

19



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**"Identificación de antígenos inmunodominantes a partir
del desarrollo de una técnica para la obtención de
proteínas del
Dermatophilus congolensis".**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA:

LUCIA CARRILLO CASTRO

**ASESORES : M. EN C. ENRIQUE SALAS TÉLLEZ
M. EN C. ALMA LUCILA NÚÑEZ DEL ARCO**

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

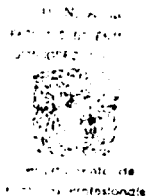
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Identificación de antígenos inmunodominantes a partir del desarrollo de una técnica para la obtención de proteínas del Dermatophilus congolensis".

que presenta La pasante: Lucia Carrillo Castro
 con número de cuenta: 8510263-1 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Abril de 2002

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u>	
SECRETARIO	<u>M.enC. Enrique Salas Téllez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dra. Gabriela Barcenas Morales</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.V.Z. Angel G. Martínez Sosa</u>	

Agradecimientos

A mis padres :

Que me dieron lo más valioso que tengo "la vida" y que me han proporcionado la inmensa felicidad de vivirla.

Con todo mi corazón para ustedes, las personas más ejemplares, que me han guiado por el camino de la dedicación y la entrega y a los que tanto quiero.

A mi esposo, hijas, hermanos, sobrinos y cuñados:

Ustedes son el complemento de la familia y forman parte de mí, hemos vivido muchas cosas juntos; y espero que eso pueda seguir.

A ti *Claudia* por tu apoyo en la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de México y a todos mis profesores por la enseñanza en mi vida profesional.

Dedicatoria

A ti *Ignacio* por todo el apoyo recibido quien con cada sonrisa y cada beso que me das, me motivas a realizar completamente todas las metas trazadas para ser cada día mejor y dame la oportunidad de vivir el sueño de ser feliz.

A mis hijas *Andrea* y *Sofía* quienes en cada momento me dan todo su amor para seguir adelante .

INDICE

Contenido	Página
Resumen.	1
I. Introducción.	2
1.1 Generalidades.	2
1.2 Morfología.	3
1.3 Animales afectados.	6
1.4 Localización geográfica.	6
1.5 Epizootiología.	7
1.6 Patogenia.	8
1.7 Patología.	12
1.8 Inmunología.	13
1.9 Diagnóstico.	14
1.10 Tratamiento.	16
2. Objetivos generales.	17
2.1 Objetivos particulares.	17
2.2 Justificación.	18
3. Material y Métodos.	19
3.1 Reconstitución de la cepa de referencia.	19
3.2 Método de extracción de proteínas solubles.	19
3.3 Análisis electroforético de las proteínas de <i>Dermatophilus congolensis</i> .	21
3.4 Producción de suero hiperinmune en conejo contra células completas de <i>Dermatophilus congolensis</i> .	24
3.5 Inmunodifusión doble en agar.	25
3.6 Identificación de la actividad antigénica de las proteínas solubles, obtenidas con SDS para el <i>Dermatophilus congolensis</i> mediante la Inmunolectrotransferencia (IET).	26
4. Resultados.	27
4.1 Reconstitución e identificación de la cepa de <i>Dermatophilus congolensis</i> ATCC 14637	27
4.2 Obtención de las proteínas solubles con amortiguador tris-lisostafín y SDS-lisostafín.	28
4.3 Identificación de las proteínas solubles mediante electroforesis PAGE-SDS.	30
4.4 Titulación de los sueros hiperinmunes anti- <i>Dermatophilus congolensis</i> , producido en conejo.	30

Contenido

Página

4.5	Inmunoelctrotransferencia.	32
5.	Discusión	35
6.	Conclusión.	38
7.	Bibliografía.	39
8.	Apéndice.	45

FIGURAS, GRAFICAS Y CUADRO

Contenido	Página
Figura 1 Ciclo evolutivo	5
Figura 2 Gel electroforético PAGE-SDS al 12 %	31
Figura 3 Inmunoelectrotransferencia	33
Gráfica 1 Curva estándar	22
Gráfica 2 Cuantificación de proteínas	29
Cuadro 1. Pesos moleculares	34

RESUMEN

La enfermedad producida por *Dermatophilus congolensis* (*D. congolensis*) es llamada *streptotricosis* o dermatofilosis. Tiene una distribución mundial afectando a muchas especies animales; no obstante, la infección se observa más frecuentemente en ganado bovino, ovino, caprino y equino.

La dermatofilosis es responsable de la muerte de un gran número de animales que la padecen. La infección se manifiesta por una invasión en las capas superficiales de la epidermis produciendo dermatitis exudativa y en ocasiones se desarrolla linfadenitis supurativa o lesión granulomatosa en la hipodermis.

La identificación de *D. congolensis* en laboratorios generalmente se basa en el hallazgo en la tinción de Gram y Giemsa de las estructuras morfológicas específicas y el crecimiento en los medios de cultivo para *D. congolensis*, características definitivas se determinan con ciertas propiedades bioquímicas.

Los antígenos de *D. congolensis* que están involucrados en una respuesta inmunológica no han sido bien definidos, en el presente trabajo se identificarán los antígenos inmunodominantes con las cepas de referencia.

Para tal efecto se realizó la separación electroforética de las proteínas que constituyen al *D. congolensis* en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS); se presentaron bandas, con pesos moleculares que van de 125 a 7.5 kDa, posteriormente se realizó el reconocimiento de los antígenos inmunodominantes por la técnica de inmunoelectrotransferencia, con la cual se empleó suero hiperinmune producido contra éste actinomiceto en conejos; las bandas reconocidas fueron las siguientes: 111, 84, 62, 35, 33, 29, 23, 18, 14, 11, 8.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES.

La infección provocada por *Dermatophilus congolensis* (dermatofilosis) es una enfermedad de la piel, puede ser aguda, subaguda o crónica afectando a un amplio rango de especies animales y al hombre. Esta tiene una distribución mundial con mayor prevalencia en regiones húmedas, tropicales y subtropicales (Zaria, 1993).

La dermatofilosis fue reportada en 1910 por Van Saceghem, esta infección fue descrita como una enfermedad específica del ganado bovino en el antiguo Congo Belga y el agente que la provoca se le denominó *Dermatophilus congolensis* (*D. congolensis*) (Pospisil y cols., 1992; Holt y cols., 1995).

La dermatofilosis es considerada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) como una de las cuatro principales enfermedades bacteriológicas que afectan al ganado vacuno y otros animales como ovejas, caballos y cabras: consecuentemente afecta el desarrollo de la ganadería en regiones tropicales especialmente en África en donde fue reportada también la infección natural en camellos (Sanders y cols., 1991).

Esta infección es también conocida bajo diferentes nombres dependiendo de la especie hospedadora y de su apariencia clínica. La patogénesis del *Dermatophilus* no es bien comprendida (Zaria, 1993), los factores de virulencia de *D. congolensis* no han sido definidos; sin embargo, *D. congolensis* es hemolítico en agar con sangre desfibrinada de carnero (Skalka y Pospisil, 1993), produce fosfolipasas (Masters y cols., 1997) y enzimas proteolíticas (Hanel y cols., 1991; Ellis y cols., 1993; Hermoso de Mendoza y cols., 1994).

A la dermatofilosis se le ha conocido con diferentes nombres, principalmente en relación con la especie afectada, y su apariencia clínica. Van Saceghem (Pospísil y cols, 1992) le llamó dermatitis contagiosa (dermatose contagieuse) (Hyslop, 1980; Zaria, 1993). En bovinos y ovinos se le llamó dermatitis micótica (Carter, 1986; Cervantes, 1986; Roberts, 1963, 1967). En ovinos, cuando la enfermedad se presenta en áreas con lana, se le llama lana apelmazada o "lumpy wool" (Cervantes, 1986). También se nombró dermatitis nocardial y nocardiosis cutáneas; sin embargo, la *Nocardia* no está involucrada en la infección. El término de estreptotricosis cutánea, tampoco es adecuado, ya que indicaría que la causa sería *Streptothrix spp.* Patológicamente a la dermatofilosis se le nombró dermatitis proliferativa o "strawberry foot-root", términos descriptivos, que no en todos los casos de la enfermedad se presentan (Zaria, 1993).

Finalmente se emplea en la actualidad el término dermatofilosis, es un nombre común para esta infección en todas las especies afectadas (Radostits, 1994).

Originalmente el agente etiológico de la dermatofilosis fue nombrado *D.congolensis*; posteriormente se designó como *Actynomices dermatonomus*, *Actynomices congolensis* y *Streptothrix bovis*; actualmente está clasificada dentro de la familia Dermatophilaceae con un solo género *Dermatophilus* (Austwick, 1985). Algunos autores han estudiado el género *Dermatophilus* tratando de ampliarlo con otras dos especies *D. pedis* y *D. dermatonomus*. No obstante, estudios serológicos y bacteriológicos demostraron que son cepas de *D. congolensis* siendo así la única especie del género (Pijoan y Tórtora, 1986).

1.2 MORFOLOGÍA.

Es una bacteria Gram positiva, microaerofílica, filamentosa; presenta características especiales en cuanto a su forma de reproducción. El estado infectivo son cocos móviles llamados zoosporas que son atraídos hacia lesiones

microscópicas del estrato córneo donde proliferan hasta formar filamentos largos mal nombrados micelios; estos filamentos se dividen en paquetes de zoosporas las cuales pueden permanecer en las costras formadas y pueden sobrevivir por periodos muy prolongados cuando las condiciones son favorables, los paquetes son liberados produciendo nuevas infecciones. La germinación de la espora da lugar a un micelio de filamentos estrechos y puntiagudos con ramificaciones laterales en ángulo recto, al trazarse los tabiques longitudinales, los filamentos se abren desde su diámetro inicial de 0.5 a 1.5 μm , siempre adelgazándose distalmente. La formación de enjambres de zoosporas cocoides móviles completa el ciclo, tal como se ilustra en la Figura 1 (Nicolet, 1985).

