son transferidas rápidamente de ovinos infectados a los susceptibles (42). Además del contacto directo, en determinado momento puede manifestarse su patogenicidad, cuando se altera la barrera defensiva de la piel por acción de factores predisponentes como humedad prolongada, vectores que transporten las zoosporas (23, 25, 48), traumatismos, y deficiencias de microelementos como cobre, zinc, proteínas, ácidos grasos y vitamina A.

Así mismo se ha encontrado que se asocia con agentes virales (Ectima contagioso) y que produce lesiones más severas y persistentes en los animales afectados. (1, 15, 36, 39).

Cuando la integridad de la piel es lesionada, las esporas penetran por una emulsión derivada de las secreciones sebáceas y proteínas solubles incluyendo anticuerpos derivados de la glándula sudorípara a la epidermis en donde se disemina. (45)

La nueva población se escapa hacia el exterior, afectando otros lugares de la piel del mismo u otro hospedador. Esto está apoyado en estudios histológicos, que indican que *D. congolensis* invade células vivas de la epidermis del estrato córneo. Las formas filamentosas y cocoides también se observan en glándulas sudoríparas, y sebáceas así como folículo piloso, en los cuales le permiten el paso para su diseminación (5, 16, 47)

Las lesiones son características, y se encuentran principalmente en cuello, dorso y parte ventral del cuerpo, pero pueden extenderse a extremidades, rabo, ubre y escroto en machos. (9, 14, 24, 43, 47)

Cuando la lesión cicatriza, queda una costra seca con hiperpigmentación del área y alopecia. En el microscopio se observa, acantolisis, paraqueratosis, hiperqueratosis, así como un aumento de vasos sanguíneos (vénulas y capilares) en la epidermis, los cuales presentan dilatación y congestión e intensa infiltración de neutrófilos y leucocitos; aunque las arterias de la dermis no sufren alteración. (3, 10, 47)

SINTOMATOLOGIA

La Dermatofilosis en ovinos (lana apelmazada, dermatitis micotica) afecta las partes cubiertas con lana. Los signos tempranos son áreas eritematosas, seguidas de engrosamientos y exudado de la piel, para finalmente determinar la formación de costras, éstas son circulares y discretas, la superficie ventral son cóncavas y ligeramente húmedas, se separan de la piel cuando la lana crece y es posible que éstas permanezcan unidas, pero si las fibras se rompen pueden desprenderse. En el examen visual pueden observarse normales, sin embargo a la palpación las fibras revelan que están unidas por el exudado. En casos crónicos las costras y las fibras de la lana unidas a ellas pueden permanecer adheridas a la piel, produciendo engrosamiento y endurecimiento de la misma. (9, 16)

El síndrome conocido como dermatitis proliferativa o pudrición del pie en fresa (Strawberry Foot Rot) ha sido reportado en ovinos en Escocia. (16)

La enfermedad comienza con una inflamación edematosa en la pierna, en cualquier punto entre el rodete coronario y la rodilla del animal, cualquiera de las cuatro extremidades, o todas pueden estar afectadas, después el proceso cambia a una forma exudativa a la formación de costras grandes con pérdida de la lana o pelo. Si se remueven las costras, se observan

úlceras con puntos hemorrágicos que dan la apariencia de fresa: si no hay complicación secundaria, no se observa cojera, y las lesiones sanan espontáneamente. Estas lesiones son más delgadas y de color ámbar en áreas cubiertas por pelo en la cabeza, como en las orejas, comisura de los labios y piel de la nariz, y en los machos afecta el escroto. (9, 16)

DIAGNOSTICO

Para el diagnóstico en el laboratorio se debe enviar material de lesiones activas. Los microorganismos están dispersos en número pequeño y en ocasiones son difíciles de localizar en frotis de lesiones crónicas o en procesos de curación. (5, 16)

Para el diagnóstico microscópico de las muestras es necesario prepapar frotis teñidos con colorante de Giemsa, ya que el agente muestra afinidad muy fuerte por este colorante, el cual los filamentos se observan de un color azul tenue. Se pueden utilizar otros colorantes como azul de metileno o colorante de Wright. (5, 16)

Una técnica recomendada para el cultivo de este microorganismo, se basa en la liberación de zoosporas de la bacteria, después de la humectación de la misma y de la quimiotaxis al dióxido de carbono (5-10%). Los fragmentos de las lesiones se colocan en frascos o tubos, se agrega 1.0ml. de agua destilada y se mantiene durante 3 1/2 horas a 37°C. El sobrenadante se inocula en un medio sólido y después esto se coloca en una jarra de desecación, a la cual se le reduce la tensión del oxígeno por medio de una vela encendida y se incuba a 37°C por 24-48 horas. El examen del frotis teñido se debe efectuar con objetivo de inmersión, y se podrán observar los clásicos filamentos fragmentados. (12)

En cuanto al serodiagnóstico se han usado algunas técnica tanto de reacción primaria (p. ej. Enzima ligada a un inmunoabsorbente inerte ELISA), como de reacción secundaria (p. ej. Inmuno difusión doble en gel I.D.D.) para identificar y medir la respuesta inmune humoral (10, 19, 20, 27, 28, 30, 35, 38, 40, 44, 45, 46). Sin embargo éstas presentan ciertas variaciones, puesto que se han descrito varios procedimientos para obtener los antígenos de *D. congolensis*, estos métodos se diferencian entre sí por la cantidad y pureza de los antígenos que proporcionan. (4, 26, 31, 37)

Por lo tanto a continuación se describe una evaluación de las pruebas de inmunodifusión doble en gel (I.D.D.) y contrainmunoelectroforesis (C.I.E.), como medidas de detección de anticuerpos de *D. congolensis* en suero de infecciones naturales de ovinos y animales hiperinmunizados.

