



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE
ANTICUERPOS, CONTRA MANANAS DE *Candida spp*, EN EL SUERO DE
LECHE DE VACAS SANAS Y CON MASTITIS SUBCLÍNICA Y CLÍNICA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

CECILIA QUIROGA HERNÁNDEZ

ASESORES:

DR. ROBERTO A. CERVANTES OLIVARES

DRA. CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA



MÉXICO DF.

2008.



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.

DEDICATORIA

A mi madre, que me ha dado la fuerza para terminar este trabajo.
(Es más tuyo que mío)

A mi papá RACO porque me ha regalado más que conocimientos.

A mi mamá Caro porque sin ti aún no habría terminado, ni hubiera
aprendido tanto.

A ti, que espero tenga oportunidad de tenerte conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por la vida, el corazón y la suerte de tenerla conmigo apoyándome en cada decisión. Tu fortaleza me ayudo a luchar por mis sueños.

A mi hermano Alex por mostrarme que no todo debe tomarse tan enserio, y por ayudarme cuando lo necesite.

A mi abuelito Marcelo, por su cariño y sus historias que te hacen soñar y creer que todo es posible.

A mi padre por que su no es mi sí, gracias.

A RACO por llenar los espacios vacíos tanto en mi cabeza como en mi corazón, y llevarme a la luz de la micología.

A Caro por que nunca perdió la paciencia y el cariño, y por hacerme parte de su trabajo y sus triunfos.

A la dra. Rodríguez por ser mi guía en la bella labor de la enseñanza y del azar.

A mis tías (Tila, Ivonne y Gaby) por darme ejemplo de fortaleza y cariño, han formado una gran familia a la que me enorgullece pertenecer. A mi tío Ligo por mostrarme que el conocimiento es de quien lo quiere y que la soledad es buena consejera y hay que valorarla cuando se tiene la oportunidad.

A mis primos queridos: Tere, German y Dorian mis compañeros de juegos; Bety, Ali, Leo, One, Vicente, Gil, Oscar, Raúl e Ivan que, aunque nos tratamos poco nos queremos como hermanos mil gracias.

A mis amigos, compañeros de parranda y consuelo de mi alma: Cris, Kari, Ceci, Chucho, Deya, Alma, Abi, Magda, Christian, Dianita, los Betos, a los micólogos Andi, Alejandro (por dote), David, Esme, Angi, Ale, dr. Ramón, a los de micro: la dra. Ivonne, Martita, Lore, Oscar y todos los que olvide poner en este apartado pero, ya conocen a su amiga.

A mi jurado el Dr. Andrés Ducoing Watty por su paciencia (y su lector), a la Dra, Laura Cobos por su tiempo, al Dr. José A. Gutiérrez por su interés y

a MVZ. Rodrigo Mena por su amistad y consejo. A todos por su comprensión y esfuerzo extra para la realización de este trabajo.

Al departamento de Microbiología e Inmunología, y cada uno de sus laboratorios que colaboraron en mi formación.

A mi Facultad donde he aprendido tanto, y he vivido maravillosas experiencias. A los profesores, laboratoristas, técnicos, laboratorios, ranchos y centros de esta Facultad que en algún momento participaron en mi aprendizaje.

A mis fieles compañeros, Yaki (que ya se adelanto), Sultán y Cuco, gracias por su cariño incondicional.

A los animales que con su vida colaboraron en mi crecimiento profesional, mil gracias y prometo que no será en vano.

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (PAPIIT) IN 216703.

CONTENIDO

TEMA	PÁGINA
Índice de figuras, cuadros y diagramas	VI
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Generalidades. Mastitis micótica	2
1.1.1 Factores predisponentes de mastitis micótica	3
1.2 Características de <i>Candida</i> spp.	3
1.2.1 Factores de patogenicidad de <i>C. albicans</i>	4
1.3 Generalidades de las mananas	5
1.4 Diagnóstico de mastitis	6
1.4.1 Diagnóstico microbiológico	6
1.4.2 Diagnóstico molecular	7
1.4.3 Diagnostico serológico	8
1.5 ELISA indirecta	8
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS	11
4.1 Cepa de referencia	11
4.2 Extracción de mananas	11
4.3 Cuantificación de mananas. Método de Dubois	12
4.4 Extracción del suero de leche de vacas sanas y con mastitis subclínica y clínica.	13
4.5 Obtención de sueros control	14
4.6 Implementación de la prueba de ELISA indirecta	16
4.7 Análisis estadístico	17
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSIÓN	29
7. CONCLUSIONES	33
8. PERSPECTIVAS	34
9. APENDICE	35
10. LITERATURA CITADA	38

INDICE DE FIGURAS, CUADROS Y DIAGRAMAS.		
No figura	Descripción	Página
1	Pared de <i>C. albicans</i> . Modificado de Calderon 1991	5
2	Curva Estándar de Dextrosa	12
3	Curva Estándar de Manosa	13
4	ELISA para comprobar la calidad del antígeno y titulación de sueros control.	20
5	ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antimananas, en las muestras de leche de vacas sanas, con mastitis subclínica y clínica	21
6	ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antimananas, en las muestras de suero de leche de vacas sanas, con mastitis subclínica y clínica	22
7	ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antimananas, en las muestras de vacas (leche y suero de leche) con aislados de <i>C. krusei</i>	25
8	ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antimananas, en las muestras de vacas (leche y suero de leche) con aislados de <i>C. glabrata</i>	26
9a, 9b	ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antimananas, en las muestras de vacas, con aislados de <i>Candida</i> spp	27
10	ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antimananas, en las muestras de vacas (leche y suero de leche) con aislados de <i>C. albicans</i>	28
No cuadro		
1	Identificación bioquímica de las muestras de leche de vacas sanas y con mastitis subclínica y clínica	15
2	Valores del ANOVA de las absorbancias obtenidas a 490 nm en las pruebas de ELISA indirecta de las muestras de leche para la detección de anticuerpos antimananas.	23
3	Valores del ANOVA de las absorbancias obtenidas a 490 nm en las pruebas de ELISA indirecta de las muestras de suero de leche para la detección de anticuerpos antimananas.	24
Diagrama		
1	Metodología de ELISA indirecto	18

RESUMEN

QUIROGA HERNÁNDEZ CECILIA. Implementación de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos, contra mananas de *Candida* spp, en el suero de leche de vacas sanas y con mastitis subclínica y clínica.

(Bajo la dirección de: Dr. Roberto A. Cervantes O. y Dra. Carolina Segundo Zaragoza)

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria, considerada como una de las enfermedades más complejas y costosas del ganado lechero. Las levaduras están involucradas de un 1-4% de las mastitis subclínicas y en 2-3% de las mastitis clínicas, siendo *Candida* el género con mayor número de aislamientos.

La pared de las levaduras está principalmente constituida por manoproteínas que son el principal reactivo antigénico y por ello es la que se utiliza frecuentemente en las pruebas serológicas.

En el presente estudio se evaluaron 188 muestras de leche, positivas al aislamiento de levaduras del género *Candida*, de las cuales 58 provenían de vacas sanas, 22 de vacas con mastitis subclínica y 108 de vacas con mastitis clínica.

La extracción de las mananas se realizó por hidrólisis alcalina, a partir de un cultivo de 48 h en medio de extracto de levadura y dextrosa (YEPD) de una cepa de *C. albicans* ATCC 10231, obteniéndose un rendimiento de 10 mg/ml. La detección del título de anticuerpos antimanas presentes en las muestras evaluadas se determinó mediante la técnica de ELISA indirecta (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), encontrándose que a partir de la dilución 1:8000 es posible diferenciar entre las leches de vacas sanas y las de mastitis subclínicas y clínica ($P = < 0.05$).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades. Mastitis micótica.

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria que se produce como respuesta al daño causado por microorganismos y sus toxinas, productos químicos, traumas, temperaturas extremas, entre otras causas ¹. Es considerada como una de las enfermedades más complejas que afectan a la industria láctea, su distribución es mundial y ha sido catalogada como una de las enfermedades más costosas que afectan al ganado lechero ^{2,3}.

Para el tratamiento de la mastitis se considera como primera etiología a las bacterias y por ello se aplican antibióticos de amplio espectro que han favorecido el desarrollo de levaduras que provocan una enfermedad de difícil diagnóstico y que hace que el tratamiento específico se retrase hasta el momento en que es imposible recuperar tanto el tejido mamario como la producción láctea^{4,5,6}. La mastitis puede manifestarse en dos formas, la forma subclínica que no presenta signos macroscópicos de inflamación y pasa desapercibida a pesar de ser 20 a 50 veces más frecuente que la forma clínica, la cual presenta evidentes signos de inflamación como tumefacción, rubor, dolor, cambios notables en la secreción y eventualmente signos sistémicos. En las infecciones crónicas que no responden a los antibióticos se recomienda la eliminación de los animales ³.

En países como EUA, Bélgica y Brasil en los cuales se han revisado casos de mastitis micótica se estima que el porcentaje de prevalencia es del 2.7%, 6% y 12% ⁶ respectivamente. En México no han sido reportados estudios epidemiológicos de este padecimiento pero es posible considerar que existan valores cercanos a los de Brasil ya que se considera que el medio ambiente de México es más parecido a este ⁷. Las levaduras están involucradas en el 1-4% de las mastitis subclínicas y en el 2-3% de las mastitis clínicas ^{2, 8}, siendo los géneros aislados más frecuentes *Candida* spp y

Cryptococcus spp además de un microorganismo que por su morfología al Gram y la de su colonia en Sabouraud Dextrosa Agar, se confunde con las levaduras y que en realidad es un alga llamada *Prototheca zopffi*. Estos patógenos son asociados a mastitis en vacas con una reducción en la producción láctea, secreción acuosa y grumos blancos lo que puede ir seguido de la atresia del cuarto afectado ^{5, 8, 9, 10}.

Del género *Candida* hay un gran número de especies que se han aislado de leche de vacas con mastitis, como son *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. norvergica*, *C. membraeformis*, *C. pelliculosa*, *C. solani* entre otras ^{2, 8}.

1.1.1 Factores predisponentes de mastitis micótica.

La mastitis micótica se ha asociado con defectos en la barrera mucosa o cutánea (solución de continuidad, abrasiones), defectos en la inmunidad mediada por linfocitos T o defectos en la función de neutrófilos ¹⁰, defectos en la inmunidad celular relacionada con la infancia y preñez y a factores como la dieta, iatrogenia, tratamientos largos con antibacterianos, tratamientos hormonales y falta de higiene en las máquinas de ordeño o en el ordeñador ^{6, 8, 11}.

1.2 Características de *Candida* spp.

El género *Candida* pertenece al reino Fungi del filum Ascomycota, subfilum Ascomycotina, clase Ascomycetes, orden Saccharomycetales, familia *Saccharomycetaceae* ¹². Es de las levaduras con mayor importancia médica, y en mastitis bovina es la que se aísla frecuentemente. En condiciones adecuadas de temperatura, humedad y nutrientes estas levaduras crecen en su fase logarítmica por gemación multilateral (blastoconidias) que pueden ser desde ovals a alargadas y

pueden medir entre 2-5 por 3-7 μm . En medios sólidos producen colonias cremosas a blanquecinas. A excepción de *C. glabrata* todas producen pseudomicelio, *C. albicans* y su subespecie *C. stellatoidea* producen tubo germinal en presencia de suero y *C. albicans* es capaz de producir clamidoconidios ^{8,10, 13-15}.