Las estructuras cocoides pueden permanecer latentes en la piel. Las zoosporas latentes son resistentes a desecación y pueden ser viables aun cuando éstas son expuestas a 100°C por 30 min. Se ha encontrado que las zoosporas vuelven a ser móviles a las 24 h de que se restablezcan las condiciones adecuadas de humedad y temperatura (Roberts, 1963).

Sin embargo, las zoosporas no son muy resistentes a cambios osmóticos o de pH fuera de la costra y consecuentemente su viabilidad decrece rápidamente con algunas horas de secado, varias de éstas, pueden ser recuperadas (Roberts, 1963).

En medios de cultivo que posteriormente se mencionarán *D.congolensis* crece favorablemente en aerobiosis a 37°C, también se ha encontrado que su crecimiento se estimula con concentraciones del 5-10 % de CO₂ (Abu-Samara y cols., 1976).

El aislamiento de *D.congolensis*, puede hacerse a través de la liberación de zoosporas, con la humectación de la misma y en la quimiotaxis de las zoosporas al CO₂ (Cervantes, 1986).

Ciclo evolutivo de *D. congolensis*

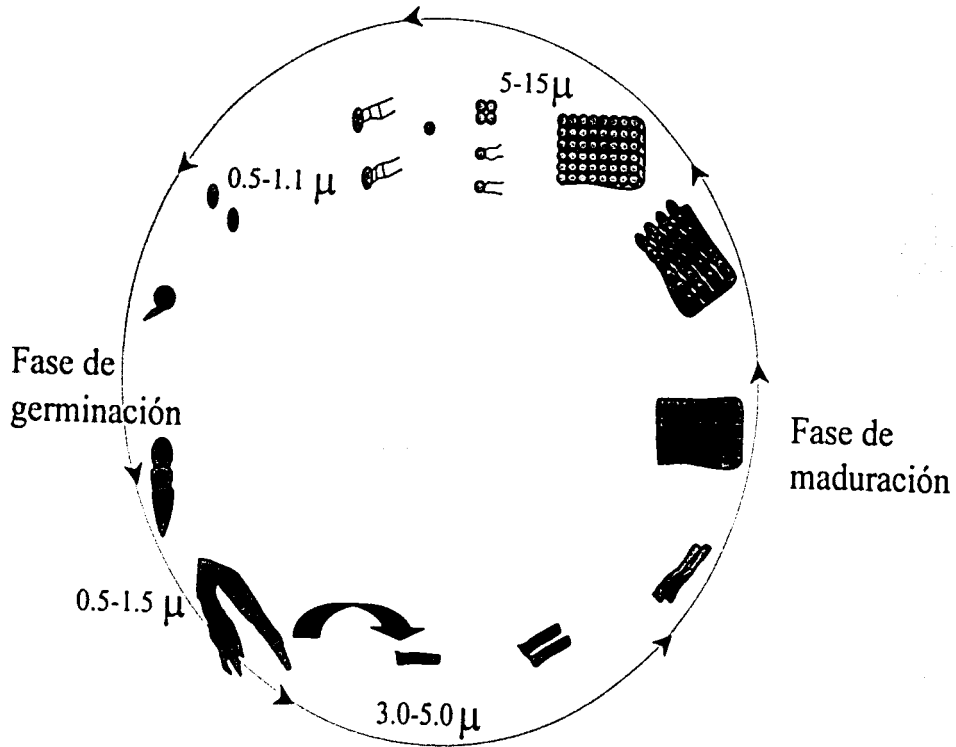


Figura 1. Nicolet (1985)

1.3 ANIMALES AFECTADOS

La dermatofilosis se identificó por primera vez en el ganado vacuno, desde entonces se ha descrito, en una gran variedad de mamíferos terrestres, acuáticos y en animales domésticos (bovinos, borregos, caballos, mulas, burros, perros, gatos, cerdos, camellos y cabras) y silvestres (Abu-Samara y cols., 1976).

En animales silvestres se incluyen: focas, reptiles (víboras y lagartijas), venados, búfalos, cebras, canguros, monos, jirafas, antílopes y osos polares, se ha reproducido experimentalmente, la dermatofilosis en ratones y ratas (Montali, 1975; Horowitz, 1992; Lloyd, 1982 y Woodman, 1990).

En el hombre, la dermatofilosis también se ha descrito (Hyslop, 1980).

1.4 LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA

La enfermedad se encuentra distribuida mundialmente (Hyslop, 1980), aunque se considera endémica en Nigeria, Ghana, Senegal, Gambia, Israel, y Zaire (Bida, 1976). También se ha reportado en Kenia, Uganda, Madagascar, Sudán, Angola, Botswana, Malawi, Mozambique, Namibia, Zambia y Zimbabwe (Abu-Samara y cols., 1976). En Europa (Gran Bretaña, Holanda, Bulgaria, Francia y Noruega) se han descrito casos de dermatofilosis (Lloyd y cols., 1982). En América, se han reportado en México, EE.UU., Canadá, islas del Caribe (Martinica, Guadalupe y San Martín), Antigua, Puerto Rico, Costa Rica, Brasil, Argentina, Chile, Uruguay y Colombia (Mendoza, 1986). También existen casos descritos de dermatofilosis en Australia, Nueva Zelanda, Nueva Guinea, India y Hong Kong (Montali y cols., 1975).

1.5 EPIZOOTIOLOGÍA

La presentación de la dermatofilia ha sido extensamente estudiada en los países donde ésta representa un grave problema para el ganado por las pérdidas económicas asociadas a los daños de la piel (Bida y cols., 1976).

Se conoce que existen factores predisponentes y desencadenantes para su presentación, todos ellos interactúan bajo diferentes ambientes (Bida y cols., 1976).

Los factores predisponentes incluyen: precipitación pluvial, humedad, altas temperaturas ambientales, presencia de diferentes especies en un mismo hábitat, presencia de ectoparásitos, aves, vegetación, pigmentación cutánea, métodos de ordeño, desnutrición y estrés (Bida y cols., 1976).

La época de lluvias y los climas tropicales y subtropicales parecen ser factores determinantes para la presentación de la dermatofilia (Bida y cols., 1976). Sin embargo Oduye, en 1975 en Nigeria no encontró esta predisposición a la enfermedad en bovinos.

La enfermedad es más común en regiones tropicales y subtropicales donde puede provocar grandes pérdidas económicas; por ejemplo, se ha reportado que la dermatofilia afecta el ganado bovino teniendo un gran impacto principalmente en la producción de ganado lechero en Zambia (Samui y Hung-Jones., 1990).

El daño a la lana provoca severas pérdidas económicas representadas por una disminución del 39% de su valor y un 40% en el valor de la piel; además, ésta enfermedad tiene gran impacto en la reproducción del ganado vacuno, producción de leche y carne (Radostits, 1994; Samui y Hugh.Jones, 1990; Wilkinson, 1979).

Estudios realizados en ganado de África reportan prevalencia de aproximadamente el 15% con un porcentaje de infección del 100% en algunos hatos. En climas templados la enfermedad es esporádica, pero puede representar un factor de considerable importancia económica en manadas y rebaños; donde existen factores predisponentes que resulten en una alta prevalencia de la enfermedad (Radostits, 1994).

Animales de todas las edades son susceptibles, incluyendo lactantes de pocas semanas de nacidos. En los animales jóvenes la infección inicia en el hocico probablemente debido al contacto directo con el cuerpo de la madre al momento de alimentarse (Radostits, 1994). Se ha comprobado experimentalmente que la mal nutrición de animales jóvenes influye en una mayor predisposición a la infección por *D. congolensis* (Sanders y cols., 1990), afectando también los resultados obtenidos en la aplicación de vacunas (Sanders y cols., 1991).

1.6 PATOGENIA

Existen muchas incógnitas sobre el conocimiento de la patogenia de la dermatofilia, se sabe que las costras y escamas de animales infectados generalmente contienen elementos vivos de *D. congolensis*; cuando los animales están sanando las costras y escamas se desprenden, sugiriendo que un animal enfermo podría infectar a otros (Pijoan y Tórtora, 1986). No obstante, puede presentarse una actividad inhibitoria para el crecimiento *in vitro* de *D. congolensis* por sustancias producidas como proteasas alcalinas, proteasas naturales y bacitracina por bacterias comensales aisladas de piel de ovejas clínicamente sanas, como *B. pumillus*, *B. licheniformis*, *Bacillus spp.* *B. megaterium* y cocos Gram positivos como *Staphylococcus epidermidis*. La alta densidad de población comensal se reconoce como *Bacillus spp.*, los cuales producen sustancias en concentraciones bacteriostáticas o bactericidas para *D. congolensis in vivo*. (Kingali y cols., 1990).

Estudios efectuados en Australia demostraron que *D. congolensis* sobrevive muy poco cuando cae en un ambiente donde existe competencia microbiana. El conocimiento de ésta enfermedad sugiere que en la mayoría de los casos un animal enfermo es la fuente de la infección. Además se ha sugerido que la transmisión del agente puede estar dada por vectores tales como garrapatas, moscas y otros artrópodos. No obstante, queda mucho por estudiar a cerca de la transmisión del agente de un hospedero a otro. Algunos otros factores tales como la humedad prolongada por lluvias constantes, o bien pequeñas lesiones en la piel favorecen la presentación de la enfermedad (Pijoan y Tórtora, 1986).

La infección por *D. congolensis* ocurre cuando el organismo vence las tres barreras que protegen la piel: 1) el estrato córneo, 2) la epidermis donde se encuentra el pelo o la lana y 3) la capa sebosa. Cuando el microorganismo atraviesa estas barreras se multiplica en la epidermis, la cual se separa de la dermis como un resultado de infiltración, caracterizada por la formación de exudado. El organismo se encuentra rara vez en la dermis, excepto cuando infecta folículos pilosos. Se ha reportado que la hifa de *D. congolensis* es invasiva y ejerce la fuerza mecánica necesaria para penetrar las células epidermales (Zaria, 1993).