Para efectuar las pruebas I.D.D. y C.I.E., se requiere del empleo de antígenos solubles y paquetes celulares de *D. congolensis*. (41)

La prueba de inmunodifusión doble en gel, es una reacción de precipitación en un medio semisólido, en la que la difusión de un antígeno y de su anticuerpo homólogo da como resultado la formación de líneas de precipitación visibles, en el lugar donde se encuentran las concentraciones óptimas del antígeno y

del anticuerpo. En esta prueba tanto la solución del antigeno como la del anticuerpo, se separan inicialmente por una zona de gel, en la que posteriormente ambos reactores se difunden. (6, 35)

En la prueba de contrainmunoelectroforesis, tanto el antigeno como el anticuerpo simultáneamente son sometidos a la acción de un campo eléctrico en un gel de agar con pH.=8.6: en éstas condiciones, los anticuerpos casi no tienen carga y por lo consiguiente no deberían tener movimiento electroforético. Sin embargo se desplazan hacia el polo negativo (cátodo) a causa del movimiento electroendosmótico. Al mismo tiempo, el antigeno de carga negativa, debido a la corriente eléctrica, se dirige hacia el polo positivo (ánodo). En esta forma el antigeno y el anticuerpo se encuentran y reaccionan formando una linea de precipitación visible. (6, 35)

TRATAMIENTO, CONTROL Y PREVENCION

En los animales el método usual de tratamiento de esta enfermedad consiste en el uso externo de medicamentos, en casos leves el sulfato de cobre, tintura de yodo, sulfato de potasio aluminio. Sin embargo se recomienda el tratamiento parenteral en casos severos con oxitetraciclinas de acción prolongada 20 mg./Kg (dosis única) con resultados satisfactorios. Otros antibióticos como penicilina, estreptomicina o el clorafenicol no han sido adecuados para el control de la infección. (5, 13, 16)

Por otro lado, se han investigado el uso de vacunas y en la mayoría de los casos los resultados son decepcionantes. Por esta razón se deben tomar en cuenta los aspectos epidemiológicos para evitar la presentación de dicha enfermedad. (5, 16)

O B J E T I V O S

Por lo anteriormente expuesto, se procedió a plantear los siguientes objetivos:

A) Aislamiento e identificación de *Dermatophilus congolensis*, a partir de costras de ovinos, positivas a Ectima contagioso.

B) Producción de antígenos de *Dermatophilus congolensis*, para las pruebas de inmunodifusión doble en gel y contrainmunoelectroforesis.

C) Valorar las pruebas de inmunodifusión doble en gel y contrainmunoelectroforesis, como métodos rápidos y específicos para el diagnóstico de anticuerpos contra Dermatofilosis en sueros de conejos, en forma experimental.

D) Probar mediante las pruebas de inmunodifusión doble en gel y contrainmunoelectroforesis la presencia de anticuerpos contra la Dermatofilosis en sueros de ovinos infectados en forma natural.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Se analizaron ocho muestras biológicas (costras) de ovino, positivas a Ectima contagioso (comunicación personal por el Dr. Tórtora, Profesor de la FES-C Depto. de Patología). Las muestras fueron pulverizadas sobre los porta objetos y se les agregó solución salina fisiológica durante 20 minutos para reblandecer las muestras, para después macerarla finamente, las laminillas se dejaron secar y posteriormente fueron teñidas con colorante de Giemsa (1:10) y se procedió a su observación al microscopio con objetivo de inmersión encontrando en una de las muestras (ovino #22) la presencia de gran cantidad de filamentos fragmentados.

Se procedió a aislar al agente patógeno sospechoso. De las fracciones pulverizadas se depositaron en frascos con agua destilada (1.0 ml.) y se mantuvo a 37°C durante 3 1/2 horas en una jarra de microaerofilia con una vela encendida, para producir dióxido de carbono (CO_2) aproximadamente un 5-10 %. Pasado el tiempo de cultivo, la superficie del sobrenadante se inoculó con una asa bacteriológica en agar sangre con 5% de sangre bovina, se incubó a 37°C por 48 horas en la misma jarra de CO_2 con objeto de liberar la fase móvil de la zoospora. Pasado el tiempo de incubación se realizó la tinción de Gram a las colonias sospechosas de ***D. congolensis***, rugosas con una marcada adherencia al agar sangre de 0.5-1.0 mm. de diámetro

con zonas de beta-hemólisis: se analizó el frotis teñido al microscopio con objetivo de inmersión en el cual se observó los clásicos filamentos Gram (+) del microorganismo.