1.2.1 Factores de patogenicidad de *C. albicans*.

La patogenicidad y la relación con los factores de virulencia de *Candida* han sido estudiadas principalmente en *C. albicans*, incluyen la formación de micelio, la adhesión a células y tejidos del huésped, producción de enzimas extracelulares ¹⁶ como ejemplos: la enzima proteolítica (ácido carboxil proteinasa) que parece ser un factor de diseminación, la N-acetil-galactosaminidasa (NAGasa) y la L-prolina aminopeptidasa cuyos sustratos son el 4-metilumbeliferil-N-acetil-B-D-galactosaminida y el 4-metilumbeliferil-N-acetil galactosaminida prolina-p-nitroanilida respectivamente ¹⁷; además de que sus fenotipos están asociados a diferentes antígenos, es decir, que es difícil tener una memoria inmune; incluso se considera que inhibe la fagocitosis de neutrófilos e induce su apoptosis ¹⁸⁻²⁰.

En una infección por *Candida* primero ocurre la adherencia de la levadura a la superficie del huésped y después la proliferación, y en esto contribuye la formación de la pseudohifa ²⁰, durante este proceso se ha considerado que los primeros antígenos presentes son sus componentes de pared de *Candida*, entre ellos las mananas (Figura 1).

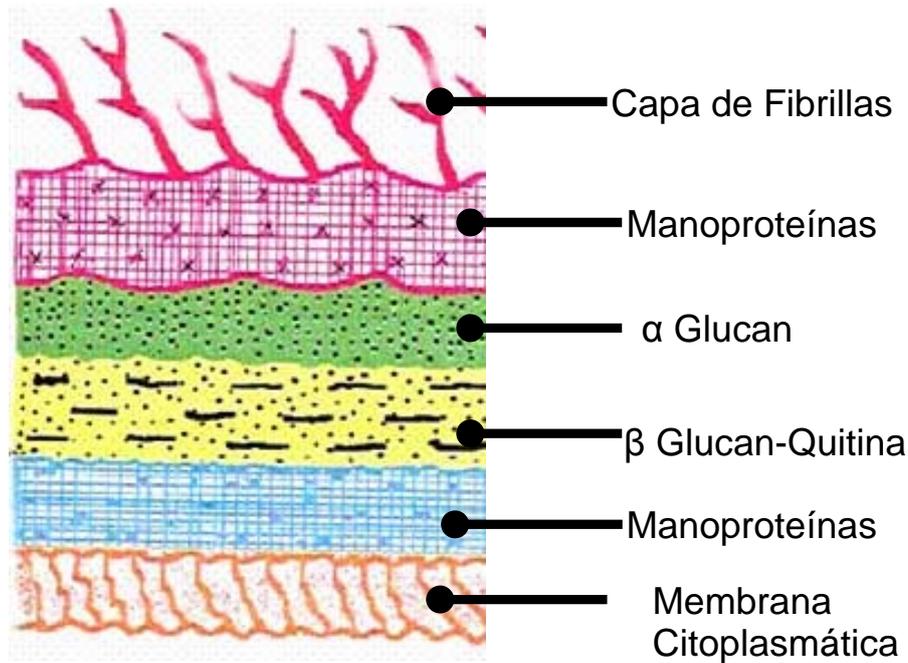


Figura 1. Pared de *C. albicans*. Modificado de Calderon 1991.

1.3 Generalidades de las mananas.

Las pruebas serológicas se han enfocado en la estructura antigénica de la pared de *Candida*, la cual está constituida en un 80-90 % de polisacáridos de los cuales la mayoría son glucanas y mananas¹⁸ y una pequeña porción de quitina, esta última, para el caso de *C. albicans*, varía según la forma en que se encuentre aumentando su concentración cuando forma pseudohifas. Las mananas siempre están en asociación con proteínas (mananoproteínas); el término mananas se utiliza para los componentes solubles inmunodominantes de la pared y que representan entre el 15.2-22.9 % del extracto seco de la levadura y el 40% del total de los carbohidratos^{18,21}.

Los estudios actuales se han encaminado a determinar la estructura de las mananas y su importancia en el estímulo de la respuesta inmune, se les ha determinado la propiedad de ser un factor de adhesión y un antígeno común a todas las especies de *Candida*^{18,21}.

Con base en su estructura química y sus epitopos, las mananas han sido agrupadas en dos serotipos: A y B^{13, 18}. Se ha determinado que cualquier cambio en su estructura

disminuye los niveles de adherencia ²¹ y que la expresión del antígeno depende del tipo de candidiasis, ya sea superficial o invasiva ¹⁸, y de las condiciones de cultivo (temperatura, nutrientes proporcionados, pH, entre otras) ^{20,22}.

Por su cualidad de ser un buen antígeno, se han utilizado a las mananas para pruebas de inmuno doble difusión, aglutinación con partículas de látex y con pruebas de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), la mayoría de las cuales son encaminadas a la detección de anticuerpos contra mananas para el diagnóstico de candidiasis sistémicas en humanos ^{13,23}.

1.4 Diagnóstico de mastitis.

Para el diagnóstico de mastitis, se procede a realizar una inspección inmediata de la ubre considerando tamaño, forma e integridad, de igual forma para los pezones. En tanto que para la inspección mediata se utiliza la prueba de tazón de fondo oscuro. Para el diagnóstico se han diseñado otras pruebas de laboratorio como son la determinación de cloro en leche, que aumenta en casos de mastitis; el pH, que se alcaliniza; determinación de albúmina sérica; la prueba de California que detecta células somáticas y es posible detectar que vacas con cuentas mayores a 500 000 células/ml cursan con mastitis subclínica ²³.

1.4.1 Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico de mastitis en ocasiones se dificulta ya que los signos clínicos son variados y el aislamiento de levaduras no siempre implica una infección ^{10,19}. Para la identificación de *Candida* spp se ha empleado el método microbiológico, basándose en la morfología y pruebas bioquímicas; las herramientas moleculares y las pruebas serológicas ¹⁸.

Los casos de mastitis clínica resultan fáciles de reconocer y el diagnóstico se realiza mediante cultivo microbiológico de la secreción láctea. Para los casos subclínicos se requiere aplicar pruebas especiales a fin de confirmar el proceso inflamatorio y el agente causal de igual forma puede ser identificado por cultivo microbiológico. Las desventajas son la laboriosidad, el tiempo que consume, el requerimiento de personal entrenado y el elevado costo ⁸.

Generalmente la identificación de levaduras consta de un cultivo en agar Sabouraud dextrosa (SDA) incubado a 37° C y examinado a las 24, 48 y hasta 72 horas. Posteriormente los aislados pueden ser identificados utilizando sistemas comerciales como el microsistema API 20C AUX (bioMérieux) o Uni-Yeast-Tek (Remel) en conjunto con hidrólisis de la urea y el análisis morfológico, pruebas que van orientadas a identificar levaduras patógenas. Pueden agregarse pruebas como la asimilación de nitritos, asimilación y fermentación de carbohidratos, inducción de ascosporas y el crecimiento en SDA a 42° C ^{2,5,17}.

1.4.2 Diagnóstico molecular

En esta área se han desarrollado nuevas técnicas basadas en el análisis del ADN como ejemplo de éstas tenemos la hibridación de ADN-ADN, electroforesis del cariotipo, polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción del ADN cromosomal, polimorfismo del ADN mitocondrial, análisis de microsatélites y polimorfismo del ADN aleatoriamente amplificado ²⁵. Desafortunadamente estas herramientas encaminadas a la identificación y diferenciación del agente involucrado en la enfermedad aún no pueden utilizarse para la diferenciación entre una infección o una colonización ²⁶.

1.4.3 Diagnóstico serológico

Se sabe que en la respuesta inmune en contra de hongos participan tanto la respuesta inmune humoral (los anticuerpos) como la respuesta inmune celular, sin embargo es la titulación de anticuerpos contra antígenos inmunodominantes como las mananas, la herramienta más utilizada en el diagnóstico de candidiasis ²⁷.

Se considera que la inmunidad mediada por anticuerpos en contra de *C. albicans* puede contribuir en la defensa del huésped por una actividad candidacidal, previniendo su adherencia, abasteciendo de opsoninas para una mejor fagocitosis, neutralizando las proteasas extracelulares o inhibiendo la transición de levadura a micelio ²⁶.

Los primeros antígenos utilizados en el diagnóstico serológico de la candidiasis invasora fueron las mananas, y hasta ahora han resultado ser eficaces para poder diferenciar entre una colonización y un proceso de enfermedad ocasionada por cualquier especie del género *Candida* ²⁶.

Para la evaluación de la respuesta serológica de la ubre, se ha medido la presencia de inmunoglobulinas específicas en el suero de la leche mediante inmunodifusión, ya que los anticuerpos persisten durante el período seco y hasta la siguiente lactación ²⁸.

1.5 ELISA indirecta

El total de inmunoglobulinas de las clases A y G (IgA e IgG) pueden ser determinados por ELISA indirecta. En animales previamente inmunizados con *C. albicans* se han encontrado en muestras de suero de leche títulos de anticuerpos más altos ($P < 0.001$) que en animales control (McConell, 2006). Normalmente la concentración de anticuerpos es baja pero en la mastitis aumenta la permeabilidad y puede encontrarse una concentración de hasta 80 mg/ml ²⁹.

En otro estudio por Hodkinson *et al.* 2007, midieron las concentraciones de IgG y de IgG1, en productos lácteos provenientes de animales hiperinmunizados y se encontró que las IgG1 responden en contra de *C. albicans* ^{30,31}.

En ensayos por Rogesler *et al.* 2001, con *P. zopffi* demostraron que al medir las concentraciones de IgA y de IgG en el suero de la leche la sensibilidad obtenida para diferenciar entre un animal enfermo y uno sano fue del 96% y el valor de corte más bajo fue de 1 unidad ELISA. También se pudo observar que cuando se miden las concentraciones de IgG es posible discriminar entre los animales con mastitis aguda y crónica. Además fue posible diferenciar entre un animal crónicamente infectado con cultivo positivo y uno no infectado ($P < 0.05$) cuando fue utilizado el suero de la leche y que en sueros de leche de animales no infectados no fueron detectados anticuerpos específicos ³².

Por lo anterior en el laboratorio de Micología del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, se propuso el uso de la prueba de ELISA indirecta para determinar el título de anticuerpos presentes en el suero de leche de animales sanos y con mastitis subclínica y clínica que tuvieron aislamiento de levaduras del género *Candida*. Además se decidió realizar la prueba en la muestra de leche completa para determinar si los componentes de la leche modificaban los resultados.