Los mecanismos de invasión pueden ser bloqueados mediante la estimulación de anticuerpos específicos de isotipo IgM e IgG₂ que favorecen la inmovilización de las zoosporas en la superficie de la piel en rumiantes previamente inmunizados. La hifa es la etapa del ciclo biológico más estrechamente relacionada con la permanencia del microorganismo vivo en la epidermis (Jenkinson y cols., 1989).

Análisis de las características bioquímicas, morfológicas y de cultivo fueron determinados para establecer su relación con factores de patogenicidad. Así se tiene que cepas que presentaron actividad hemolítica y enzimática contra caseína y lípidos tienen relación con la infectividad (Ellis y cols., 1993).

En crecimiento *in vitro* la hifa secreta enzimas proteolíticas al medio de cultivo, dicha actividad proteolítica se ha asociado con la virulencia de *D.congolensis* (Ambrusen, 1996). Se puede presentar una invasión bacteriana secundaria y producir una supuración extensa y una toxemia severa (Radostits, 1994), o bien producirse una infección simultánea por virus. Se ha reportado que la dermatofilia puede estar asociada con el virus de ecticma contagioso en borregos (Tórtora y cols., 1991).

En las etapas subsecuentes de la infección ocurre una extensa proliferación en la raíz del folículo piloso, lo cual probablemente represente el sitio inicial de infección en la enfermedad natural (Radostits, 1994). Resultados experimentales han establecido que *D.congolensis* causa granulomas y abscesos en la epidermis (Jubb y cols., 1985). Las lesiones granulomatosas consisten en colonias bacterianas en el centro rodeadas principalmente por neutrófilos, macrófagos y células epiteliales (Momotani y cols., 1984).

En la respuesta inflamatoria mediada principalmente por neutrófilos, se inhibe la penetración profunda de *D.congolensis*, a las 24 horas pos-infección, la regeneración epidermal se establece y después de 36 horas la epidermis esta totalmente regenerada. La presencia de la bacteria estimula un proceso de degradación de queratina en la epidermis debido a la producción y excreción de exoenzima; así la bacteria invade el epitelio convirtiendo al folículo capilar en un reservorio permanente estimulándose así otra respuesta inflamatoria (Hanel, 1991 y Jubb 1985).

La infección por *D.congolensis*, se ve favorecida por la quimiotaxis que tiene el bióxido de carbono (CO₂) en la superficie de la piel, atrayendo las zoosporas móviles al estrato córneo (Lloyd, 1982).

El desarrollo de la dermatofilosis en las diferentes especies animales, ha sido revisada por varios investigadores, principalmente en los bovinos, ratones y ratas (Koney y cols., 1994).

Sin embargo, aún se desconocen varios aspectos para la presentación de la enfermedad (Cervantes, 1986). Como se mencionó anteriormente, se ha confirmado que existen factores predisponentes tales como: edad, sexo, pigmentación, enfermedades concomitantes, flora de la piel y estrés (Rosser, 1995).

Las observaciones en cuanto a la edad de los animales afectados, no parecen coincidir, ya que algunos investigadores sostienen que los bovinos adultos son más susceptibles que los jóvenes, mientras otros mencionan que no hay predisposición de edad (Bida y cols., 1976).

Pascoe (1972), menciona que caballos de diferentes edades son igualmente susceptibles a la dermatofilosis. La información publicada en cuanto al sexo afectado en mayor proporción, tampoco es concluyente; sin embargo, algunos autores señalan que en bovinos, los machos son más susceptibles a la infección que las hembras (Bida y cols., 1976).

Con lo que respecta a la pigmentación de la piel, algunos investigadores han demostrado que razas con piel poco pigmentada, son más susceptibles que aquellas con más pigmentación. Esto, probablemente se asocia a que se desarrolle primariamente una dermatitis solar y consecuentemente suceda la infección por *D. congolensis* (Bailey y Scott's, 1990).

Existe predisposición a la dermatofilosis cuando el animal esta cursando con otra enfermedad, en bovinos y ovinos se han estudiado casos de tripanosomiasis, ecticma contagioso, estrongilosis, babesiosis e histoplasmosis, con desarrollo de dermatofilosis (Hyslop, 1980).

En otras especies se ha visto dermatofilosis asociada a la desnutrición y a ectoparásitos (garrapatas, moscas, moscas hematófagas) (Hyslop, 1980).

En el estrés, la liberación de corticoesteroides, contribuyen a la regulación negativa de la inflamación y de la respuesta inmune, favoreciendo la infección de *D. congolensis* (Bida y cols., 1976).

Oduye (1975), en bovinos observó que la piel intacta de éstos, no era infectada por *D. congolensis*, demostrando la importancia de la presencia de lesiones previas para el desarrollo de la dermatofilosis. En un estudio experimental en ratones, también encontraron que estos con piel intacta eran más resistentes a la infección por *D. congolensis* (Lloyd y Noble, 1982).

La transmisión por contacto directo, es la principal vía de contagio entre especies (Hyslop, 1980). Sin embargo, también puede ser de forma indirecta (Smith, 1972), *D. congolensis* sobrevive en costras secas, por largos periodos, los animales también se pueden infectar a través de baños desparasitantes por inmersión (baños garrapaticidas); en éste caso, las escamas y costras contaminadas liberan zoosporas por acción de la humedad, contaminando el agua del baño (Cervantes, 1986). Los investigadores también han informado de presentaciones congénitas de la dermatofilosis en los becerros y los corderos, lo que sugiere una infección intrauterina (Ellis, 1993).

1.7 PATOLOGIA

La dermatofilosis en ovinos, es causada cuando se afectan las partes cubiertas con lana, los signos tempranos de la infección son observados como áreas eritematosas seguidas de exudado con formación de costras las cuales se separan de la piel cuando la lana crece, es posible que éstas costras permanezcan unidas a la lana, o bien si las fibras de la lana se rompen las costras pueden desprenderse considerándose esto como una posible fuente de infección

(Pijoan y Tórtora, 1986). En casos crónicos las costras y las fibras unidas a ellas pueden permanecer pegadas a la piel produciendo con ello un engrosamiento y endurecimiento de la misma. Si es removido este material es común observar úlceras con puntos hemorrágicos que le dan la apariencia de fresa, de ahí que a ésta infección se le da el nombre de pudrición en fresa o Dermatitis proliferativa (Pijoan y Tórtora, 1986).

La dermatofilia afecta la reproducción animal en varias formas, en 1983 se reportaron algunos casos de esterilidad en toros que presentaban infección escrotal generalizada y espermatogénesis anormal. Las vacas pueden sufrir de atrofia de ovarios como resultado de un efecto debilitante general, provocado por la infección. Se ha observado también que las lesiones que se presentan en el vientre de las vacas a menudo afectan las ubres provocando con esto la formación de costras haciendo casi imposible que amamante a los animales lactantes, esto eventualmente conlleva a un bajo crecimiento de los animales lactantes y puede resultar letal para animales jóvenes (Samui y Hugh-Jones; 1990).

En humanos, la enfermedad ha sido reconocida en varias formas y algunos investigadores creen que *D. congolensis* puede estar asociado con queratólisis, además se ha observado que la dermatofilia produce una dermatitis pustular dolorosa aguda. Recientemente la bacteria ha sido identificada microscópicamente en la lesión de queratólisis demostrándose que es el agente causal de esta enfermedad asintomática erosiva, la cual es confinada primeramente al estrato córneo de la piel (Albrecht y cols., 1974). Sin embargo, la enfermedad no es muy reportada en humanos, por lo tanto se tiene poco conocimiento de la relación de éste agente infeccioso (Noble y cols., 1980).

1.8 INMUNOLOGIA

Se sabe que la susceptibilidad de los animales esta dada por las deficiencias en los mecanismos de protección inespecífica. Sasiak y cols., en

1993 han enfatizado que defectos en la inmunidad mediada por células granulocíticas, macrófagos y células asesinas incrementan la susceptibilidad a la dermatofilia en ratones gnotóbicos con deficiencia inmune; en contraste, aquellos ratones alérgicos con deficiencia de células T fueron menos susceptibles a padecer la infección (Sasiak y cols., 1993).

La inmunología de la dermatofilia no está bien dilucidada; no obstante estudios en la materia se han enfocado principalmente a la serología como evidencia, así como también a la investigación de sus componentes antigénicos como posible herramienta para el diagnóstico. El uso de técnicas de biología molecular y de anticuerpos monoclonales para estudiar los antígenos de *D.congolensis* así como la evaluación de la respuesta inmunológica durante la infección puede ayudar a establecer un diagnóstico efectivo para aquellos animales que presentan dermatofilia (Zaria, 1993; How y cols.,1988). Los antígenos que provocan una respuesta inmunológica no han sido bien definidos, estos podrían ser algunos de los factores de patogenicidad o virulencia que presenta la bacteria (Ambrusen, 1996).

1.9 DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico primario de dermatofilia está basado en los signos clínicos de la enfermedad, principalmente en la aparición de lesiones características sobre el cuerpo de animales infectados. La demostración de la presencia del microorganismo en una observación directa al microscopio de la muestra teñida con Gram o Giemsa son importantes para el diagnóstico presuntivo (Pijoan y Tórtora, 1986). La prueba confirmativa de la enfermedad se puede hacer mediante el aislamiento del microorganismo por cultivo en medios bacteriológicos y su posterior identificación mediante un perfil de pruebas bioquímicas. La inoculación del material obtenido de animales infectados de laboratorio como conejos, cobayos o ratas se realiza con el fin de provocar la infección experimentalmente; la evaluación del tipo de lesión patognómica de esta bacteria

se emplea como una forma de diagnóstico. Se ha reportado también que *D. congolensis* puede propagarse en embriones de pollo, especialmente si la fuente de donde se obtiene no está muy contaminada por otros microorganismos, adicionalmente se ha empleado en el diagnóstico de la enfermedad (Zaria, 1993).