Se realizaron pruebas para la identificación de la bacteria por medio de sus características bioquímicas en la cual se comparó con los de la cepa de referencia (obsequiada amablemente por la Universidad de Iowa. E.U.) (5, 7, 14, 16, 32)

PRODUCCION DE ANTIGENO

Los organismos fueron identificados como #1 (cepa de referencia) y #22 (cepa de ovino aislada), se inocularon en agar sangre a 37°C con 5-10% de CO_2 por 24-48 horas.

Se tomaron las colonias de agar sangre, posteriormente se incubó a cada cepa en diferente matraz de 2000 ml. con BHI estéril, éstos se colocaron en baño maría a 37°C con movimiento oscilatorio durante 96 horas, para romper la película que se forma en la superficie líquida.

Se procedió a inactivar los microorganismos, con formaldheido al 1%, los cuales se dejaron reposar a 37°C durante 24 horas.

Se centrifugaron las biomasas a 10,000 x g. durante 30 minutos,

después se procedió a decantar el líquido sobrenadante, para separar las dos porciones obtenidas.

Obtención de antígeno celular (WC-Ag); se obtuvo del sedimento centrifugado a 10,000 x g. Este paquete celular se lavó completamente de la siguiente manera:

-Se depositó en tubo de polietileno de centrífuga y se agregó 30 ml. de agua destilada estéril, se colocó el tubo en un agitador (Vortex-genie), y se volvió a centrifugar a 6,000 x g. durante 15 minutos; se decantó el sobrenadante.

-Después se procedió a la ruptura de las células mediante un sonicador con 16,000 de amplitud durante 20 minutos, hasta que se obtuvo una suspensión homogénea de ambas cepas.

-La solución se depositó en una membrana de diálisis, para eliminar el exceso de formaldheído, contra agua destilada, durante 72 horas.

A ambos antígenos se les determinó la proteína por el método de Lowry. (18)

PRODUCCION DE SUERO HIPERINMUNE

Para la realización de la producción de suero hiperinmune se utilizaron cuatro conejos adultos, alimentados a base de concentrado y agua *ad-libitum*.

A todos los conejos se identificaron por medio de un número en la oreja, y posteriormente se obtuvo sangre de cada animal, y se dejó que se formara el coágulo, el cual se separó del suero y fue posteriormente centrifugado a 1,500 x g. durante 10 minutos, éstos sirvieron como testigos de que estaban libres de la enfermedad.

A los conejos #1 y #2 se les inyectó intramuscularmente (IM) 0.3 ml. de WC-Ag. cepa #1, más adyuvante incompleto de Freund.

A los conejos #3 y #4 se les inyectó IM. 0.3 ml. de WC-Ag. cepa #22, más adyuvante incompleto de Freund.

La aplicación fue de intervalo de 7 días durante 5 semanas.

Se tomaron muestras de sangre a las 24 horas después de la segunda inyección; para separar el suero hasta que se haya formado el coágulo sanguíneo a 1,500 x g. durante 10 minutos, y se guardó en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis.

OBTENCION DE SUERO PROBLEMA

Se tomaron 128 muestras de sangre de ovinos con y sin lesión de piel, de diferentes regiones de México, en su mayoría del centro del país.

Se sangraron a los ovinos de la vena yugular con aguja #22 y con tubos "vacutainer" (al vacío), se separó el suero del coágulo sanguíneo, se centrifugó a 1,500 x g. durante 10 minutos, se guardó en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis.

ORIGEN	RANCHO	No. DE SUEROS c/lesión	s/lesión
D. F.	Ajusco.	08	--
Edo. de México.	Chapa de Mota.	--	20
Edo. de México.	La Palma.	--	20
Edo. de México.	La Paloma.	20	--
Edo. de México.	La Trini.	03	17
Edo. de México.	Sta. Elena.	20	--
Guanajuato.	El Dapo.	20	--

INMUNODIFUSION DOBLE EN GEL

Se prepararon porta objetos con agar purificado al 1%. más Buffer Veronal con un pH.= 8.2. más azida de sodio al 0.1 M. (ver pag. 20). se dejó gelificar, después se conservó en una cámara húmeda por 24 horas a 4°C.

Los geles se perforaron con el molde para hacer orificios de 3 mm. de diámetro y con una separación de 4 mm., con sistema de cuatro y seis fosetas periféricas para el antisuero y con una foseta para el antígeno (ver pag. 21).