2. HIPÓTESIS.

La prueba de ELISA indirecta será útil para la detección de anticuerpos contra mananas de *Candida* spp en los sueros de leche y en la leche proveniente de vacas sanas, con mastitis subclínica y clínica.

3. OBJETIVOS.

3.1 Obtener mananas a partir del cultivo de una cepa de referencia de *Candida albicans* ATCC 10231.

3.2 Implementar la prueba de ELISA indirecta para detectar anticuerpos contra mananas de *Candida* spp en sueros de leche de vacas sanas y con mastitis subclínica y clínica.

3.3 Implementar la prueba de ELISA indirecta para detectar anticuerpos contra mananas de *Candida* spp en la leche de vacas sanas y con mastitis subclínica y clínica.

3.4 Analizar los datos obtenidos para conocer las tendencias de las muestras por su estado sanitario.

3.5 Comparar las absorbancias obtenidas de las muestras de leche con las obtenidas de suero de leche para saber si pueden utilizarse indistintamente.

3.6 Observar si existen diferencias en los títulos de anticuerpos por la especie de *Candida* aislada.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Cepa de referencia.

El laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, proporcionó el material, las instalaciones y los biológicos necesarios para la realización de este trabajo. La cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 fue sembrada en dos matraces con 20 ml de caldo peptona-dextrosa-extracto de levadura (PDY. BD Bioxon, Becton Dickinson de México) a 37° C en agitación a 130 revoluciones por minuto (rpm) por 24 horas para preparar el pre-inóculo el cual fue transferido a dos matraces con 1 L de PDY cada uno, para incubarse a 37° C/48 horas en agitación a 130 rpm y al final se centrifugó a 1 800 x g /10 min para obtener la biomasa. Finalmente la pastilla fue lavada dos veces con solución salina fisiológica (J.T. Baker, México) al 0.8% para retirar restos del medio de cultivo^{13, 23, 31}.

4.2 Extracción de mananas.

La biomasa se sometió a hidrólisis con hidróxido de sodio (J.T. Baker, México) al 6% a 80° C por tres horas. Se centrifugó (centrifuga Bekman A-17, EUA) a 5 600-7 600 x g por 15 min. El sobrenadante se ajustó a un pH de 5 con ácido acético glacial (J.T. Baker, México). Se centrifugó (Universal 32R, Hettich, Alemania) a 5 600-7 600 x g/15 min. Las mananas se precipitaron de el sobrenadante con la solución de Fehling (Hycel de México) vol. /vol. y se centrifugo a 5 600-7 600 x g por 15 min. La pastilla obtenida se resuspendió con ácido clorhídrico (HCl J.T. Baker, México) 3N. Las mananas se precipitaron con metanol (J.T. Baker, México) a 4° C y se centrifugo a 1 800 x g/10 min. Se lavó el precipitado con acetona (J.T. Baker, México) 3 veces y, cuando se evaporó la acetona, la

pastilla se resuspendió en 1 ml de agua destilada. A cada ml de muestra se le agregaron 0.4 ml de regulador salino de glicina (Caledon Biotech Reagent, Canadá) 0.1 M pH 7.4 con EDTA (United status biochemical, Cleveland) 0.1 M y se colocó en ebullición por 5 min para solubilizar las mananas. Se centrifugó a $1\ 910 \times g/20$ min. El sobrenadante se conservó a -20° C hasta la cuantificación de mananas ³³.

4.3 Cuantificación de mananas. Método de Dubois.

Se tomaron 200 μ l de la muestra y se le agregaron 200 μ l de solución de fenol (J.T. Baker, México) al 6% y rápidamente se agregaron 1800 μ l de ácido sulfúrico (J.T. Baker, México). Se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos para después incubar por 30 minutos a 30° C y leerse a 490 nm en un lector de ELISA (Biotek Instruments EL-800, USA) comparando con una curva estándar de manosa (Merck AG Darmstadt, Alemania) y dextrosa (BD Bioxon, Becton Dickinson, México) (Figuras 2 y 3) ^{33,34}.

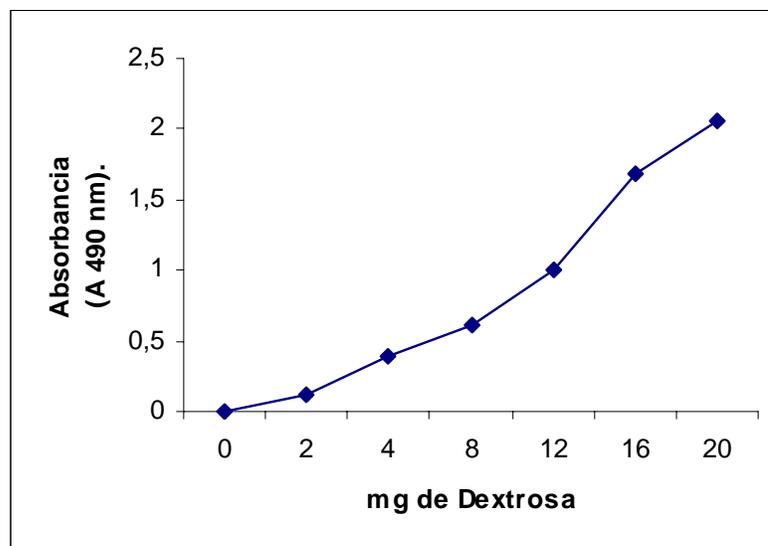


Figura 2. Curva Estándar de Dextrosa

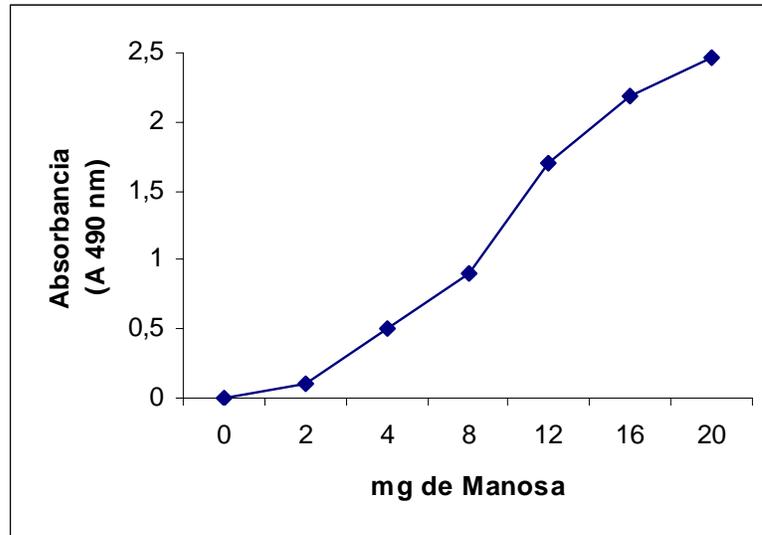


Figura 3. Curva Estándar de Manosa

4.4 Extracción del suero de leche de vacas sanas y con mastitis subclínica y clínica.

En un estudio previo fueron colectadas 1,095 muestras de leche de vacas mayores de 24 meses de edad de la raza Holstein-Friesian, alojadas en sistemas de producción intensiva de los estados de México, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Distrito Federal. Las muestras se agruparon en tres categorías con base a su estado sanitario determinado en campo mediante la prueba de California dividiéndose en sanas, subclínicas y clínicas. De las muestras mencionadas, en 285 se obtuvieron aislados de levaduras y se les realizó la caracterización bioquímica para determinar el género y especie. Para el presente estudio se evaluaron 188 (188/285) muestras mediante la técnica de ELISA indirecta (Cuadro 1)¹⁷.

A cada muestra se le realizó la prueba de ELISA indirecta para determinar los títulos de IgG a partir de la leche completa y del suero de la misma.

La obtención del suero de leche se realizó colocando 1 ml de la muestra en un tubo Eppendorf y se centrifugó por 10 minutos a 11 000 x g para separar la grasa y la caseína; se colectó la fracción clarificada y se transfirió a un tubo nuevo, repitiendo el procedimiento en caso necesario. Finalmente la muestra se conservó a -20° C para su posterior análisis mediante ELISA indirecta ³¹.

4.5 Obtención de sueros control.

Como controles positivos se emplearon sueros hiperinmunes donados por el laboratorio de Micología que se produjeron en conejos hembra de la raza Nueva Zelanda de 2.5 kg de peso aproximado con el siguiente protocolo: se inoculó 1 ml de células completas de *Candida albicans* inactivadas por calor a una concentración de 2×10^8 células/ml cinco veces por semana hasta que se obtuvo un título de aglutinación en placa de 1:1024. Al obtenerse los títulos requeridos se sangró en blanco a los conejos por punción cardíaca. Para obtener la fracción globulínica del suero hiperinmune contra *C. albicans* se siguió el método de precipitación con sulfato de amonio³³. El suero control negativo fue un suero de conejo adsorbido con glóbulos rojos de bovino para retirar hemoaglutininas inespecíficas, donado por el laboratorio de Serología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad.

Cuadro 1. Identificación bioquímica de las muestras de leche de vacas sanas y con mastitis subclínica y clínica.

Especie de <i>Candida</i>	SANAS	SUBCLÍNICAS	CLÍNICAS	Total de muestras
<i>C. krusei</i>	5	1	46	52
<i>C. glabrata</i>	38	0	12	50
<i>C. intermedia</i>	1	0	1	2
<i>C. albicans</i>	0	2	3	5
<i>C. macedoniensis</i>	1	0	0	1
<i>C. kefyr</i>	1	0	0	1
<i>C. norvergica</i>	1	0	0	1
<i>C. sloofii</i>	1	1	0	2
<i>C. viswanathii</i>	1	0	0	1
<i>C. zeylanoides</i>	2	2	0	4
<i>C. cantarelli</i>	0	1	0	1
<i>C. incomunis</i>	0	1	0	1
<i>C. viswanathii</i>	0	1	0	1
<i>C. clausenii</i>	0	0	10	1
<i>C. kefyr</i>	0	0	2	2
<i>C. lambica</i>	0	0	1	1
<i>C. lusitaniae</i>	0	0	1	1
<i>C. parapsilosis</i>	0	0	3	3
<i>Candida</i> spp	7	13	38	58
Total de muestras	56	24	108	188

4.6 Implementación de la prueba de ELISA indirecta.

Para probar la calidad del antígeno extraído, se realizó una prueba de ELISA indirecta con dos soportes de poliestireno (NUNC, EUA) de 96 pozos, una sensibilizada con el antígeno extraído de *C. albicans* y otra más con mananas de *Sacharomyces cerevisiae* (Sigma, EUA), ambas con una solución a una concentración de 10 µg/ml del antígeno. Se probaron con los sueros control positivo y negativo de conejo. El procedimiento para la realización de la prueba fue igual al que se describe, a continuación.