Para el examen microscópico de las muestras es necesario preparar frotis gruesos teñidos con el colorante de Giemsa aunque también se puede utilizar azul de metileno o colorante de Wright. El material clínico puede ser cultivado por estría directamente a un medio sólido o bien, puede ser pulverizado primeramente en un mortero, diluyéndose con solución salina fisiológica y después ser inoculado en un medio enriquecido como agar sangre o agar infusión cerebro corazón (BHI) para el crecimiento de la bacteria (Pijoan y Tórtora, 1986). Esta bacteria no crece en medios de Sabouraud ni en medios que contengan antibióticos (Bailey y Scotts, 1990). A pesar de esta condición, se han desarrollado dos medios para el aislamiento del *D. congolensis* los cuales contienen combinaciones de metanosulfonato de colisistina, ácido nalidíxico, nistatina y verde de malaquita (Wekhe, S. N., 1989).

Se ha reportado que las cepas del *D. congolensis* crecen bien aeróbicamente a 37°C se ve favorecido por 10% de CO₂ en los medios selectivos mencionados anteriormente. Se ha observado también un crecimiento abundante empleado medio de Loeffler. Las colonias observadas son irregulares de color amarillo con una textura granular y presentan β hemólisis después de 24 horas a 37° C en agar sangre de camero desfibrinada (Bailey y Scotts, 1990). Las colonias de aislamientos frescos comienzan a hacerse mucoides aproximadamente a las 72 horas (Lennette, 1987). Las pruebas bioquímicas son , catalasa (+), ureasa (+), hidrólisis de caseína (+), maltosa (+), lactosa (-), glucosa (+), sacarosa (-) entre otras representan una buena herramienta en el diagnóstico acertado de *D. congolensis* (Carter y Cole, 1990).

Se ha propuesto también que el empleo de la técnica de conrainmunolectroforesis resulta ser un método útil y efectivo en el diagnóstico de la infección por esta bacteria (Makinde y Majiyagbe, 1982).

1.10 TRATAMIENTO.

D. congolensis es susceptible a muchos antibióticos; no obstante, la reinfección es relativamente frecuente debido a que la dosis terapéutica fracasa para alcanzar al microorganismo en las costras que presentan una distribución dispersa. Para controlar la infección, el tratamiento de casos clínicos debe ser probado con antibióticos capaces de alcanzar niveles séricos bactericidas sin riesgo de toxicidad para el animal (Hermoso de Mendoza y cols., 1994).

El tratamiento de la infección se realiza de forma individualizada, administrándose antibióticos por vía parenteral en dosis única. Las tetraciclinas de (5mg/kg de peso) y (20mg/Kg de peso) ofrecen excelentes resultados en ganado vacuno y ovejas. La penicilina y la estreptomina en altas dosis (70 mg de estreptomina y penicilina procaínica G 70.000 unidades / kg de peso) se han recomendado con un 100% de eficacia en ovejas con infección generalizada (Scrivener y Vizard, 1995).

La ciclofosfamida administrada oralmente en dosis de 25 mg/kg de peso, solo representa un tratamiento efectivo en el 77% de los casos; cuando este tratamiento se combina con penicilina y estreptomina por vía parenteral el porcentaje de recuperación se incrementa hasta 93% (Radostits, 1994).

2. Objetivos generales:

Establecer las condiciones necesarias para la obtención de los antígenos de *D. congolensis*, posteriormente determinar su perfil proteico e identificación de proteínas inmunogénicas para el conejo.

2.1. Objetivos particulares:

2.1.1 Extraer proteínas solubles de *D. congolensis*.

2.1.2 Determinar el patrón electroforético de las proteínas solubles del *D. congolensis* utilizando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).

2.1.3. Producir suero hiperinmune en conejo contra células completas de *D. congolensis*.

2.1.4. Titular suero hiperinmune mediante la técnica de inmunodifusión doble en agar.

2.1.5. Estandarizar la técnica de Inmunolectrotransferencia (IET) para proteínas solubles del *D. congolensis*.

2.2. JUSTIFICACION

La infección causada por *D. congolensis* (dermatofilosis) es una enfermedad que afecta principalmente a bovinos, ovinos y equinos. Es de gran importancia económica en regiones húmedas tropicales donde se presentan severos daños económicos afectando principalmente la producción de leche y carne. Actualmente el diagnóstico es de tipo clínico basándose en la observación de las lesiones; sin embargo, éste no es confiable; es por ello que surge la necesidad de evaluar nuevos métodos que permitan establecer un diagnóstico rápido y certero. La evaluación de los antígenos específicos asociados con la infección puede ser una alternativa ideal, debido a que la información publicada acerca de la caracterización antigénica de *D. congolensis* es mínima. Por lo tanto, como una fase inicial el presente trabajo pretende determinar el perfil proteico de *D. congolensis*, reconociendo los antígenos inmunodominantes, los cuales en un futuro pueden ser empleados con fines diagnósticos e inclusive profilácticos.

3. Material y Métodos

3.1 Reconstitución de la cepa de referencia.

Se reconstituyó la cepa de *D. congolensis* ATCC 14637 con 2 ml de caldo BHI, se inoculó con una asada de la cepa reconstituida en dos tubos con caldo BHI y dos cajas de agar sangre. Las condiciones de crecimiento fueron de 72 horas a 37°C y 10% de CO₂ (Estufa de CO₂, Thermolyne).

Para el examen microscópico de *D. congolensis* fue necesario preparar frotis gruesos teñidos con las tinciones de Giemsa y Gram (Bailey y Scotts, 1990).

A partir de los crecimientos obtenidos se procedió a la identificación de éste, utilizando las pruebas bioquímicas como catalasa, ureasa, glucosa, lactosa, maltosa (Carter y Cole, 1990).

3.2 Métodos de extracción de proteínas solubles con lisostafin (PSL) del *D. congolensis*.

3.2.1 Método de extracción de proteínas solubles del *D. congolensis* con amortiguador Tris- Lisostafin (Makinde y Gyles, 1999). Se trabajaron 200 mg de células completas de *D. congolensis*, a las cuales se les agregó 1 ml de amortiguador Tris 50 mM, NaCl 1N pH de 7.8 con el cual se realizaron 3 lavados centrifugando a 7000 x g por 15 minutos cada uno.

Al precipitado se le agregó 0.5 ml de acetona fría, dejándolo en baño de hielo por 5 minutos, posteriormente se centrifugó y se tiro el sobrenadante y al precipitado se le evaporaron los residuos de acetona por 15 min.

El precipitado fue resuspendido nuevamente con 0.5 ml de amortiguador Tris 50 mM, NaCl 0.145 M y Tritón X-100 al 2%, pH de 7.8; posteriormente, se incubó toda la noche en agitación continua a 37°C. 12 horas después, se centrifugaron las células a 10 000 x g por 15 min y se obtuvieron en el sobrenadante las proteínas de membrana de superficie (PMS), y se guardaron a -20°C. Con la finalidad de poder obtener así las proteínas solubles, el precipitado se resuspendió con 0.5 ml de amortiguador Tris 50 mM, NaCl 0.145 M y 70 µg/ml de lisostafin (Lysostaphin L7386: Sigma Chemical Company), dejándolo toda la noche en agitación continua a 37°C y posteriormente centrifugando, para así obtener en el sobrenadante las proteínas solubles con lisostafin (PSL) del *D. congolensis*.

3.2.2. Método de extracción de proteínas solubles para el *D. congolensis* con dodecil sulfato de sodio - lisostafin (SDS-lisostafin). Se trabajaron 200 mg de células completas de *D. congolensis*, a las cuales se les agregó 1 ml de SDS 50 mM, NaCl 1N pH de 7.8 con el cual se realizaron 3 lavados centrifugando a 7000 x g por 15 minutos cada uno. Al precipitado se le agregó 0.5 ml de acetona fría, dejándolo en baño de hielo por 5 minutos, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante y se evaporaron los residuos de acetona por 15 minutos al precipitado.

El precipitado fue resuspendido nuevamente con 0.5 ml de SDS 50mM, NaCl 0.145 M y Tritón X-100 al 2%, con un pH de 7.8; posteriormente, se incubaron toda la noche en agitación continua a 37°C. Después de 12 horas se centrifugaron las células a 10 000 x g por 15 min y se obtuvieron en el sobrenadante las proteínas de membrana de superficie (PMS), se guardaron a -20°C. El precipitado se resuspendió con 0.5 ml de SDS 50 mM, NaCl 0.145 M y 70 µg/ml de lisostafin, el cual se dejó toda la noche con agitación continua a 37°C para poder obtener así las proteínas solubles (PSL) en el sobrenadante.

3.3 Análisis electroforético de las proteínas de *D. congolensis*.

Previo al corrimiento electroforético se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976) a las fracciones solubles obtenidas por ambos tratamientos amortiguador tris-lisostafín, SDS-lisostafín.

Se realizaron las electroforesis en gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sodio (PAGE-SDS) al 12% siguiendo la técnica descrita por Laemmli (1970); posterior a la polimerización tanto del gel de separación al 12% como del de concentración al 4% (ver apéndice) se adicionó a la cámara de electroforesis un amortiguador de corrimiento.

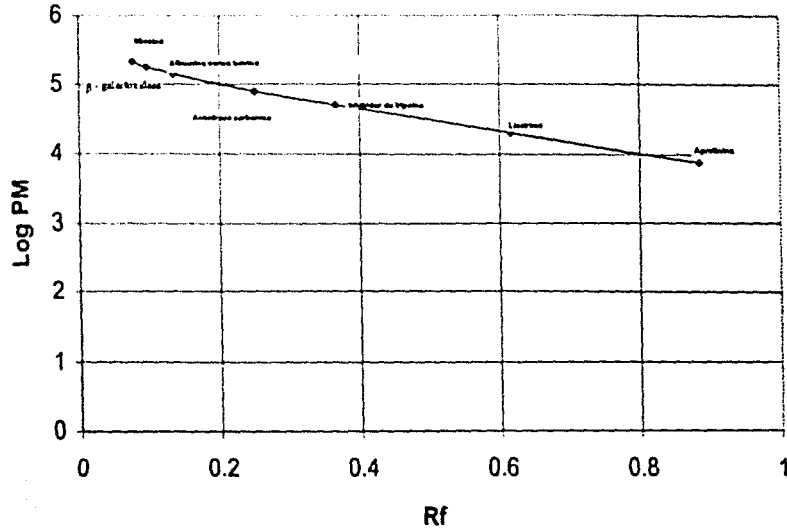
Las células completas y las proteínas solubles de *D. congolensis* obtenidas en ambos tratamientos se diluyeron en una relación 1:1 con una solución digestora (ver apéndice) sometiéndolos 5 minutos a ebullición en baño maría, todas las muestras se colocaron en los pozos poniendo [83.9 µg/ml] de cada una.