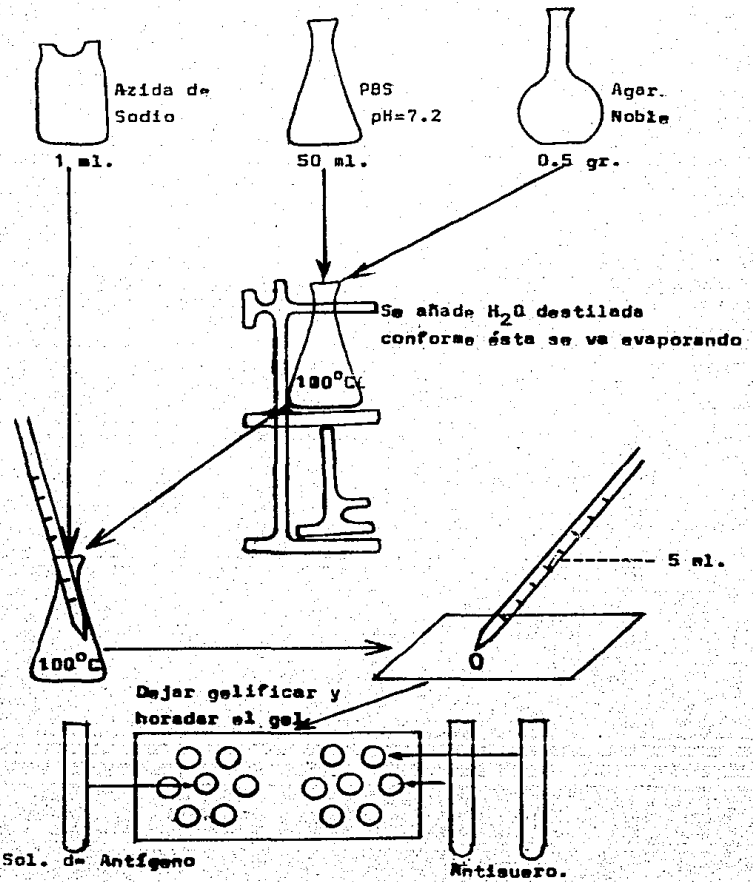
Los orificios se llenaron con pipeta Pasteur, el antígeno en el centro y los sueros alrededor.

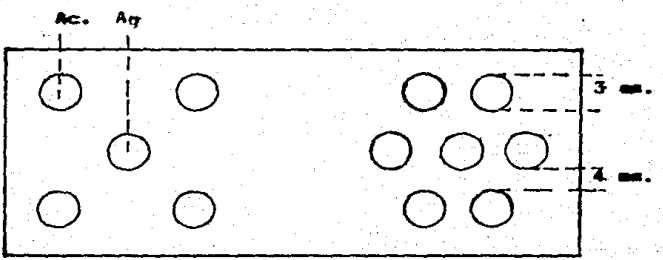
Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se dejó que se incubaran a temperatura ambiente durante 48 horas.

Las laminillas con la cámara húmeda se colocaron a temperatura de 4°C por 24 horas.

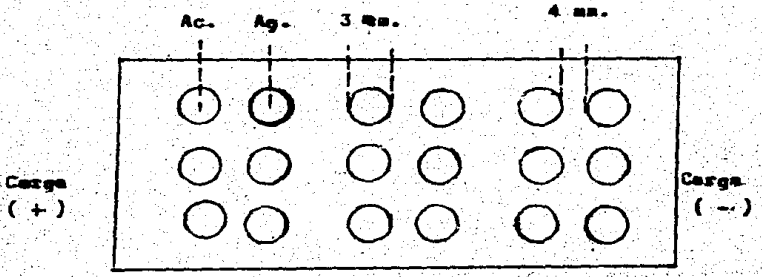
Se realizó la lectura para localizar las líneas de precipitación visibles terminada la incubación.

INMUNODIFUSION EN GEL





INMUNODIFUSION DOBLE EN GEL.



CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

Sobre una placa de plástico se colocaron los porta objetos, en ellos se depositó una solución de agar purificado al 1%, más Buffer Veronal de un pH.=8.6 y se dejó gelificar.

Se realizaron perforaciones en líneas paralelas en el agar de 3 mm. de diámetro y con una separación de 4 mm. entre cada línea (ver pag. 21).

Las muestras de suero se colocaron con pipeta Pasteur en el orificio más próximo al polo positivo (ánodo), y el antígeno en el orificio más próximo al polo negativo (cátodo).

En el recipiente de la unidad de electroforesis, se coloca la cantidad necesaria de Buffer Veronal con un pH.= 8.6.

La placa con el gel perforado, se colocó en el recipiente de la unidad de electroforesis, y se estableció el contacto entre la placa de gel y el Buffer Veronal, utilizando tiras de papel filtro. Se aplica la corriente (6-8 mAmp/laminilla) durante 1 hora 30 minutos.

Posteriormente, se coloca la placa de gel a una temperatura de 4°C por 30 minutos. Se realizó la lectura para localizar líneas de precipitación visibles al término de la incubación.

LAVADO DE LOS GELES

Los geles se enjuagaron en una solución de citrato de sodio al 5% (p/v) durante 30 minutos, con la finalidad de eliminar las líneas de precipitación inespecíficas que pudieran haberse formado durante la incubación.

Después los geles se lavan con Buffer de fosfatos (PBS) de un pH.= 8.2 durante 24 horas realizando dos cambios de PBS.

Posteriormente los geles, se sacan y se lavan con agua destilada durante 24 horas, realizando dos cambios de agua destilada.

Una vez realizados todos los lavados, los geles se deshidratan a 37°C por 24 horas.

Ya deshidratados, los geles se sumergen completamente en solución colorante negro de amido durante 30 minutos; una vez teñidos los geles se colocan inmediatamente en solución decolorante, llevando a cabo varios cambios, hasta que los geles queden lo más claros posibles y únicamente prevalezcan las líneas de precipitación visibles. (6)

La preparación de las soluciones que se utilizaron en este trabajo se encuentran anotadas en el apéndice, pag. 33.