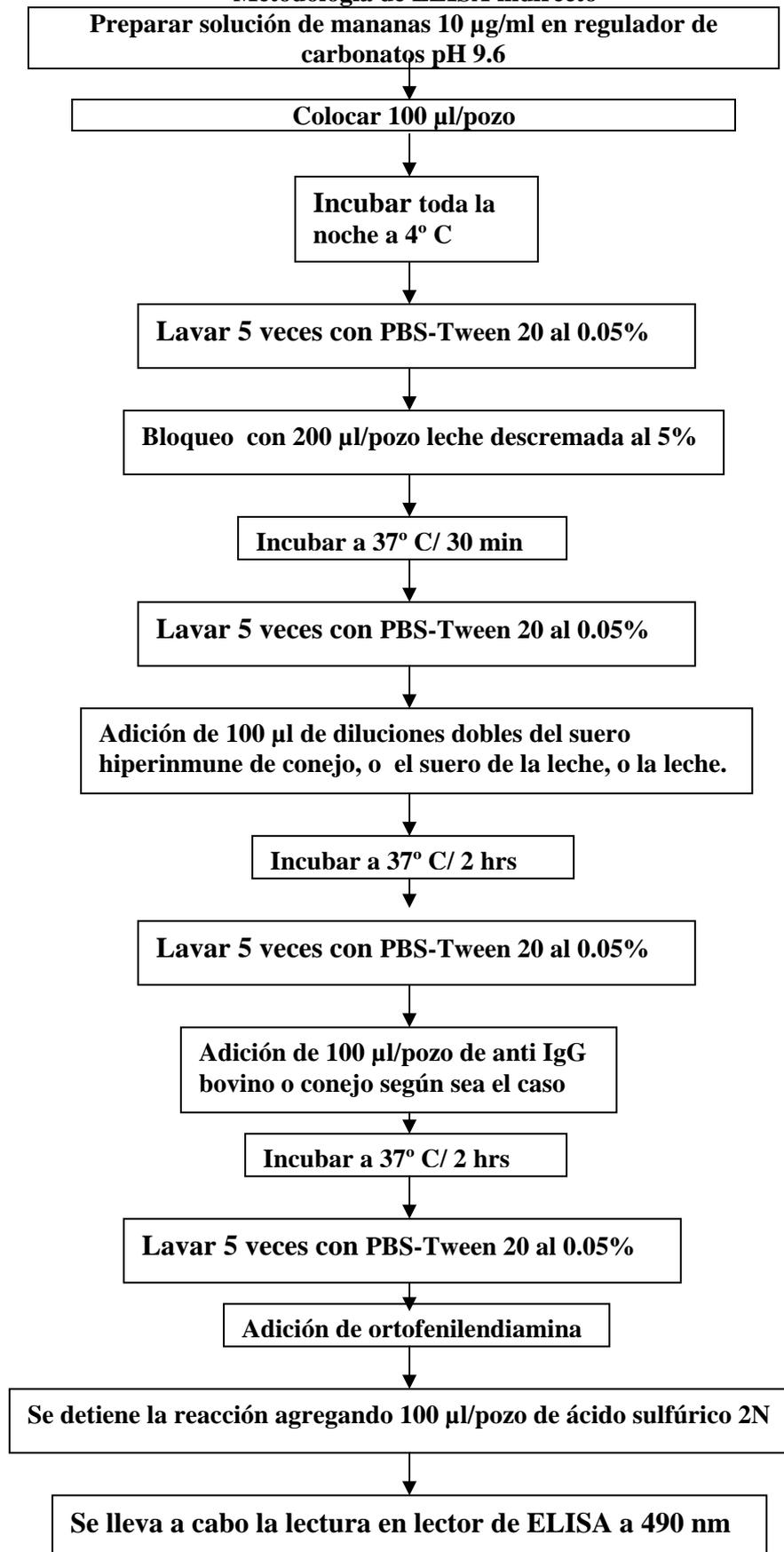
Se preparó una dilución en la solución de carbonatos pH 9.6 con mananas, para obtener una concentración de 10 µg/ml del antígeno extraído. Se sensibilizó el soporte de poliestireno con 96 pozos de fondo plano, con las mananas extraídas colocando 100 µl de la solución en cada uno de los pozos y se incubó toda la noche a 4° C. Los antígenos no fijados, se eliminaron mediante cinco lavados con amortiguador salino de fosfatos (PBS)-Tween 20 al 0.05% agitando la placa manualmente. Los sitios no ocupados en la placa se bloquearon colocando 200 µl/pozo de leche descremada (Difco, Francia) al 5% y se incubó a 37° C/ 30 min. Nuevamente se repitieron los lavados como ya se describió. Se colocaron 100 µl de diluciones dobles del suero de leche de vaca, o la leche comenzando con una dilución 1:1000 hasta 1: 64000 y en la última fila de la placa se colocaron los sueros controles de conejo, y se incubaron a 37° C/2 hrs. Se repitieron los lavados para eliminar los anticuerpos que no hubieran reaccionado. A cada pozo se adicionaron 100 µl de una dilución 1:1000 de anti IgG conjugados con peroxidasa (anti IgG de bovino y de conejo JAKCSON respectivamente) y se incubaron a 37° C/2 hrs. Para eliminar los anti-IgG marcados que no hubieran reaccionado, nuevamente se lavaron las placas. Se adicionaron 100 µl/pozo de ortofenilendiamina (Sigma-Aldrich, Alemania) al 0.04 % sobre

el que fue capaz de actuar la enzima marcadora. Se dejó actuar a la enzima por cinco minutos a 37° C y se detuvo la reacción agregando 100 µl/pozo de ácido sulfúrico 2N para posteriormente llevar a cabo la lectura en un lector de ELISA (Biotek Instruments EL-800, EUA) a 490 nm (Diagrama 1) ³⁶.

4.7 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 11, que nos permitió hacer un Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para calcular las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes grupos formados y compararlos entre sí ³⁵.

DIAGRAMA 1.
Metodología de ELISA indirecto



5. RESULTADOS

Las mananas extraídas fueron cuantificadas mediante la técnica de Dubois y se obtuvo una concentración de 10 mg/ml.

La calidad del antígeno obtenido se comparó con un antígeno comercial (*S. cerevisiae* SIGMA) mediante ELISA indirecta, observándose absorbancias similares con ambos antígenos al ser utilizados para conocer los títulos de anticuerpos antimananas en los sueros de conejos empleados como controles positivos y negativos (Figura 4).

Los datos obtenidos de las muestras de leche y suero de leche de las vacas sanas y con mastitis subclínica y clínica mediante ELISA indirecto se representaron considerando la media de las absorbancias (Figuras 5 y 6). Se observó que los valores generados de las leches de vacas con mastitis clínica no superaron a los valores del suero control positivo mientras que los obtenidos de las leches de vaca sana superaron al control negativo.

Por otro lado, los resultados a partir de las muestras de leche completa son semejantes a los obtenidos en el suero de la leche, permitiendo la detección de anticuerpos de la dilución 1:1000 hasta 1:64000, aún en los casos de vacas sanas.

Para el análisis de varianza las muestras se dividieron por el estado sanitario encontrándose que se consigue distinguir entre las muestras de vacas sanas y clínicas y a su vez entre subclínicas y sanas a partir de la dilución 1:8000 ($P = < 0.05$); en tanto que no se aprecia diferencia entre clínicas y subclínicas (Cuadros 2 y 3).

De igual forma se graficaron las medias de las absorbancias, de los títulos de anticuerpos de las muestras, con base en la especie de *Candida* aislada (Figuras 7-10); en este caso no se llevó a cabo el análisis estadístico por la disparidad en el número de muestras que compone cada uno de los grupos.

En los aislados de *C. krusei*, especie identificada en mayor número en las muestras de los casos de mastitis clínicas, se detectaron títulos de anticuerpos más altos que en los aislados provenientes las muestras de vacas sanas (Figura 7).

Para los aislados de *C. glabrata*, se observó que los títulos de anticuerpos son más altos en las muestras de vacas con mastitis clínica que en las de vacas sanas (Figura 8).

Con relación a los aislados identificados sólo hasta género (*Candida* spp), se observó que los títulos de anticuerpos en las muestras con mastitis subclínica son más altos que en las muestras de animales sanos y con mastitis clínica (Figura 9a, 9b).

Por lo que se refiere a los aislados de *C. albicans*, los títulos de anticuerpos detectados en las muestras de vacas con mastitis subclínica son más altos que en las muestras de mastitis clínica. Por otro lado los resultados de ambos estados sanitarios están por debajo de las medias obtenidas en los mismos estados sanitarios, cuando el aislado corresponde a *C. krusei* o *C. glabrata* (Figura 10).

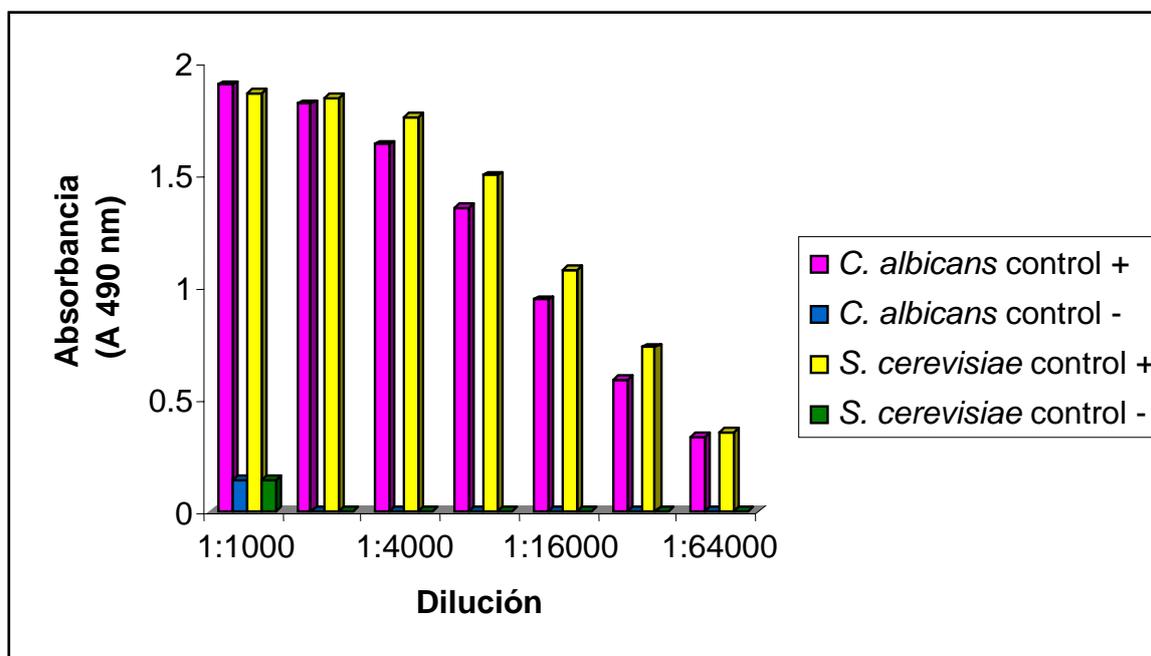


Figura 4. ELISA para comprobar la calidad del antígeno obtenido y titulación de sueros control.