Las condiciones de corrimiento fueron a un voltaje constante de 100 volts durante 90 minutos.

Posteriormente al corrimiento se tiñeron las bandas de proteínas presentes en el gel, para lo cual se colocó en la solución de azul de Coomassie (ver apéndice) durante 24 horas, después se decoloró con la solución desteñidora (ver apéndice) durante 3-4 horas.

A partir del gel de corrimiento electroforético se construyó una curva estándar con los datos de las proteínas de marcadores de peso molecular conocido. Esta curva se realizó trazando el coeficiente de movilidad relativo (Rf) de cada proteína estándar contra el Log de KiloDaltons (kDa) (ver gráfica 1).

Gráfica 1. Curva estándar para la determinación de peso molecular de proteínas en PAGE-SDS.



Rf:- Desplazamiento que tiene una muestra con respecto a la distancia total que recorre la muestra (Frente de corrimiento). Esto se puede expresar de la siguiente manera:

$$Rf = \frac{\text{Distancia de migración de cada proteína}}{\text{Distancia total del frente de corrimiento.}}$$

Los pesos moleculares determinados en kDa tanto de las proteínas solubles como el de los marcadores preteñidos se obtuvieron interpolando cada uno de los Rf sobre la curva estándar.

Marcadores de pesos molecular empleados fueron:(Marca Biorad No 161-0324)

Proteína	Peso molecular (Daltons)
Miosina	215,000
β -galactoxidasa	132,000
Albúmina sérica bovina	95,000
Anhidrasa carbónica	42,500
Inhibidor de tripsina	32,900
Lisozima	19,500
Aprotinina	7,500

3.4 Producción de suero hiperinmune en conejo contra células completas de *D. congolensis*.

Se utilizaron 2 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de aproximadamente 2.5 Kg de peso cada uno, a los cuales se les inoculó una preparación de células completas de *D. congolensis* a una concentración de 6×10^8 UFC (Gavilondo, 1995) con el siguiente protocolo de inmunización.

Día 0: Se tomó muestra sanguínea para titular el suero basal (control negativo).

Se inoculó por vía Intramuscular (IM) 6×10^8 UFC en 1 ml de SSF + 1 ml de ACF (Adyuvante completo de Freund).

Día 14: Segunda inoculación por vía IM 6×10^8 0.5 ml de SSF + 0.5 ml de AIF (Adyuvante incompleto de Freund).

Día 28: Tercera inoculación por vía IM 6×10^8 UFC en 1 ml de SSF + 1 ml de AIF.

Día 49: Obtención de muestra sanguínea venosa para titulación de suero. Cuarta inoculación por IM, 6×10^8 UFC 0.5 ml de SSF + 0.5 ml de AIF.

Día 57: Obtención de muestra por punción cardíaca y titulación del suero.

La presencia de anticuerpos anti-*D. congolensis* en conejo se determinó mediante inmunoelectrotransferencia y su titulación se realizó con la prueba de inmunodifusión doble en agar.

3.5 Inmunodifusión doble en agar (Ouchterlony, 1973)

Con esta prueba se determinó el título del antisuero del *D.congolensis* obtenido en conejo.

A).- En un matraz se agregó 0.5g de agar noble y se agregaron 50 ml de SSAF (ver apéndice) pH 7.2.

B).- Se calentó a fuego lento hasta que el agar fue disuelto perfectamente y se observó sin grumos, al final el volumen perdido por evaporación se repuso con agua destilada.

C).- Se agregó 1 ml de azida de sodio (NaN_3) 0.1 M.

D).- Se colocaron en los portaobjetos secados previamente y desengrasados, 5 ml del agar y se dejaron gelificar a temperatura ambiente.

E).- Se realizaron las perforaciones en las laminillas.

F).- A cada orificio se le agregaron 25 μl del antígeno (proteínas solubles del *D. congolensis*) en el centro y 25 μl de las diluciones correspondientes del suero 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 alrededor.

G).- Las laminillas se colocarán en una cámara húmeda y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 ó 48 hrs.

H).- La lectura para localizar las líneas o bandas de precipitación se hizo en una cámara de fondo oscuro.

3.6 Identificación de la actividad antigénica de las proteínas solubles, obtenidas con ambas técnicas para el *D. congolensis* mediante Inmunolectrotransferencia.

Se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, por el método de Laemmli, (1970) de las proteínas solubles obtenidas con tris-lisostafin y SDS- lisostafin.

Se cortó un trozo de membrana de nitrocelulosa No. N-2764 SIGMA y dos de papel filtro del tamaño del gel obtenido en la electroforesis, los cuales se sumergieron en el amortiguador de transferencia (ver apéndice) para posteriormente ser ensamblados, el paquete anterior se colocó en la cámara de transferencia la cual se corrió a 400 mAmp, 100 volts, durante 60 minutos, transcurrido éste tiempo se desarmó el juego de transferencia, señalando cuidadosamente la membrana hacia donde se encontraba el gel.

Con la finalidad de corroborar la transferencia de proteínas se tiñó el gel electroforético con azul de Coomassie. La membrana de nitrocelulosa se sumergió en una solución bloqueadora (ver apéndice) durante 12 horas a 4°C, transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno en agitación constante con TBS pH 7.5 (ver apéndice), posteriormente se enfrentaron con el suero hiperinmune a una dilución 1:10 el cual proviene del suero de los conejos con un título de 1:4 (anticuerpos del *D. congolensis*), se emplearon como controles negativos los sueros basales de los conejos no inmunizados, se incubaron durante 12 horas a 4°C y posteriormente fue lavado. Finalmente se puso un segundo anticuerpo que fue el conjugado peroxidado de cabra anti-IgG de conejo (Sigma Chemicals) dilución de trabajo 1:1000, por 12 hrs a 4°C, se realizaron nuevamente 3 lavados con TBS a pH 7.5. El papel de nitrocelulosa fue revelado con Diaminobencidina y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Towbin, 1979).

4. Resultados.

4.1 Reconstitución e identificación de la cepa de *D. congolensis* ATCC 14637.

Después de reconstituir la cepa se confirmó que se encontraba sin contaminación alguna y presentó los siguientes resultados.

Tanto en la tinción de Gram como de Giemsa se observaron cocos Gram positivo agrupados en forma de racimos así como estructuras filamentosas con ramificaciones laterales y en la tinción de Giemsa se encontraron las mismas estructuras pero de color guinda.

En los medios de cultivo como BHI con sangre de camero desfibrinada, las colonias se observaron irregulares de color amarillo con una textura granular y presentaron β -hemólisis.

Los resultados de las pruebas bioquímicas confirmatorias fueron:

Prueba	Resultado
Catalasa	+
Ureasa	+
Glucosa	+
Lactosa	-
Maltosa	+
β Hemólisis en Sangre de camero	+

4.2 Obtención de las proteínas solubles con amortiguador tris-lisostafin y SDS-lisostafin.

A las proteínas solubles obtenidas por ambos tratamientos se les realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, obteniéndose los siguientes resultados:

RENDIMIENTO:

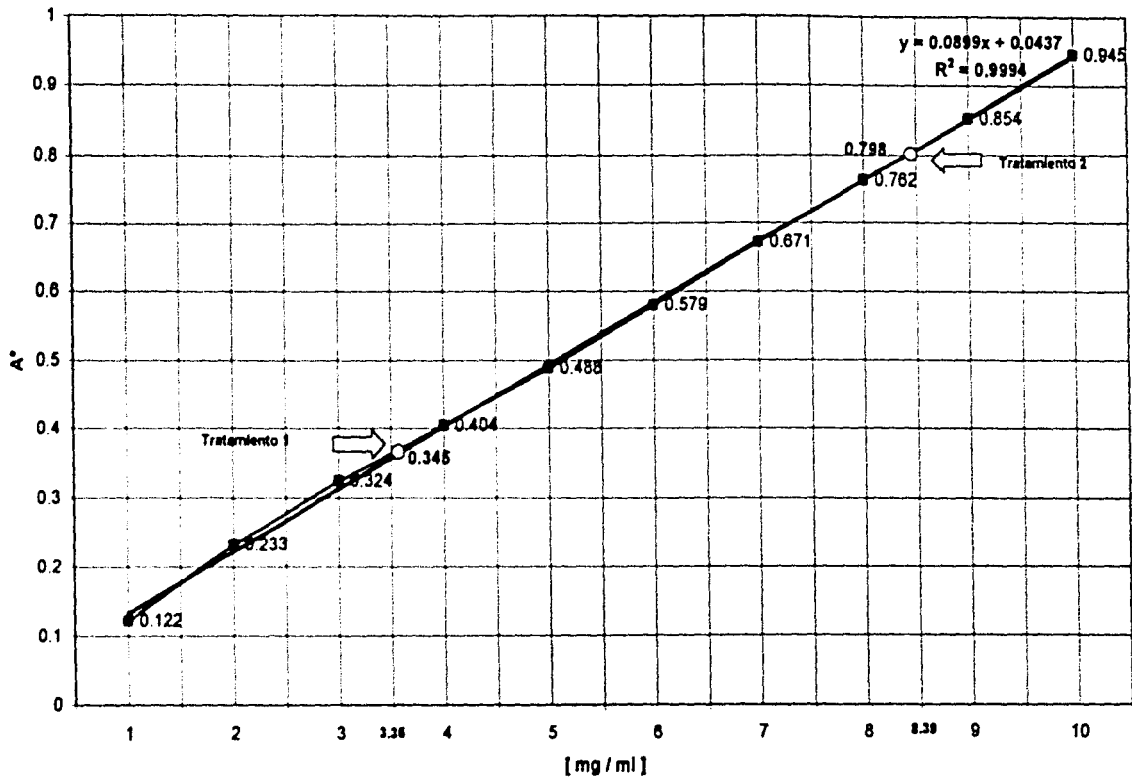
Tratamientos con amortiguador tris- lisostafin

Inicio	Rendimiento total
200 mg biomasa -100 % -----	3.38 mg de proteínas solubles (1.67%)

Tratamientos con SDS - lisostafin

Inicio	Rendimiento total
200 mg biomasa- 100%-----	8.39 mg de proteínas solubles (4.19%)

Como se observa en la gráfica 2, los resultados en cuanto a la concentración de proteínas solubles del *D. congolensis* son muy diferentes en ambos tratamientos, las cuantificaciones se realizaron por triplicado y el resultado que se muestra es un promedio de todas éstas.