R E S U L T A D O S

ESTUDIO BACTERIOLOGICO

De las ocho muestras teñidas con colorante de Giemsa y que son positivas a Ectima contagioso, se logró demostrar en una de ellas la gran cantidad de filamentos fragmentados del microorganismo *D. congolensis*. lo cual sugiere los resultados obtenidos por otros autores (1, 15, 36, 39), de que los dos agentes pueden estar asociados al mismo tiempo en forma natural para producir lesiones cutáneas.

De la muestra aislada #22 de ovino. a las 48 horas. al ser observada al microscopio, el frotis de tinción de Gram, su morfología resultó muy parecida a la cepa #1, no así en el aspecto de cultivo de agar sangre, que mientras la cepa #1 sus colonias presentaron una superficie rugosa y dura de remover, la cepa #22 al subcultivo, su superficie fué lisa, cremosa y brillante; aunque ambas muestras tuvieron una marcada adherencia al medio dando zonas hemolíticas del medio, propias del microorganismo.

En ambos casos. al ser comparada con la cepa de referencia (#1). la cepa aislada (#22), fue identificada mediante criterios bioquímicos: ver cuadro #1.

CUADRO #1

PRUEBA	No. de la muestra. #1	#22
Catalasa	+	+
Glucosa	+	+
Galactosa	+	+
Ureasa	+	+
Gelatina	+	+
Nitrato	-	-
Indol	-	-
Leche con tornasol	+	+

De las pruebas *in vitro* efectuadas en ambas muestras se obtuvieron los siguientes resultados:

SENSIBLE A :	RESISTENTE A :
Sulfametatoxasol	Penicilina
Lincomicina	Ampicilina
Tetraciclina	Kanamicina
Estreptomicina	Clorafenicol
Cefalosporina	
Eritromicina	
Cefotoxina	
Gentamicina	

ESTUDIO SEROLOGICO

Para la producción del antigeno (WC-Ag); la cepa #1 en BHI era más confluente, de liquido claro, en la cual predominaba más filamentos, por lo tanto fué necesario sonicar el paquete celular repetidamente hasta que se logró homogenizarlo, sin embargo algunos filamentos permanecieron intactos; mientras que la cepa #22 presentaba un liquido más turbio y con gran cantidad de zoosporas libres, por lo que se realizó una sola sonicación, puesto que fue más homogéneo desde el principio.

De la determinación de la proteína por el método de Lowry, se obtuvo los siguientes resultados de ambos antígenos:

CEPA #1	CEPA #22
- 1.074 ug/ml.	- 1.380 ug/ml.
- 0.984 ug/ml.	- 1.722 ug/ml.
- 0.780 ug/ml.	- 1.416 ug/ml.
	- 0.984 ug/ml.

En cuanto al estudio serológico, en las pruebas de I.D.D. no se observa líneas de precipitación en el antígeno #1 en todos los sueros hiperinmune de los conejos inoculados; en el antígeno #22 se observa líneas de precipitación hasta la cuarta inoculación sólo de los conejos 3 y 4, y en la quinta inoculación se observa que las líneas de precipitación 1 y 2 se

presentó un desplazamiento con el antígeno vecino. con las características de las respuestas de identidad parcial.

En las pruebas C.I.E., se observa que el antígeno #1 detectó líneas de precipitación tenues hasta la segunda inoculación con todos los sueros.

Por lo que respecta al antígeno #22 se observa que desde la primera inoculación se forman dos bandas de precipitación muy marcadas con los sueros 3 y 4, a diferencia de los sueros 1 y 2 los cuales presentan una banda de precipitación tenue después de la segunda inoculación.

En ambas pruebas de I.D.D. y C.I.E., no se observan líneas de precipitación cuando se utilizaron los sueros de ovino en su forma original.

D I S C U S I O N

El diagnóstico clínico de la Dermatofilosis plantea una serie de dificultades al confundirse con otras entidades patológicas. (1, 15, 36, 39)

En México, al encontrarse la presencia de la bacteria (33), es de suma importancia realizar el diagnóstico certero: al no diagnosticar correctamente la enfermedad, se diseminaría la bacteria, lo que ocasionaría grandes pérdidas económicas (2, 22). Además, es importante el diagnóstico temprano de la entidad al ocurrir los primeros casos clínicos, y de esta manera poder controlar la enfermedad por medio de medidas higiénicas y/o terapéuticas.

Para el aislamiento del organismo, hay que tomar en cuenta el ciclo reproductivo del mismo, puesto que presenta dos formas, de cocos (zoospora), y filamentos, aunque esta última es la forma patognomónica del agente. lo cual se debe de apoyar en pruebas bioquímicas, como lo muestra los resultados obtenidos en este estudio, en la comparación de las dos cepas. lo cual indica que se trata del mismo agente.

Por lo que respecta al estudio serológico, el antígeno #1 no presenta líneas de precipitación en la prueba I.D.D. con ninguno de los sueros hiperinmunizados, esto tal vez sea por el

tamaño y forma de los agregados antigénicos, pues tal como se mencionó en los resultados el antígeno tuvo que ser sonicado repetidamente y sin embargo algunos filamentos permanecieron intactos, esto hace que se produzca reacción en la prueba de C.I.E., donde el voltaje aplicado acelera más rápido la reacción. A diferencia del antígeno #22 en que predominaban más zoosporas libres que los filamentos, lo cual hace más fácil la difusión y precipitación con todos los antisueros y por lo tanto hay reacción de identidad parcial hasta la quinta inoculación mostrada en los resultados, en la prueba de I.D.D., indicando que las muestras ensayadas comparten un mismo determinante antigénico, y por lo tanto muestran relación aparente serológica entre las dos cepas de *D. congolensis*.