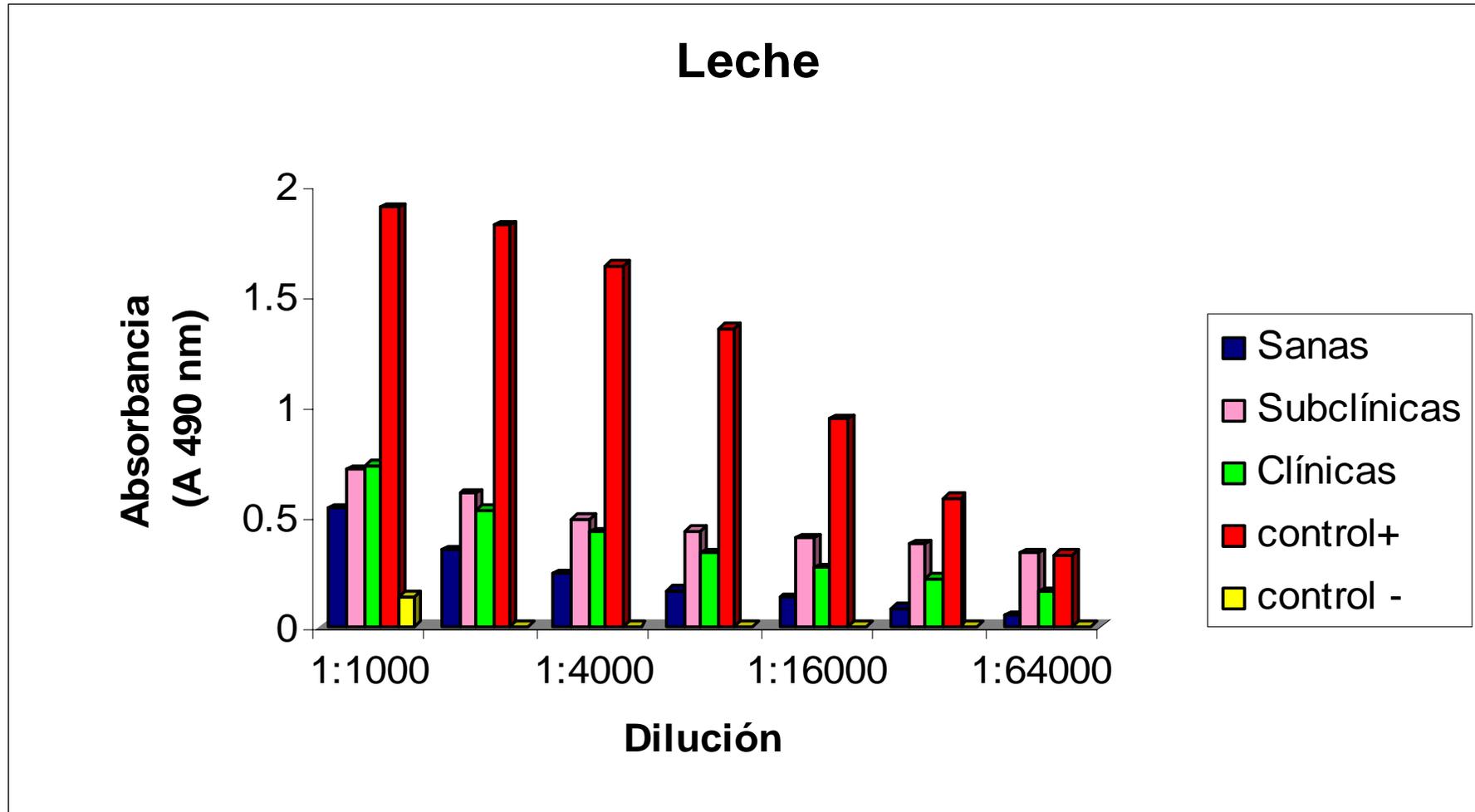


Figura 5. ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antimananas, en las muestras de leche de vacas sanas, con mastitis subclínica y clínica. Con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno, se grafican las medias de los valores de absorbancia.

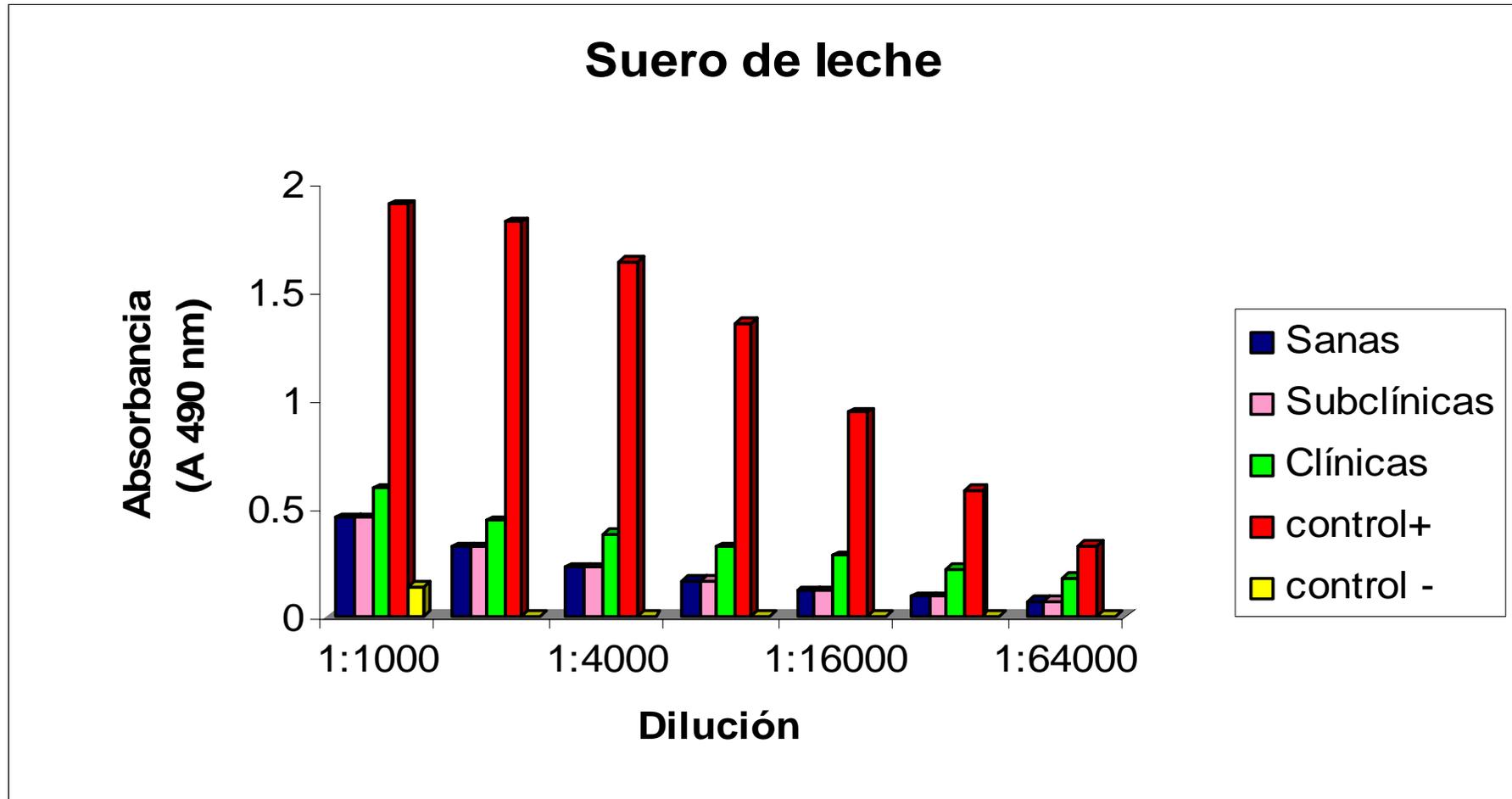


Figura 6. ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antimanas, en las muestras de suero de leche de vacas sanas, con mastitis subclínica y clínica. Con una concentración de 10 µg/ml de antígeno, se grafican las medias de los valores de absorbancias.

Cuadro 2. Valores del ANOVA de las absorbancias obtenidas a 490 nm en las pruebas de ELISA indirecta de las muestras de leche para la detección de anticuerpos antimananas. Las muestras se encuentran agrupadas por el estado sanitario.

Dilución	Estado Sanitario	N	Media de mínimos cuadrados	Error estándar
1:1000	Clínicas	61	0.874	0.084
	Subclínicas	7	0.915	0.150
	Sanas	37	0.646	0.049
1:2000	Clínicas	55	0.698	0.069
	Subclínicas	7	0.772	0.074
	Sanas	35	0.447	0.038
1:4000	Clínicas	54	0.577 ^a	0.058
	Subclínicas	7	0.630 ^{a, b}	0.085427
	Sanas	36	0.298 ^b	0.028965
1:8000	Clínicas	50	0.487 ^a	0.054265
	Subclínicas	7	0.557 ^a	0.076291
	Sanas	34	0.221 ^b	0.024624
1:16000	Clínicas	46	0.419 ^a	0.046132
	Subclínicas	7	0.518 ^a	0.071893
	Sanas	33	0.174 ^b	0.025701
1:32000	Clínicas	43	0.372 ^a	0.046941
	Subclínicas	7	0.482 ^a	0.074437
	Sanas	30	0.121 ^b	0.022945
1:64000	Clínicas	38	0.304 ^a	0.041102
	Subclínicas	7	0.432 ^a	0.076056
	Sanas	21	0.110 ^b	0.023538

Diferentes literales significan diferencia en las medias de las absorbancias ($P = < 0.05$)

Cuadro 3. Valores del ANOVA de las absorbancias obtenidas a 490 nm en las pruebas de ELISA indirecta de las muestras de suero de leche para la detección de anticuerpos antimananas. Las muestras se encuentran agrupadas por el estado sanitario.

Dilución	Estado Sanitario	N	Media de mínimos cuadrados	Error estándar
1:1000	Clínicas	59	0.726	0.076
	Subclínicas	7	0.927	0.174
	Sanas	36	0.566	0.044
1:2000	Clínicas	53	0.611	0.067
	Subclínicas	7	0.842	0.171
	Sanas	35	0.412	0.035
1:4000	Clínicas	49	0.566 ^a	0.062
	Subclínicas	7	0.638 ^a	0.077
	Sanas	35	0.288 ^b	0.033
1:8000	Clínicas	48	0.483 ^a	0.067
	Subclínicas	7	0.580 ^a	0.077
	Sanas	34	0.220 ^b	0.026
1:16000	Clínicas	45	0.446 ^a	0.066
	Subclínicas	7	0.540 ^a	0.083
	Sanas	32	0.169 ^b	0.025
1:32000	Clínicas	43	0.374 ^a	0.053
	Subclínicas	7	0.505 ^a	0.075
	Sanas	26	0.155 ^b	0.027

Diferentes literales significan diferencia en las medias de las absorbancias ($P = < 0.05$)
 En el grupo de las muestras de mastitis clínica, no se obtuvieron lecturas en las dilución 1: 64000, y no se compararon los grupos.