Tratamiento 1 = Amortiguador Tris-Lisostafin
Tratamiento 2 = SDS-Lisostafin
Curva patrón de albumina a diferentes concentraciones interpolando los resultados de los tratamientos de extracción.

4.3 Separación de las proteínas solubles mediante electroforesis PAGE-SDS al 12%.

La Figura 2, muestra el patrón electroforético obtenido de las proteínas solubles para ambos tratamientos en donde se observa una gran diversidad de proteínas solubles del *D.congolensis*. En el cuadro 1 se detallan las proteínas encontradas en ambos tratamientos.

4.4 Titulación de los sueros hiperinmunes anti-*D.congolensis* producido en conejo.

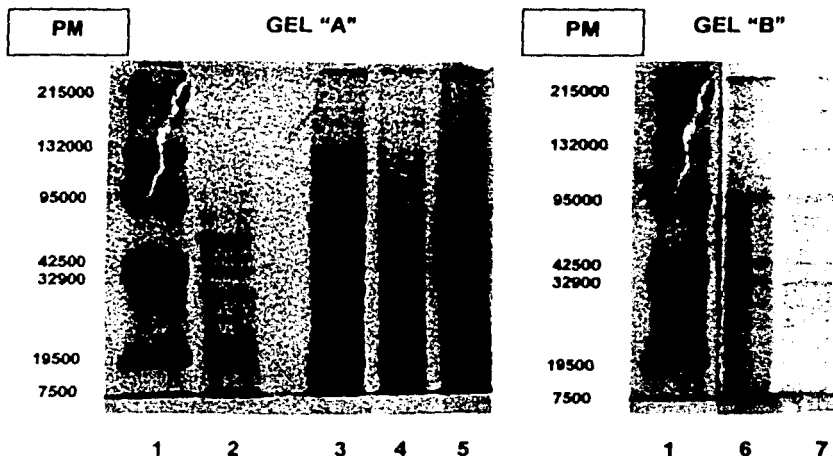
Las titulaciones de los sueros hiperinmunes se realizaron por la prueba de inmunodifusión doble en agar, mostrando los siguientes resultados:

Día cero: Negativo (muestra basal).

Día 49: Positivo título 1:4

Día 57: Positivo título 1:4 Obtención de sangre total mediante punción cardiaca

Figura 2. Patrón electroforético de las proteínas solubles para ambos tratamientos del *Dermatophilus congolensis*. Gel de poliacrilamida al 12%.



GEL "A" Tratamiento SDS-Lisostafin

- 1= Marcadores de peso molecular.
- 2= Células completas de *D. congolensis*.
- 3,4,5= Proteínas solubles del tratamiento con SDS-lisostafin para *D. congolensis*.

GEL "B" Tratamiento Tris-Lisostafin

- 1= Marcadores de peso molecular.
- 6,7= Proteínas solubles del tratamiento con amortiguador tris-lisostafin para *D. congolensis*.

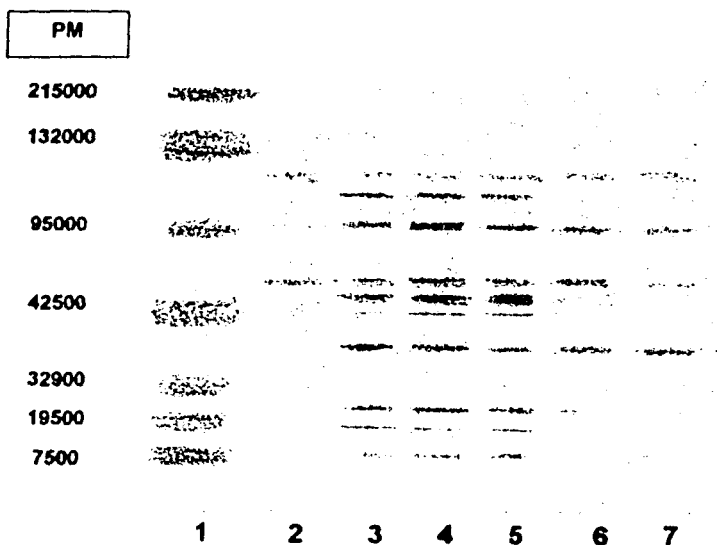
TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

4.5 Inmunoelctrotransferencia.

Se realizaron los corrimientos electroforéticos a las condiciones antes mencionadas, para posteriormente transferir a papel de nitrocelulosa, al enfrentar con el suero hiperinmune obtenido y revelando con Diaminobencidina se observó el reconocimiento inmunogénico de proteínas ver Figura 3, en donde se hace una representación gráfica del papel de nitrocelulosa obtenido. En el cuadro 1, se detallan las proteínas inmunodominantes obtenidas para ambos tratamientos. Lo anterior concuerda parcialmente con lo reportado en bibliografía ya que Makinde y Gyles en 1999 encuentran 4 proteínas con peso molecular 62,32,28,17.4. Cabe mencionar que en nuestra inmunoelctrotransferencia mostramos un mayor número de bandas identificadas, queda por considerar cual de ellas podría en un futuro tener una aplicación diagnóstica y profiláctica.

Lo anterior confirma que el tratamiento propuesto en este trabajo es eficiente, ya que se obtiene un mayor número de proteínas inmunodominantes de *D. congolensis* que lo que hasta ahora se conoce (ver cuadro 1).

Figura 3. Inmunolectrotransferencia, identificando la actividad inmunogénica de las proteínas solubles del *D. congolensis* obtenidas con SDS-lisostafín y enfrentándolas con suero hiperinmune de conejo.



Representación gráfica de las proteínas inmunodominantes.

- 1= Marcadores de peso molecular.
- 2= Células completas de *D. congolensis*.
- 3,4,5= Antígenos inmunodominantes de *D. congolensis* con SDS-lisostafín.
- 6,7= Antígenos inmunodominantes del *D. congolensis* con amortiguador tris-lisostafín.

Cuadro 1. PATRÓN ELECTROFORÉTICO OBTENIDO DE AMBOS TRATAMIENTOS EN PAGE-SDS AL 12% Y ANTÍGENOS DETECTADOS CON EL SUERO DE CONEJO.

Marcadores de Peso Molecular	ELECTROFORESIS PAGE-SDS AL 12%			INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	
	Células Completas	Amortiguador Tris-Glicina	SDS-Glicina	Antígenos Transferidos	Matrices y Otros
7.5	8	7	7.5	8	17.4
19.5	21	8	8	11	28
32.9	31	11	11	14	32
42.5	33	14	14	18	62
95	35	18	15	23	
132	38	19	18	29	
215	63	20	20	33	
	78	23	23	35	
	84	25	25	62	
		28	27	84	
		29	28	111	
		32	29		
		35	32		
		44	33		
		45	35		
		47	38		
		54	41		
		59	44		
		60	47		
		62	52		
		68	54		
		78	59		
		80	60		
		84	61		
		111	62		
			67		
			68		
			72		
			78		
			81		
			84		
			90		
			113		
			111		
			125		

Nota: Los pesos moleculares son basados en kDa.

5. DISCUSIÓN

Este trabajo muestra la descripción electroforética de proteínas solubles extraídas con lisostafin (PSL) de *D. congolensis* usando dos procedimientos. El primer procedimiento de extracción fue el propuesto por Makinde y Gyles (1999), y el segundo fue una variación del primero, utilizando SDS. Se trabajó a las mismas concentraciones y tiempos de extracción para PSL del *D. congolensis*, encontrándose un grado de diferencia en el contenido de proteínas solubles extraídas y en los rendimientos. También se probaron otros métodos de extracción de proteínas solubles, como la sonicación y el congelamiento y descongelamiento de la cepa de *D. congolensis*, pero no se logró una buena extracción de proteínas solubles Morilla, (1980). En la búsqueda para mejorar el método de liberación de proteínas solubles de *D. congolensis* se empleó la extracción con lisostafin descrito por Makinde y Gyles (1999). En tiempos de 18- 24 h de incubación, con presencia del detergente y el rompimiento enzimático, fueron las variables ideales para la extracción de un alto contenido proteico de *D. congolensis*.

En cuanto a la producción de suero hiperinmune en conejo. Los conejos fueron inoculados con células completas de *D. congolensis* (de acuerdo con el calendario de inmunización). El suero obtenido al final del proceso, fue desafiado contra PSL, obteniéndose un título de 1:4 mediante la prueba de inmunodifusión doble en agar, este título se puede explicar por el hecho de que las células plasmáticas producen anticuerpos específicos que son vertidos a la circulación, incrementando lentamente el nivel de anticuerpos en el plasma hasta que, dependiendo de la sensibilidad de la prueba serológica, pueden llegar a ser detectados. La especificidad de la prueba está dada por la capacidad que tiene para detectar anticuerpos específicos contra un antígeno y no contra otro, mientras que la sensibilidad es la capacidad que tiene la prueba de reconocer niveles bajos de anticuerpos. La prueba entre menos sensible sea tiende a ser más específica; es decir, tiene menos reacciones cruzadas Evans, (1973).