La presencia de dos líneas de precipitación que se observan en la prueba de C.I.E., con los sueros de los animales infectados experimentalmente obedece a que se han puesto de manifiesto dos determinantes antigénicos. El hecho de que el antígeno #22 presente más temprano anticuerpos precipitantes en comparación con el antígeno #1 se refleja en la cantidad de proteína que se presentaron en ambos antígenos por el método de Lowry.

Como se observa en la I.D.D. y C.I.E., en la cual el arco formado por la difusión es cóncavo alrededor del antígeno, indica que en éste, su difusión es más lenta, así como su peso molecular es mayor que el del antisuero.

Estos resultados apoyan los obtenidos por otros autores (4, 26) que *D. congolensis* estimula la producción normal de anticuerpos, y quizás resida en la pared celular y que el nivel de anticuerpos de la respuesta inmune depende de la cantidad y naturaleza del antigeno. (27)

Por otro lado, el no haber localizado anticuerpos precipitantes en las pruebas de I.D.D. y C.I.E. con los sueros problema de ovino, en comparación con los sueros control de conejo, puede ser debido al método de inmunización que se llevó a cabo, puesto que el microorganismo produce respuesta inmune local en forma natural con la consecuente producción de inmunoglobulinas (Ig) de protección epitelial y de reacción primaria (IgA e IgM); a diferencia de la forma experimental en conejos donde la inoculación IM del antigeno produzca una respuesta inmune general (IgG). Aunado esto a la falta de persistencia del microorganismo asociado a la de factores predisponentes tales como lluvia y humedad prolongada principalmente pudieran ser responsables para la diferencia de la presencia de animales seropositivos.

Así mismo es difícil comparar los reportes de la respuesta inmunológica de los animales infectados naturalmente por Dermatofilosis, porque el antigeno usado en los estudios serológicos fue preparado por varios métodos (37, 41). Estos métodos reportados indican que el uso de antigeno soluble, el

cual es el sobrenadante libre de células como el antígeno de elección para detectar anticuerpos en los animales, lo cual es muy poco probable puesto que se han encontrado que la pared celular de la bacteria, es la que produce inducción de anticuerpos y son fácilmente demostrados por la mayoría de las pruebas serológicas utilizadas. (4, 26, 27)

Pruebas más sofisticadas como el uso de E.L.I.S.A., han señalado la existencia de importantes variaciones de anticuerpos en el suero y la piel de los animales infectados: estos estudios indican que hay un aumento de anticuerpos en el suero de la subclase IgG 1 y 2, lo que ocasiona que pasen a la superficie de la piel, por un proceso trasudativo. Los títulos de IgA en el suero son bajos, sin embargo aumentan los niveles en la superficie de la piel, al igual que las IgM, esto sugiere que cualquiera se produce por extracción de la circulación cutánea como resultado del incremento vascular y permeabilidad epidérmica. (10, 19, 21, 45)

La medida de anticuerpos en la superficie de la piel pudiera en el futuro proveer una alternativa y posiblemente un método superior como una prueba en el suero para la evaluación de la respuesta a la administración local de vacunas diseminadas para aumentar la inmunidad de las enfermedades de la piel. Esto puede ser particularmente relevante para el desarrollo de la vacunación contra la Dermatofilosis.

C O N C L U S I O N

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir lo siguiente:

La forma experimental de inoculación en conejos produce anticuerpos circulantes que pueden ser demostrados por I.D.D. y C.I.E.. Los métodos de cultivo y microscópico para el diagnóstico de infecciones de *Dermatophilus congolensis* pueden auxiliar a las pruebas inmunológicas.

Se recomienda la estandarización de técnicas para la preparación de antígenos de *Dermatophilus congolensis*, con lo cual se obtendrán resultados uniformes en los lugares donde se pretenda realizar esta técnica.

Los resultados obtenidos con el suero hiperinmune de conejo en la C.I.E., tienen la ventaja de ser rápidos y confiables, en comparación con la otra prueba de diagnóstico.

No se detectaron anticuerpos en ninguno de los sueros de ovino que fueron procesados para tal fin.

Los estudios para conocer la distribución de la Dermatofilosis en nuestro país, deben continuarse.

A P E N D I C E

1.- Azida de Sodio 0.1 M.

- Azida de Sodio NaN_3 ..... 3.25 gr.
- Agua destilada ..... 1000 ml.

2.- Buffer de Fosfatos pH.= 8.2 (PBS).

- Cloruro de sodio NaCl ..... 8.00 gr.
- Fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 ..... 1.21 gr.
- Fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 ..... 0.34 gr.
- Agua destilada ..... 1000 ml.

3.- Buffer de Veronal (Barbituratos).

- Acido 5,5 dietilbarbitúrico $C_8H_{12}N_2O_3$ ..... 1.66 gr.
- 5,5 dietilbarbitúrico $C_8H_{11}N_2O_3Na$ ..... 12.76 gr.
- Agua destilada ..... 1000 ml.