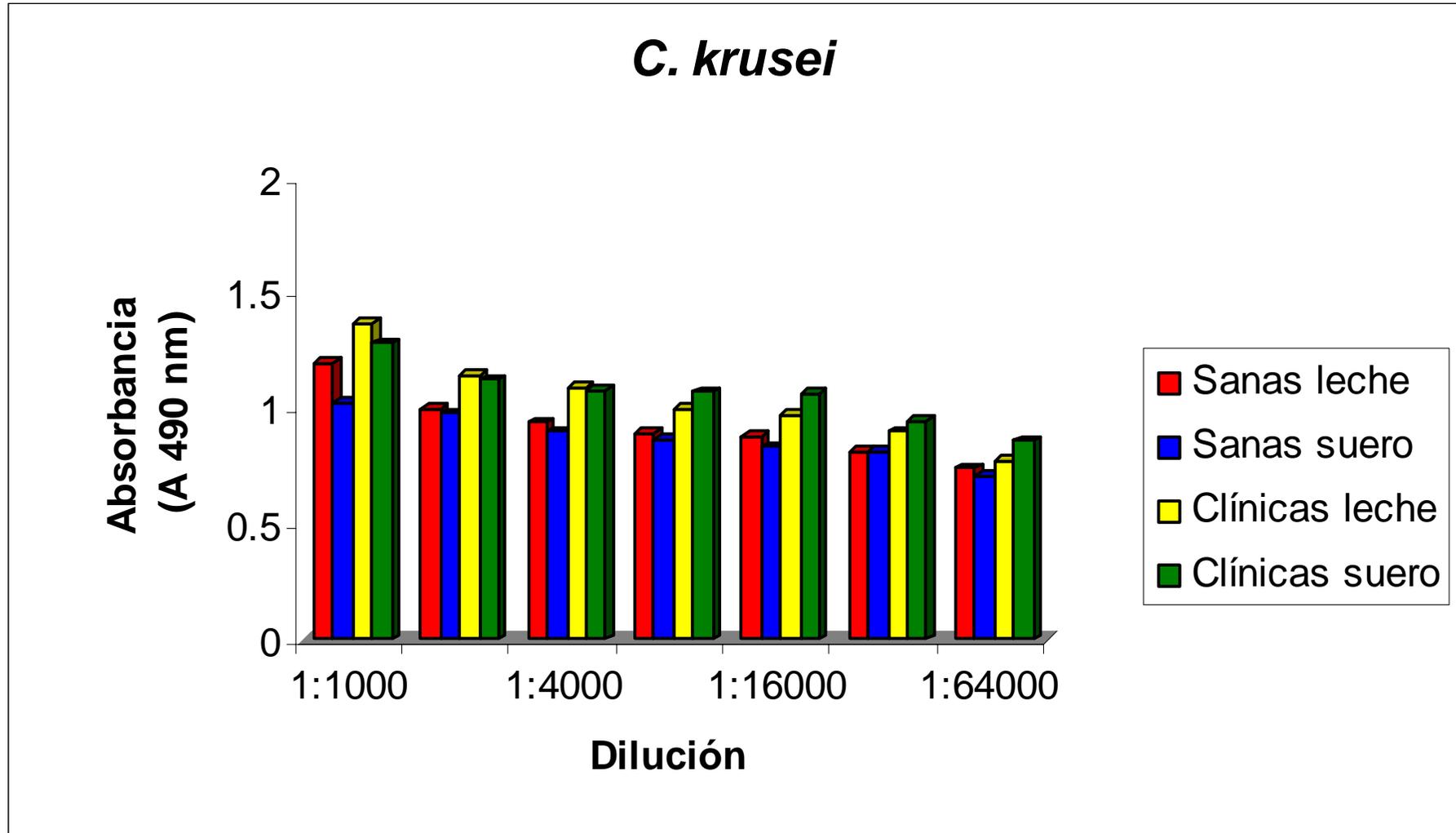


Figura 7. ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antimananas, en las muestras de vacas (leche y suero de leche) con aislados de *C. krusei*.

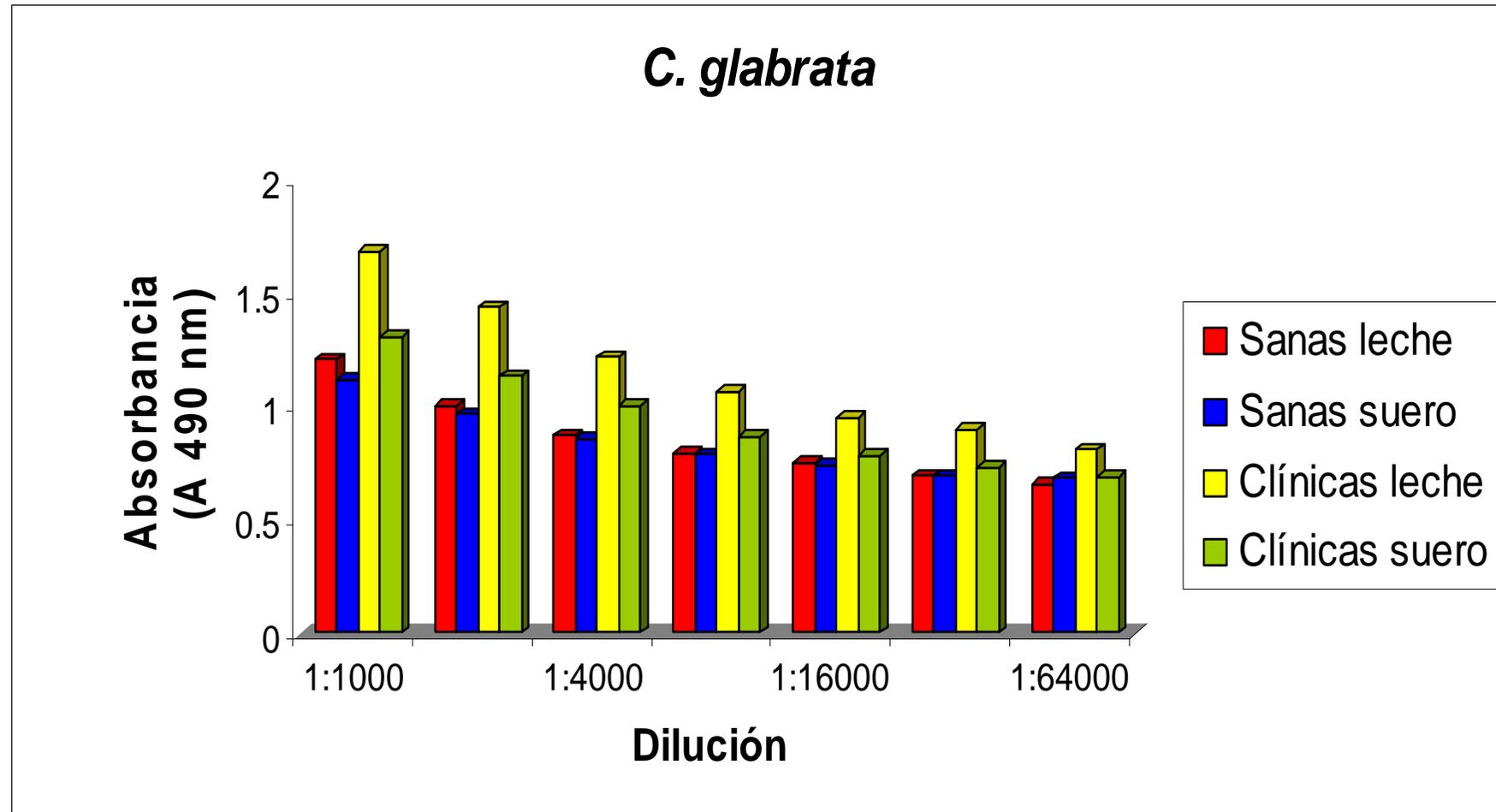


Figura 8. ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antimananas, en las muestras de vacas (leche y suero de leche) con aislados de *C. glabrata*

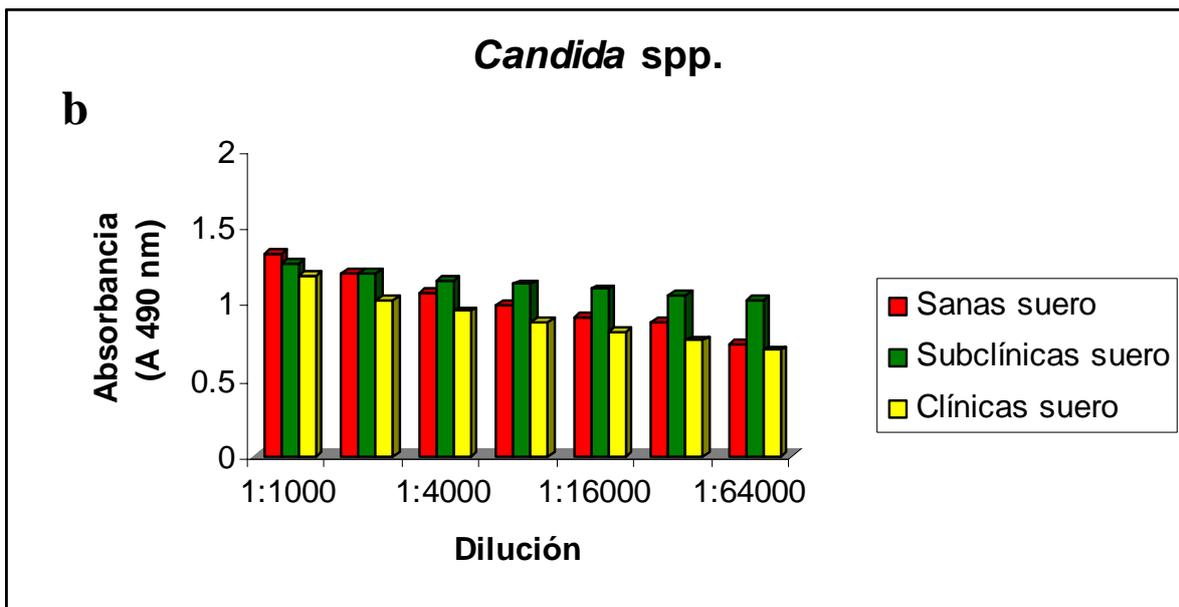
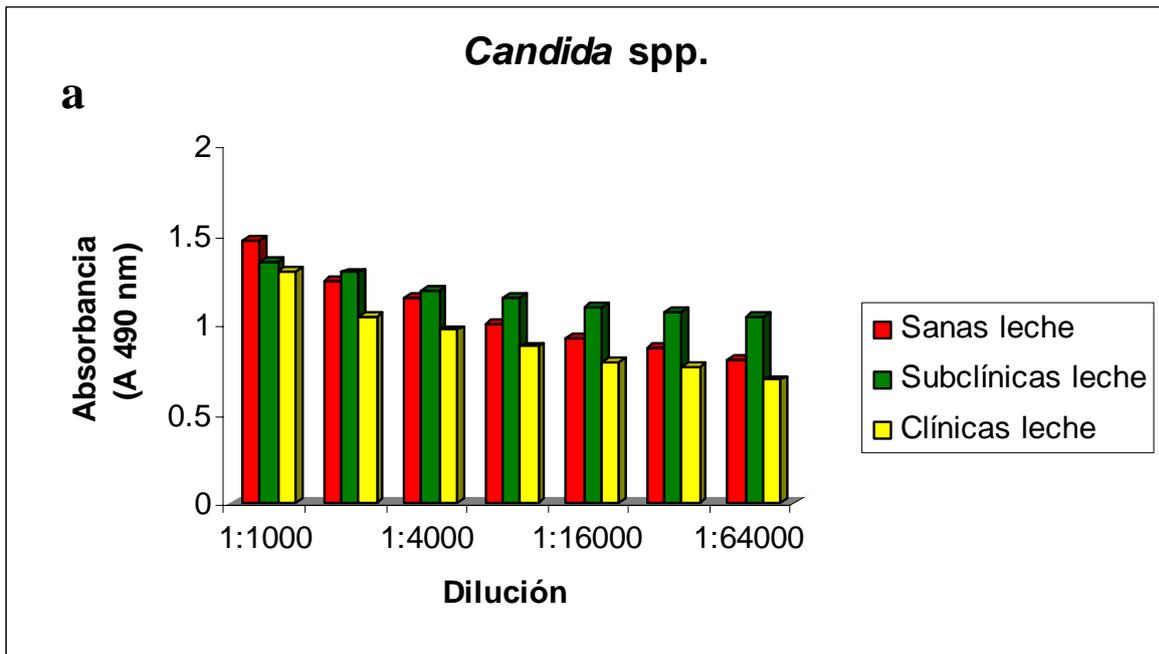