Electroforesis

En el trabajo reportado en la bibliografía no se menciona el rendimiento obtenido en el proceso de extracción de PSL Makinde y Gyles (1999), ni la concentración de proteínas empleadas por pozo/gel lo que no permite una completa comparación con lo que nosotros obtuvimos. En nuestro caso se considera que la cantidad obtenida en ambos tratamientos es adecuada; sin embargo, en el tratamiento con SDS- lisostafin se obtiene un mayor rendimiento de proteínas solubles, por lo anterior se optó por emplear este tratamiento.

La electroforesis en geles de poliacrilamida se ha convertido en una herramienta útil en los laboratorios para analizar y purificar proteínas Laemmli, (1970). Se probaron diferentes concentraciones del gel separador como al 7.5, 10, 12 y al 15 %, para determinar en cual de estas concentraciones es en donde se obtenía una buena separación de PSL. Se encontró que al 12 % era la concentración del gel ideal, así como también lo indicaba Makinde y Gyles (1999), las condiciones de corrimiento electroforético fueron de 100 volts durante 90 min. Tomando en cuenta estos parámetros se logró un corrimiento adecuado de las diferentes fracciones proteicas. El perfil electroforético se puede observar en la figura 2 así como sus pesos moleculares aparentes en el cuadro 1. El perfil electroforético obtenido en este trabajo presentó proteínas de 18, 28, 29, 32, 33 y 62 kDa, que se acercan a los valores determinados por Makinde y Gyles (1999). Sin embargo, con el empleo de SDS se pudieron determinar un mayor número de bandas (ver Cuadro 1).

Imunoelectrotransferencia. Una vez determinadas las condiciones adecuadas para la electroforesis, se realizó la IET, estandarizandose los tiempos y voltaje necesarios para permitir una buena transferencia de las PSL del *D. congolensis* al papel de nitrocelulosa. Fueron las mismas condiciones de trabajo que las reportadas en bibliografía, 60 minutos a 100 volts. Por último para corroborar que se hayan transferido todas las proteínas, los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se destiñeron

posteriormente para su comprobación, encontrando así las proteínas inmunodominantes de *D. congolensis* para el conejo transferidas al papel de nitrocelulosa.

Encontramos reconocimiento de antígenos inmunodominantes que coinciden con los reportados por Makinde y Gyles (1999); 18,29, 33 y 62 kDa, cabe señalar que ellos emplearon suero de ovino infectado naturalmente y nosotros lo hicimos en el modelo conejo inmunizándolo repetidas veces. En el caso del conejo, el suero hiperinmune producido, identifico más antígenos inmunodominantes 8, 11, 14, 23, 35, 84 y 111, resta por comprobar si estos antígenos reconocidos también serían reconocidos por los ovinos, ya que nuestro procedimiento de extracción logro un mayor número de bandas y en este caso se tendría que probar la IET con suero de animales infectados y las PSL que extrajimos.

6. CONCLUSIÓN

La modificación del método de Makinde y Gyles (1999) realizada por nosotros, permitió la obtención de un mayor contenido de PSL. El empleo del detergente SDS permitió una mejor solubilización de proteínas, que presentó un mejor bandeo e identificación de estas.

Se extrajeron proteínas solubles del *D. congolensis* utilizando lisostafín descrito por Makinde y Gyles, (1999). Con este mismo método nosotros cambiamos el amortiguador Tris por el SDS, en donde se obtuvo un mayor contenido de proteínas solubles al determinar el rendimiento de cada uno.

Utilizando la técnica electroforética con gel de poliacrilamida (PAGE-SDS al 12%), descrita por Laemmli, (1970), se obtuvo el patrón electroforético de las proteínas solubles del *D. congolensis* encontrándose en un rango de 125 a 7.5 kDa.

Se obtuvo suero hiperinmune en conejo contra células completas del *D. congolensis*, encontrándose un título 1:4 (inmunodifusión doble en agar), para ser empleado en la determinación de antígenos inmunodominantes por la técnica de inmunolectrotransferencia.

Se estandarizó la técnica de inmunolectrotransferencia, por lo cual se logró la identificación de antígenos inmunodominantes de *D. congolensis* para el conejo; dándonos así, un panorama inicial acerca de las proteínas que pueden estar involucradas en el curso de la enfermedad y que a su vez podrían emplearse para una prueba de diagnóstico que permita la identificación temprana y específica de este agente.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Albrecht, R.; Horowitz, E.; Gilbert, R.; Hong, R. and Connor, D.H. (1974). *Dermatophilus congolensis* Chronic nodular disease in man. *Pediatrics*. 53:907-912.
2. Ambrusen, N.C. (1996). The pathogenesis of Dermatophilosis. *Tropical Vet. Med.* 28:295-375.
3. Austwick, P.K. (1985). Cutaneous Streptothricosis, Micotic Dermatitis and Strawberry Fool-rot and genus *Dermatophilus*. *Van. Sac. Det. Rev. Annot.* 33.48
4. Abu-Samara, M.T., Imbabi, S.E. and Mahgoub, E.S. (1976). *Dermatophilus congolensis*. A bacteriological, *in vitro* antibiotic sensitivity and histopathological study of natural infection in sudanese cattle. *Br. Vet. J.*, 135: 627-631
5. Bailey and Scott's. (1990). *Diagnostic Microbiology*. Ed. 8th edit. Mosby Company. 574-575. USA.
6. Bida, S.A. and Dennis, S.M. (1976). Dermatophilosis in North Nigeria. *Common. Bureau Anim. Health.*, 46: 471-478
7. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
8. Carter, Gr. (1986). *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. Ed. 3rd edit. Lea and Febiger. Philadelphia. 196-197. USA.
9. Carter, Gr. R. and Cole, J.R.Jr. (1990). *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. Ed. 5th. Edit. Academic Press, INC. p.280-283. USA.
10. Cervantes, O.R.A. (1986). Dermatofilosis. En: Enfermedades de los ovinos y caprinos. Ed. Pijoan, P. y Tórtora, J. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
11. Ellis, T.M.; Masters, A.M.; Sutherland, S.S.; Carson, L.M. and Gregory, A.R.

- (1993). Variatin in cultural, morphological, biochemical properties and infectivity of Australian isolates of *Dermatophilus congolensis*. *Vet. Microbiol.* 38: 81-102.
12. Evans, A. S., (1973). Serological Techniques. Serological Epidemiology, Editado por J.R. Paul y C. White, Academic Press. New York. pp: 41-54.
13. Gavilondo, V. J. (1995). Anticuerpos monoclonales. Ed. Elfos scientiae. La Habana.
14. Hanel, H.; Kalish, J.; Keil, M.; Maisch, W.C. and Buslau, M (1991). Quantification of Kerationolytic activity from *Dermatophilus congolensis*. *Med. Microbiol. Immunol.* 180:45-51.
15. Hermoso de Mendoza, J.; Arenas, A.; Rey, J.; Alonso, J.M.; Gil, N.C.; Naranjo, G. and Hermoso de Mendoza, M. (1994). *In vitro* studies of *Dermatophilus congolensis* antimicrobial susceptibility by determining minimal inhibitory and bacteriocidal concentrations. *Br. Vet. J.* 150:189-197.
16. Holt, J. G.; Krieg, N.R.; Sheath, P.H.A.; Steley, J.T. and Williams, S.T. (1995). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed. 9th Edit. William and Wilkins. Baltimore, USA.
17. Horowitz, I.C. and Kuttin, E.S. (1992). Dermatophilosis in Kangaroo. *Isr. J. Vet. Med.*, 47:31-33
18. How, S.J.; Lloyd, C.M. and Walker, A.R. (1988). Use of a monoclonal antibody in the diagnostic of infection by *Dermatophilus congolensis*. *Rest. Vet. Sci.* 45:416-417.
19. Hyslop, N.S.G.(1980). Dermatophilosis (Streptothricosis) in animals and man. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2: 389-404
20. Jenkinson, D.M.; Menzies, J.D.; Pow, L.A.; Inglis, L.; Lloyd, D.H. and Mackie, A. (1989). Actions of bovine skin washings and sera on the motile zoospores of *Dermatophilus congolensis*. *Rest. Vet. Sci.* 47: 241-246.
21. Jubb, K.U.F.; Kennedy, C. and Palmer, N. (1985). *Pathology of domestic animals*. Ed. 3rd. edit. Academic Press. 1: 475-538. USA.

22. Kingali, J.M.; Heron, I.D. and Morrow, A.N. (1990). Inhibition of *Dermatophilus congolensis* by substances produced by bacteria found on the skin. *Vet. Microbiol.* 22:237-240.
23. Koney, E.B.M., Morrow, A.N., Heron, I., Ambrose, N.C. and Scott, G.R. (1994). Lymphocyte proliferative responses and the occurrence of dermatophilosis in cattle naturally infested with *Amblyomma variegatum*. *Vet. Parasitol.*, 55:245-256.
24. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:93-102.
25. Lennette, H.E. (1987). *Manual de Microbiología Clínica*. Ed. 4^a. Edit. Médica Panamericana. 330-335. México.
26. Lloyd, D.H. and Noble, W.C. (1982). *Dermatophilus congolensis* as a model pathogen in mice for the investigation of factors influencing skin infection. *Br. Vet. J.*, 138: 51-60
27. Masters, A-M.; Ellis, T.M. and Grein, S.B. (1997). *Dermatophilus congolensis*: strain difference in expression of phospholipase activities. *Vet. Microbiol.* 57: 199-213.
28. Makinde, A.A. and Majiyagbe, K.A. (1982). Serodiagnosis of *Dermatophilus congolensis* infection by counter immunoelectrophoresis. *Res. Vet. Sci.* 33: 265-269.
29. Makinde, A.A. and Gyles, C.L. (1999). A comparison of extracted proteins of isolates of *D. congolensis* by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting. *Veterinary Microbiology* 67:251-262.
30. Mendoza, I., Chavarria, I. M. y Calvo, B. (1986). Lesiones cutáneas causadas por *Dermatophilus congolensis* en equinos de Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*, 8: 83-85.
31. Momotani, E.; Inui, S.; Ishikawa, Y. and Azurra, R. (1984). Granulomatous subdermal lesion in sheep inoculated with *Dermatophilus congolensis*. *J. Comp. Path.* 94:33-43.
32. Montali, R. J.; Smith, E.E.; Davenport, M. and Brush, M. (1975). Dermatophilosis in Australian Bearded Lizards. *J.A.V.M.A.*, 167: 553-555.