4.- Citrato de Sodio 5%.

- Citrato de sodio $Na_3C_6H_5O_7 2H_2O$ ..... 5.00 gr.
- Agua destilada ..... 100 ml.

5.- Solución Colorante de Negro de Amido.

- Negro de amido (Naftaleno) ..... 1.00 gr.
- Metanol ..... 500 ml.
- Acido acético glacial ..... 100 ml.
- Agua destilada ..... 400 ml.

6.- Solución Decolorante de Geles.

- Metanol ..... 500 ml.
- Acido acético glacial ..... 100 ml.
- Agua destilada ..... 400 ml.

B I B L I O G R A F I A

1.- Abu-Samra, M. T.; Walton, G. S.; (1981): The inoculation of rabbits with *Dermatophilus congolensis* and the simultaneous infection of sheep with *D. congolensis* and ORF virus; J. Comp. Path. 91: 317-329.

2.- Alley, M. R.; Halligan, G.; (1987): Dermatophilosis as a cause of pelt defects in lambs; N. Z. Vet. J. 35: 180.

3.- Amakiri, S. F.; Nwufoh, K. J.; (1981): Changes in cutaneous blood vessels in bovine Dermatophilosis; J. Comp. Path. 91: 439-442.

4.- Bida, S. A.; Kelly, D. C.; (1976): Immunogical studies of antigenic components of *Dermatophilus congolensis*. In D. H. Lloyd and K. C. Sellers (eds.) *Dermatophilus* infection in animals and man; London, Academic press; pp. 290-342.

5.- Cervantes, O. R.; (1985): Enfermedades de los ovinos y caprinos; 1 a. ed.; Edit. Pijoan, A.; Tórtora, P.: México.

6.- Cervantes, O. R.; (1983): Studies on antigens of *Aspergillus*. their use in veterinary mycology; Ph. D. Thesis University of Glasgow.

7.- Cowan, S. T.; Steel, K. J.; (1982): Manual para la identificación de bacterias de importancia médica: 2a. ed.: Edit. Continental: México.

8.- Edwards, J. R.; Gardner, J. J.; Norris, R. T.; Love, R. A.; Spicer, P.; Bryant, R.; (1985): A survey of ovine Dermatophilosis in Western Australia; Aust. Vet. J. 62: 361-365.

9.- Egerton, J. R.; (1964): Mycotic dermatitis of cattle; Aust. Vet. J. 40: 144-147.

10.- Ellis, T. M.; Robertson, G. M.; Sutherland, S. S.; Gregory, A. R.; (1987): Cellular responses in the skin of Merino sheep to repeated inoculation with *Dermatophilus congolensis*; Vet. Microbiol. 15: 151-162.

11.- Gherardi, S. G.; Lewer, R. P.; Sutherland, S. S.; Howe, R. R.; (1984): Development of an artificial infection technique for examining the susceptibility of sheep *Dermatophilus congolensis*; Aust. Vet. J. 61: 304.

12.- Haalstra, R. T.; (1965): Isolation of *Dermatophilus congolensis* from skin lesions in the diagnosis of Streptothricosis; Vet. Rec. 77: 824-825.

13.- Hart. C. B.: (1965): Control of mycotic dermatitis with potassium aluminium sulphate: Vet. Rec. 77: 827-828.

14.- Hart. C. B.: (1961): Streptothricosis in cattle: Vet. Rec. 73: 1279-1280.

15.- Isitor. G. N.: Kazeen, H. N.; Njoku, C. O.; (1980): Frecuency of involvement of Pox Virons in lesions of bovine Dermatophilosis; Trop. Anim. Heal. Prod. 20: 5-10.

16.- Kaplan, W.: (1980): Dermatophilosis in man and lower animals: a review Proceedings of the Fifth International Conference on the Mycoses: Scientific Publication No. 396: Pan American Health Organization.

17.- Lennette, E. H.: Balows, A.; Hausler, J. W.; Truant, J. P.; (1980): Manual of clinical microbiology; 3a. ed.: Edit. American Society for Microbiology; Washington, D. C.

18.- Lowry. O. H.; (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent.: Jou. Biol. Chem. 193: 265-275.

19.- Lloyd, D. H.; Jenkinson, D. M.; Miller, P. N.; Sykes, T. J.; (1987): Sequential production of specific antibodies in serum and at skin surface of cattle following intradermal vaccination with *Dermatophilus congolensis*: Vet. Immunol. Immunopathol. 16: 251-257.

20.- Lloyd, D. H.; (1981): Measurement of antibody to *Dermatophilus congolensis* in sera from cattle in the West of Scotland by enzyme-linked immunosorbent assay: Vet. Rec. 109: 426-427.

21.- Lloyd, D. H.; Jenkinson, D. M.; (1981): Serum and skin surface antibody responses to intradermal vaccination of cattle with *Dermatophilus congolensis*; Br. Vet. J. 137: 601-607.

22.- Lloyd, D. H.; (1976): The Economic effects of bovine Streptothricosis. In D. H. Lloyd and K. C. Sellers (eds.) *Dermatophilus* infection in animals and man; London, Academic press; pp. 274-291.

23.- Macadam, I.; (1964): Observations on the effects of flies and humidity on the natural lesions of Streptothricosis: Vet. Rec. 76: 194-198.