Figura 9a y 9b. ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antimananas, en las muestras de vacas con aislados de *Candida* spp. Para visualizar claramente los resultados se grafican por separado los valores obtenidos de la leche (a) y del suero de leche (b).

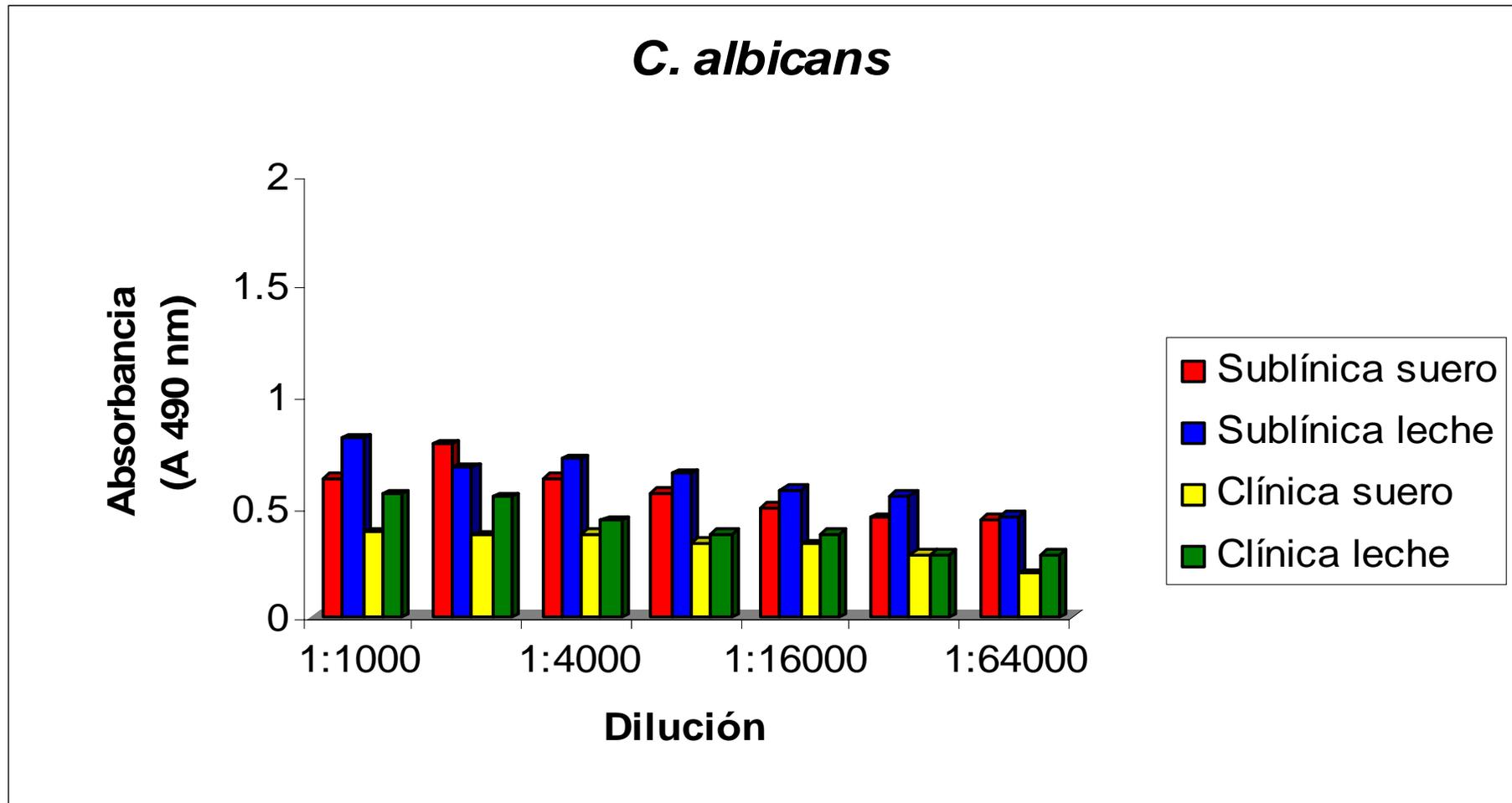


Figura 10. ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antimananas, en las muestras de vacas (leche y suero de leche) con aislados de *Candida albicans*.

6. DISCUSIÓN.

En el presente estudio, la calidad y pureza de las mananas (manoproteínas) obtenidas, se determinó en principio para los carbohidratos presentes, por medio del método de Dubois, mientras que para la detección de proteínas se realizó un gel de poliacrilamida. Aún cuando se han diseñado una serie de metodologías laboriosas y costosas para la purificación y obtención de carbohidratos libres^{18, 20, 21}, para efectos de este estudio solo se empleo la precipitación con licor de Fehling y metflica, sin embargo el antígeno obtenido se comparó con uno comercial encontrándose una respuesta muy semejante en los ensayos de ELISA indirecto.

Así mismo se confirmó que las mananas son componentes altamente antigénicos para el género *Candida*^{20, 21}, ya que al ser utilizados en la prueba de ELISA indirecta se detectaron anticuerpos en las muestras de leche y suero de leche sin relacionarse con la especie aislada. Es importante mencionar que aun cuando *S. cerevisiae* es un modelo para el estudio en la investigación en levaduras, no se le ha relacionado con infecciones y no es un comensal de mucosas como *Candida*, por lo que los títulos obtenidos no se relacionan con una reacción cruzada. Hasta el momento solo se sabe de reacciones cruzadas con mananas en infecciones por *Serratia marcescens* y *Salmonella thompson* cuando se realizaron pruebas serológicas en suero sanguíneo de bovinos³⁷.

Debido a que el aislamiento de *Candida* a partir de muestras clínicas no siempre es significativo, se han realizado numerosos estudios utilizando diversos marcadores fúngicos o midiendo los títulos de anticuerpos para diferenciar cuando las levaduras están como colonizadoras o como causantes de infección. La mayoría de estos trabajos se han llevado a cabo en el suero sanguíneo de pacientes humanos con candidiasis sistémica^{21, 38, 39}. En casos de mastitis bovina se ha evaluado el título de anticuerpos contra *P. zopffi* en el suero de leche de los animales afectados^{28, 32} o inoculados con

C. albicans por vía intraperitoneal o intramamaria. Además de que como antígeno para la sensibilización de las placas se ha utilizado antígeno somático, hasta donde llega nuestro conocimiento, está es la primera vez que se utiliza un antígeno específico como son las mananas de *Candida* para la detección de anticuerpos en muestras de leche de vaca que cursan por un proceso de mastitis.

En los trabajos realizados por Rogesler 2001, con *P. zopffi* se observó que la detección de anticuerpos de las clases IgG1 e IgA es mejor en muestras de suero de leche que cuando son evaluados en suero sanguíneo. En este trabajo se observó que la detección de anticuerpos de la clase IgG es indistinta si se utiliza leche completa o sólo el suero de la misma, al no registrarse variación significativa en los datos obtenidos.

Las muestras analizadas fueron colectadas durante el período de lactancia y no existió una mastitis previa por levaduras del género *Candida*, por lo que se podría suponer que el título de anticuerpos obtenido corresponde a una primera infección de tipo agudo en el caso de las muestras de mastitis clínica y subclínica.

Con relación a las muestras de leche de vacas con mastitis subclínicas respecto a las de vacas con mastitis clínica no se encontró diferencia significativa en el título de anticuerpos. Debe considerarse que en los casos clínicos el curso de la enfermedad es de tipo agudo entonces los anticuerpos se encontrarán bajos porque en una infección temprana los anticuerpos disminuyen al unirse a las levaduras para que estas sean eliminadas, hasta que comienza una nueva producción de anticuerpos de ahí que es importante tomar muestras pareadas, como sucede en el suero sanguíneo ²⁹.

Para los aislados de *C. krusei* y *C. glabrata* a partir de muestras de leche de vacas con mastitis clínica, el título de anticuerpos se encontró más alto en comparación a lo observado en las sanas, lo cual puede considerarse como una enfermedad en proceso.

En el grupo que corresponden a *Candida* spp, se observó que los títulos de anticuerpos en las muestras de vacas sanas y con mastitis clínica son similares a los obtenidos en los grupos de *C. krusei* y *C. glabrata*. Sin embargo, en las muestras de vacas con mastitis subclínica se observó que el título de anticuerpos es mayor que lo observado en los casos clínicos. De acuerdo a Sendid *et al.* 2002, la infección puede estar dada por diferentes especies de *Candida* y entonces los títulos se ven aparentemente elevados al comparar subclínicas con clínicas, o que como menciona Pontón 2006, los títulos varían dependiendo de la especie de *Candida* ya que entre ellas las concentraciones de mananas son diferentes. Aunque también cabe la posibilidad de que en los casos clínicos, *Candida* secreta proteasas que destruyen tanto a IgA como IgG, y que por ello sus títulos sean menores³⁹.

Por lo anterior, se considera que además de detectar anticuerpos contra mananas sería conveniente buscar en las muestras de leche al antígeno (mananas), así como utilizar otros antígenos. Es útil tomar muestras seriadas que permitan observar los cambios en los títulos de antígeno y anticuerpos^{26,39}.

Si bien no hay un consenso sobre que pruebas deben combinarse, se ha visto que la suma de pruebas incrementa la posibilidad de un buen diagnóstico²⁷.