33. Morilla, A., (1980). Inmunodiagnóstico. En memorias del curso de actualización en inmunoparasitología veterinaria. Editado por H. Quiroz y A. Morilla. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Pp: 45-59.
34. Nicolet, J. (1985) *Compendio de Bacteriología Médica y Veterinaria*. Edit. Acribia. 202-205. España.
35. Noble, W.C.; Liloyd, D.H. and Appiah, S.N. (1980). Inhibition of *Dermatophilus congolensis* infection in a mouse model by antibiotic producing Staphylococci. *Br. J. exp. Pat.* 61: 644-647.
36. Oduye, O.O. (1975). Effects of various induced local environmental conditions and histopathological studies in experimental *Dermatophilus congolensis* infection on the bovine skin. *Res. Vet. Sci.*, 19: 245-252.
37. Ouchterlony, O., (1973). Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann Arbor Science Publishers. Inc. Sexta Impresión.
38. Pascoe, R.R. (1972). Further observations on *Dermatophilus* infections in horses. *Aust. J. Vet.*, 48: 32-34.
39. Pijoan, P. y Tórtora, J. (1986). *Principales enfermedades de los ovinos y caprinos*. Coordinación general de estudios de posgrado Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.
40. Pospisil, L.; Skalka, B.; Bucek, J. and Moster, M. (1992). The first isolation of *Dermatophilus congolensis* Van Sacegham 1913 in Czechoslovakia. *Cesk, Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 41: 258-267.
41. Radostits, O.M.; Blood, D.C. and Goy, C.C. (1994). *Veterinary Medicine*. 8th de edit. Bailliere Tindal, 857-861 USA.
42. Roberts, D.S. (1963). Properties of *Dermatophilus congolensis* zoospores in relation to the transmission of mycotic dermatitis. *Aust. J. Agric. Res.*, 14: 373:399.
43. Roberts, D.S. (1967). *Dermatophilus* infection. *Vet. Bull.* 37: 513-521.
44. Rosser, E.J. (1995). Infectious crusting dermatoses. *Vet. Clin, North Am. Equine Prac.*, 11: 53-59.
45. Samui, K.L. and Hugh-Jones, M.E. (1990). The financial and production impacts of bovine Dermatophilosis in Zambia. *Vet. Res. Comm.* 14: 357-365.

46. Sanders, A.B.; How, S.J.; Lloyd, D.H. and Hill, R. (1990). The effect of energy malnutrition in Ruminants on Experimental infection with *Dermatophilus congolensis*. *J. Com. Path.* 103: 361-369.
47. Sanders, A.B.; How, S.J.; Lloyd, D.H. and Hill, R. (1991). The effect of malnutrition on vaccinated against *Dermatophilus congolensis* infection in ruminants. *J. Comp. Path.* 105:37-48.
48. Skalka B. and Pospisil L. (1993). Antigenicity of *Dermatophilus congolensis* haemolysin. *Zentralbl. Veterinar Med.* 40: 215-221.
49. Sasiak, A.B., Sebestery, A.; Hrivnak, G. and Lloyed, D.M. (1993). Experimental dermatophilosis in murine models of immunodeficiency. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 46:263-269.
50. Scrivener, C.J. and Vizard, A.L. (1995). Efficacy of a single dose of erythromycin or penicillin/streptomycin for the treatment of ovine dermatophilosis. *Aust. Vet. J.* 72:475-476.
51. Smith, C.F. and Cordes, D.O. (1972). Dermatitis caused by *Dermatophilus congolensis* infection in polar bears (*Thalactos maritimus*). *Br. Vet. J.*, 128: 366-371.
52. Towbin, H. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from poliacrilamida gels to nitrocellulose sheet. Procedure and some applications. *Pro Natl. Acad. Sci.* 76:4350-4354.
53. Tórtora, P.J.; Cervantes, O.R.A. and Cruz, A. (1991). Simultaneous infection in sheep with contagious ectima virus and *Dermatophilus congolensis*. *Rev. Med. Vet. Mycol.* 26:923.
54. Wekhe, S.N. (1989). New media for the isolation of *Dermatophilus congolensis*. *Tropical Animal Health and Production.* 21:231-232.
55. Wilkinson, F.C. (1979). Dermatophilosis of sheep association with dipping an effects on production. *Aust. Vet. J.* 55: 74-76.
56. Woodman, J.P., Morrow, A.M. and Heron, I. (1990). Cellular immune response of the rat to experimental infection with *Dermatophilus congolensis*. *Vet. Microbiol.*, 25: 283-295.

57. Zaria, L.T. (1993). *Dermatophilus congolensis* infection (Dermatophilosis) in animals and man. An Update. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 17-222.

8. APENDICE

Medios de cultivo.

Agar infusión cerebro corazón (BHI) BIOXON.

Infusión de cerebro corazón	6.0 g
Peptona de carne	6.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Dextrosa	3.0 g
Peptona de gelatina	14.5 g
Fosfato disódico	2.5 g
pH final 7.4 +/- 0.2	

Disuelva 37 g de material deshidratado en un litro de agua destilada. Para cultivos en sangre agregar 0.5 a 1.0 gramos de agar por litro de medio rehidratado y que el medio se hierva durante un minuto. Distribuya y esterilice en autoclave a 121°C. (15 libras de presión de vapor) durante 15 ó 20 minutos.

Soluciones empleadas en la electroforesis.

Amortiguador de fosfatos (PBS) 0.1 M, pH 7.4

Solución A (Fosfato de sodio monobásico 0.2 M)

Disolver 27.6 gr. de Fosfato de sodio monobásico monohidratado, aforado a 1 litro de agua destilada.

Solución B (Fosfato de sodio dibásico heptahidratado 0.2 M).

Disolver 53.65 gr. de Fosfato de sodio monobásico heptahidratado, aforando a 1 litro de agua destilada.

Mezclar 95 ml de la solución A más 5ml de Solución B y aforar a 500ml con agua destilada

Reactivo de Bradford

Azul brillante de Coomassie R-250	50 mg
Etanol al 95%	25 ml
Acido o-fosfórico al 85%	50 ml
Agua destilada aforando a	500 ml

Amortiguador Tris (hidroximetilaminometano)- HCl 1.5 M

Tris-base	18.75 g
Agua destilada	80.00 ml

Ajustar a pH 8.8 con HCl 1 N, llevar a 100 ml, con agua destilada y almacenar a 4°C.

Acrilamida-Bis (solución stock 30 %)

Acrilamida	29.2 g
Bis-acrilamida	0.8 g

Llevar a 100 ml. con agua destilada, filtrar y almacenar a 4°C en frasco ámbar.

Persulfato de amonio 12.5%.

Persulfato de amonio	12.5 g
Agua destilada	100 ml

SDS 10%

Dodecil sulfato de sodio (SDS)	10.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Solución amortiguadora stock de corrida para electroforesis.

Tris-base	0.123 M
Glicina	0.960 M
SDS	0.017 M
Agua destilada	600.00 ml

Almacenar a 4°C, calentar a 37°C antes de usar, si se forma algún precipitado diluir 60 ml. de solución con 240 ml. de agua destilada.

Buffer muestra.

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	0.0625 M
Glicerol	10%
DSD	0.346 M
2-b-mercaptoetanol	0.716 M
Azul de bromofenol 0.05%	0.2 ml
Agua destilada	4.0 ml

Diluir la muestra 1:1 con buffer muestra y calentar a 95°C durante 5 minutos.

Solución stock azul brillante de Coomassie R-250 1%.

Azul brillante de Coomassie R-250 1%	2.0 g
Agua destilada	200.0 ml

Agitar y filtrar.

Solución de Coomassie para tinción de geles electroforéticos.

Solución stock azul de Coomassie R-245 1 %	62.5 ml
Metanol	250.0 ml

Acido acético	50.0 ml
Aforar con agua destilada	500.0 ml

Solución desteñidora para geles electroforéticos.

Metanol	125.0 ml
Acido acético	25.0 ml
Aforar con agua destilada	250.0 ml

Solución salina-tris 20 mM, Tris-NaCl (TBS) pH 7.5.

Tris-base	4.84 g
Cloruro de sodio	58.48 g
Ajustar a pH 7.5 con HCl 1N	
Aforar con agua destilada	2000.0 ml

Soluciones empleadas en inmunoelectrotransferencia.

Solución bloqueadora para transferencia.

Leche descremada en polvo	5.0 g
TBS	100.0 ml

Solución amortiguadora para corrida de transferencia.

Tris-base	0.025 M
Glicina	0.019 M

Metanol 20 %

Disolver con agua destilada, ajustar a pH 8.3

Aforar con agua destilada 1000.0 ml

Solución reveladora.

Diaminobencidina 0.2 g
 $H_3 PO_4$ 40.0 ml

Cloruro de níquel 0.02 g
Cloruro de cobalto 0.02 g

Esto se disuelve en 2 ml de agua destilada

Peróxido de hidrógeno al 30 % 100.0 μ l

Solución estándar de albúmina sérica bovina 0.01 % (ASB).

Albúmina sérica bovina 10.0 mg
PBS pH 7.4 10.0 ml

Soluciones para inmunodifusión doble.

Agar noble 0.5 g
SSAF pH 7.2 50 ml
 $N_3 Na$ concentrado 1ml

Solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF), pH 7.2

$NaH_2 PO_4$ 2.585 g
 $Na_2 HPO_4$ 7.98 g

NaCl

4.25 g

Aforar con agua destilada

1000.0 ml