24.- Macadam, I.; (1964): Streptothricosis in Nigerian horses: Vet. Rec. 76: 420-422.

25.- Macadam, I.; (1962): Bovine Streptothricosis: Production of lesions by the bites of the tick *Amblyomma variegatum*; Vet. Rec. 74: 643-645.

26.- Makinde, A. A.: Melokwu, J. V.: Ezeh, A. O.; (1986): Humoral antibody response to gluteraldehyde treated antigens of *Dermatophilus congolensis*; Vet. Quart. 8: 145-149.

27.- Makinde, A. A.: Majiyagbe, K. A.; (1982): Serodiagnosis of *Dermatophilus congolensis* infection by counterimmunoelectrophoresis: Res. Vet. Sci. 33: 265-269.

28.- Makinde, A. A.; (1981): Detection of *Dermatophilus congolensis* antibody in the milk of Streptothricosis infected cows: Rec. Vet. Sci. 30: 374-375.

29.- Makinde, A. A.; Ezeh, A. O.; (1981): Primary and secundary humoral immune responses in cattle experimentally infected with *Dermatophilus congolensis*: Bull. Anim. Prod. Afr. 29: 19-23.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

30.- Makinde, A. A.; (1980): The reverse single radial immunodiffusion technique for detecting antibodies to *Dermatophilus congolesis*; Vet. Rec. 106: 383-385.

31.- Makinde, A. A.; Wilkie, B. N.; (1979): Humoral and cell-mediated immune response to crude antigens of *Dermatophilus congolensis* during experimental infection of rabbits; Can. J. Comp. Med. 43: 68-77.

32.- Merchant, J. A.; Packer, R. A.; (1980): Bacteriología y Virología veterinaria; 3a. ed.; Edit. Acribia; Zaragoza, España.

33.- Merino, M. M.; Callejas, G. G.; (1988): Aislamiento del actinomiceto *Dermatophilus congolensis* a partir de un brote de Dermatofilosis en equinos en México; Vet. Méx. 19: 245-247.

34.- Merkal, R. S.; Richard, J. L.; Thurston, J. R.; Ness, R. D.; (1972): Effect of methotrexate on rabbits infected with *Mycobacterium paratuberculosis* or *Dermatophilus congolensis*; Am. J. Vet. Res. 33: 401-407.

35.- Morilla, G.; Bautista, B.; (1980): Manual de inmunología; 1a. ed.; Edit. Diana; México.

36.- Munz, E.; (1976): Double infection of sheep and goat in Kenya with ORF virus and *Dermatophilus congolensis*. In D. M. Lloyd and K. C. Sellers (eds.) *Dermatophilus* infection in animals and man; London, Academic press; pp. 57-66.

37.- Oduye, O. O.; (1974): A comparative serological study of *Dermatophilus congolensis* antigens prepared by different methods; Br. Vet. J. 130: 59-63.

38.- Oyejide, A.; Makinde, A. A.; Ezeh, A. O.; (1984): Prevalence of antibodies to *Dermatophilus congolensis* in sheep and goats in Nigeria; Vet. Quart. 6: 44-45.

39.- Podestá, M.; Mendoza, L.; Jiménez, C.; (1984): Doble infección en ovinos de Costa Rica, causada por *Dermatophilus congolensis* y virus del Ectima contagioso (ORF); Cie. Vet. 6: 17-23.

40.- Pullian, J. D.; Kelley, D. C.; Embert, H. C.; (1967): Immunologic estudies of natural and experimental cutaneous Streptothricosis infections in cattle; Am. J. Vet. Res. 28: 447-455.

41.- Richard, J. L.; Thurston, J. R.; Pier, A. C.; (1976): Comparison of antigens of *Dermatophilus congolensis* isolates and their use in serological tests in experimental and natural *Dermatophilus* infection in animals and man: London, Academic press; pp. 216-228.

42.- Roberts, D. S.; (1962): The release and survival of *Dermatophilus dermatonomus* zoospores: Aust. J. Agric. Res. 14: 386-399.

43.- Scarnell, J.; (1961): Clinical observations on dermatitis of the horse caused by *Dermatophilus* sp.; Vet. Rec. 73: 795-797.

44.- Scott, D. W.; Walton, D. K.; Smith, C. A.; Lewis, R. M.; (1984): Pitfalls in immunofluorescence testing in Dermatology III. Pemphigus-like antobodies in the horse and direct immunofluorescence testing in equine Dermatophilosis; Cornell. Vet. 74: 305-311.

45.- Sutherland, S. S.; Ellis, T. M.; Robertson, G. M.; Gregory, A. R.; (1987): Serum and skin surface antibody responses in Merino sheep given three successive inoculations with *Dermatophilus congolensis*; Vet. Microbiol. 15: 209-218.

46.- Tizard, R. T.: (1979): Inmunología veterinaria; 1a. ed.: Edit. Interamericana; México.

47.- Trigo, T. F.; (1987): Patología sistémica veterinaria 1: 54; 1a. ed.; Edit. U.N.A.M.; México.

48.- Vargas, L.; Mendoza, L.; (1982): Reseña epizootiológica de la Dermatofilosis en Costa Rica; Cie. Vet. 4: 117-120.