En las muestras donde el aislado corresponde a *C. albicans*, fue inesperado encontrar títulos de anticuerpos más bajos que cuando el aislado corresponde a *C. krusei* o *C. glabrata*; debido en parte a que *C. albicans* por un buen tiempo había sido considerada la especie patógena aislada con mayor frecuencia en diversos procesos infecciosos en animales y de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, está ocurriendo una situación semejante a la que actualmente ocurre en humanos, donde los aislados de otras especies del género *Candida* están en aumento. Asimismo es motivo de estudio, determinar que factores influyen en que las diferencias de los títulos

de anticuerpos hayan sido dependientes de la especie aislada, como se observó en *C. glabrata* y *C. krusei* con relación a *C. albicans*.

En este trabajo se observó que *Candida* es un microorganismo capaz de estimular una respuesta inmune aún cuando se encuentre como comensal en la glándula mamaria, y que es posible distinguir de acuerdo a los títulos de anticuerpos entre vacas sanas de vacas con mastitis subclínica y clínica.

7. CONCLUSIONES.

1. Con la extracción de las mananas por hidrólisis alcalina se obtuvo un rendimiento de 10 mg/ml.
2. Los títulos de anticuerpos antimananas detectados mediante ELISA indirecto permitió diferenciar entre las muestras de leche de vacas sanas de las de mastitis subclínica y clínica.
3. Se consideraba como patógeno principal a *C. albicans*, pero nuestros resultados muestran que otras especies de *Candida* pueden estar involucradas en mastitis bovina.

8. PERSPECTIVAS.

Entre los trabajos propuestos para la continuación de este trabajo se encuentran:

1. Encontrar una metodología de extracción de antígeno con mayor rendimiento.
2. Uniformar los grupos de muestras por su estado sanitario, para poder determinar si existe una diferencia en los títulos de anticuerpos entre las muestras de leche de vacas subclínicas y clínicas.
3. Uniformar los grupos de muestras por el tipo de aislamiento obtenido, para poder determinar si existe una diferencia en base a la especie de *Candida* aislada.
4. Realizar la prueba con muestras de leche de vaca sin historia previa de mastitis por levadura, o sin aislamiento de estas.
5. Probar diferentes antígenos para determinar la especificidad de la prueba.
6. Implementar otras herramientas serológicas como el Western blot.
7. Trabajar con muestras de suero sanguíneo de los mismos animales a quienes se toman muestras de leche, para determinar si lo que ocurre con *P. zopffi* se repite con *Candida*, en lo que respecta a la detección de vacas positivas en período seco.

9. APENDICE.

Soluciones para la obtención de biomasa

- Caldo peptona-dextrosa-extracto de levadura (PDY)

20 g	Dextrosa
20 g	Peptona bacteriológica
10 g	Extracto de levadura
1 L	agua destilada

- Solución salina fisiológica (SSF) 0.8%

8 g	Cloruro de sodio (NaCl)
1L	agua destilada

Soluciones para la extracción de mananas

- Hidróxido de sodio (NaOH) 6%

6 g	NaOH
100 ml	agua destilada

- Ácido clorhídrico (HCl) 3N

- PBS de fosfato de sodio

0.7 g	Glicina
1.38 g	Fosfato de sodio mono-básico (Na ₂ HPO ₄)
2.70 g	Fosfato de sodio di-básico (Na H ₂ PO ₄)
100 ml	agua milliQ

Una vez que las sales están disueltas el pH se ajusta a 7.4.

- Regulador salino de Glicina 0.1 M pH 7.4 con EDTA 0.1 M

3.72 g	EDTA
100 ml	PBS de fosfato de sodio

Una vez que la sal está disuelta el pH se ajusta a 7.4.

Soluciones para la determinación de carbohidratos. Método de Dubois

- Solución de fenol al 5%

5 g	fenol
95 ml	agua destilada

Soluciones para la ELISA indirecta

- Amortiguador de carbonatos 0.15 M pH 9.6

3.18 g	carbonato de sodio (Na_2CO_3)
5.86 g	bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
800 ml	agua destilada

Ajustar el pH a 9.6 y aforar a 1000 ml con agua destilada.

- Solución de fosfatos. PB 10 X

2.62 g	fosfato de sodio monobásico monohidratado
11.5 g	fosfato de sodio di-básico anhídrido
200 ml	agua destilada

De ser necesario utilizar calor para disolver y aforar a 1000 ml con agua destilada.

- Solución salina de fosfatos 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2. PBS

100 ml	PB 10X
8.75 g	NaCl
800 ml	agua destilada

Ajustar el pH a 7.2 y aforar a 1000 ml con agua destilada.

- Amortiguador de lavado. PBS-Tween 20 al 0.05%

1000 ml	solución salina de fosfatos pH 7.2
0.5 ml	Tween 20

10. LITERATURA CITADA.

1. Jeffrey LW. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Micro.* 1988; 16: 41-66.
2. Richard JL, McDonald JS, Fichtner RE, Anderson AJ. Identification of yeasts from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. *Am J Vet Res.* 1980; 41 (12): 1991-1994.
3. Scaramelli A, González Z. Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina. *Manual de ganadería doble propósito.* Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad central de Venezuela, 2005: 328-332.
4. Rueda R. Micosis superficiales y dermatomicosis. *Colombia Médica* 2002; 33:10-16.
5. Chengappa M, Maddux RL, Greer SC, Pincus DH, Geist LL. Isolation and identification of yeast and yeast like organism from clinical veterinary sources. *J. Clin. Micro* 1984; 19(3): 427-428.
6. Lagneu PE, Lebtahi K, Swinnw D. Isolation of yeast from bovine milk in Belgium. *Mycopathologia.* 1996; 135: 99-102.
7. www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/capsulas/img
8. Gonzalez RN. *Prototheca*, yeast, and *Bacillus* as a cause of mastitis. *National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings* 1996.
9. García ME. y Blanco JL. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17: S2-S7.
10. Jones, JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Micro Rev* 1990; 3(1): 32-45.

11. Llovera V, Perurena MR. Identificación de levaduras de exudados vaginales: características clínicas asociadas a candidiasis. *Rev Cub Med Trop* 2004; 56(1): 21-25.
12. www.doctorfungus.org/thefungi/Candida_spp.htm.
13. Bikandi J, San Millan R, Regúlez P, Morangues MD, Quindós G, Pontón J. Detection of Antibodies to *Candida albicans* Germ Tubes during experimental infections by different *Candida* species. *Clin. And diag. Lab. Inmmun.* 1998; 5(3): 369-374.
14. Kurtzman, CP, Fell JW. The yeast, a taxonomic study. 4th edition. Elsevier. Amsterdam, 1998.
15. Odds FC. *Candida* and Candidosis. Leicester: University Press, 1979.
16. Martinez JP, Gil ML, López-Ribot JL, Chaffin WL. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin micro rev.* 1998; 11(1): 121-141.
17. Segundo ZC. Caracterización de hongos unicelulares aislados de leches normales y mastíticas, mediante pruebas bioquímicas y moleculares (tesis de doctorado). Ciudad de México: UNAM. FMVZ. 2008.
18. Calderone RA, Braun PC. Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. *Micro. rev.* 1991; 55(1): 1-20.
19. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathien D, Fruit J, Poulain D. New Enzyme Immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J. Clin Microb.* 1999; 37(5): 1510-1517.
20. Okawa Y, Goto K, Nemoto S, Akashi M, Sugawara C, Hanzawa M, Kawamata M, Takahata T, Shibata N, Kobayashi H, Suzuki S. Antigenicity of cell wall

- mannans of *Candida albicans* NHI B-792 (serotype B) strain cell cultured at high temperature in yeast extract containing Sabouraud liquid medium. *Clin and Diag Lab Immun.* 1996; 3 (3): 331-336.
21. Thierry J, Ibata-Ombetta S, Takeuchi O, Trinel PA, Sacchetti P, Lefebvre P, Akira S, Poulain D. *Candida albicans* Phospholipomannan Is Sensed through Toll-Like Receptors. *J. Infec. Dis.* 2003; 188:165–72.
22. Zhang M, Bohlman M, Itatani C. Human recombinant antimannan immunoglobulin G1 antibody confers resistance to hematogenously disseminated candidiasis in mice. *Infec Immun.* 2006; 74: (1):362-369.
23. Fah YS, Wong B. Current Status of Non culture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Clin Micro Rev.* 2002; 15(3): 465–484.
24. Ávila S. Fisiopatología de la Glándula Mamaria y Ordeño. México: FMVZ UNAM, 2001.
25. Hernández-Romahn A. Estandarización de la técnica de PCR para la identificación de levaduras aisladas de leche de vaca (tesis de licenciatura). Ciudad de México: UNAM. FMVZ. 2006.
26. Pontón J. El diagnóstico microbiológico independiente del cultivo en la candidiasis invasora. Importancia de los marcadores fúngicos. 2006; 23: 20-25.
27. Calderone R, Cihlar R. editores. Fungal Pathogenesis. Principles and clinical applications. Marcel Dekker, Inc. New York. 2002.
28. Roesler U, Hensel A. Longitudinal analysis of *Prototheca zopffi* specific immune responses: correlation with disease progression and carriage in dairy cows. *J. Clin Micro* 2003; 41(3): 1181-1186.
29. Tizard I. Inmunología veterinaria. 4a ed. Interamericana McGraw-Hill. México. 1995.

30. McConnell MA, Buchan G, Borissenko MV, Brooks HJL. A comparison of IgG and IgG1 activity in an early milk concentrate from non-immunised cows and a milk from hyperimmunised animals. *Food Res Int.* 2002; 34: 255-261.
31. Hodgkinson AJ, Cannon RD, Colmes AR, Fischer FJ, Willix-Payne DJ. Production from dairy cows of semi-industrial quantities of milk-protein concentrate (MPC) containing efficacious anti-*Candida albicans* IgA antibodies. *J Dairy Research.* 2007:1-7.
32. Roesler U, Scholz H, Hensel A. Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zoffii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. *J. Clin Micro* 2001; 39 (2): 539-543.
33. Chaparro J. Estandarización de la prueba de aglutinación con partículas de látex para el diagnóstico de antígeno circulante en infecciones por *Candida albicans* (tesis de licenciatura). Edo. de México: FES Cuautitlán. UNAM. 1993.
34. Dubois M, Gilles A, Hamilton J, Rebers P, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem* 1966; 28: 350-356.
35. Hernández, R. Análisis de la respuesta de anticuerpos de ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* contra Diaciltrealosa (DAT) y factor cuerda (CF) tratados con factor de transferencia (tesis de maestría) Ciudad de México: Esc. Nal de ciencias biológicas. IPN. 2007.
36. Correa D, Mandujano A, Medina Y. Manual de técnicas modernas en inmunología. OPS-SSA-INDRE. México. 2000.
37. Srinivasan A, Ni Y, Tizard I. Specificity and prevalence of natural bovine antimannan antibodies. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 1999; 6 (6): 946-952.

38. Nakajima T, Ballou CE. Characterization of the carbohydrate fragments obtained from *Saccharomyces cerevisiae* mannan by alkaline degradation. *J. Biol. Chem.* 1974; 249 (23): 7679-7684.
39. Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect Immun.* 1995; 63(11): 4211-4218.