



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

“Determinación de anticuerpos antimananas en las muestras de suero de leche de bovinos y caprinos sanos y con mastitis mediante un ensayo Western blot”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA

CECILIA QUIROGA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ROBERTO A. CERVANTES OLIVARES

COMITÉ TUTORAL:

DRA. IRENE CASTAÑO NAVARRO

M. en C. LAURA HERNANDEZ ANDRADE

COLABORADOR INVITADO:

DRA. CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA



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.

AGRADECIMIENTOS

A Caro mil gracias por tu apoyo y tu enseñanza, no tiene precio todo lo que has hecho por mí.

A RACO por ser un antes y un después en mi vida, ud. me ha mostrado otra cara de la vida que yo no conocía.

A mi comité tutorial: la Dra. Irene Castaño y la M en C. Laura Hernández, gracias por su apoyo y consejo fueron importantes en mi formación.

Al Dr. Ducoing por su participación y apoyo en el análisis de este trabajo.

A Isabel, Allan, Chary y Alonso porque gracias a su labor obtuve lo fundamental de este trabajo (las leches!!!!).

A la Dra. Cristina Rodríguez por ser tan buena maestra.

A Raquel por enseñarme a electroeluir.

A los integrantes de cada laboratorio del departamento de microbiología de la FMVZ por su colaboración y enseñanza.

A CONACYT por la beca 265523 dada a la sustentante y al proyecto PAPIIT 209908 que financió este trabajo.

A todos los que estuvieron apoyándome y que no recordé en este momento, pero ya me conocen y qué más puedo decir en mi defensa.

DEDICATORIAS

A mi madre, cada logro mío es tuyo por añadidura, pues nada podría ser sin tu cariño. Eres mi fuerza y mi consuelo y me muestras que es importante nunca dejar de aprender.

A Caro, es un honor conocerte y compartir esto contigo espero haberte demostrado lo que significas para mí y no pienses que te deshaces de mi solo te dejo descansar un rato.

A mi hermano porque me muestra que la familia siempre estará contigo, gracias por tu compañía.

A Edgar, gracias por estar cuando más te necesito y por querer como solo tú sabes, eres lo que había esperado y llegas para compartir un logro, espero que el primero de muchos que compartamos (tuyos y míos).

A RACO porque siempre será como mi papá, espero que no se olvide de mí que yo no lo olvidaré.

A mi familia, porque son mi historia y mi futuro gracias a todos por formar parte de mi vida.

Gracias a mis amigos Andy, Chucho, David y Ceci por ser parte de esta historia y acompañarme siempre.

A las honorarias Mely, Sophie, Denisse, Adriana, Nayeli, Alejandra por su apoyo en este trabajo.

A mis amigas Cris y Kari porque aunque no nos vemos tanto como quisiera su cariño y comprensión me dan fuerza cuando lo necesito.

INDICE

TEMA	Página
Índice de cuadros	I
Índice de figuras	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de mastitis	1
1.2 Mastitis micótica	2
1.3 Diagnóstico de mastitis micótica	3
1.3.1 Diagnóstico tradicional	3
1.3.2 Diagnóstico molecular	4
1.3.3 Diagnóstico serológico	4
1.3.3.1 Características y métodos de obtención de manoproteínas	5
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1 Aislamiento y caracterización de levaduras	12
4.1.1 Colección de muestras de leche	12
4.1.2 Aislamiento de levaduras de leche de cabra	12
4.1.3 Identificación tradicional de levaduras	13
4.2 Obtención del suero de leche para su empleo en la prueba de Western blot	13
4.3 Obtención de manoproteínas	13
4.3.1 Producción de biomasa	13
4.3.2 Rompimiento mecánico y obtención del extracto crudo de pared celular	13
4.3.3 Determinación de proteínas por el método de Bradford	13
4.3.4 Identificación de manoproteínas. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 5%	14
4.3.5 Purificación de manoproteínas de <i>C. albicans</i> por el método de electroelución	14
4.4 Western blot	15
4.4.1 Inmunotransferencia de los extractos crudos de pared celular	15
4.4.2 Inmunotransferencia del producto de electroelución	16
4.5 Análisis estadístico	16
5. RESULTADOS	17
5.1 Aislamiento e identificación de levaduras	17
5.2 Obtención del extracto crudo de pared y determinación de proteínas	18
5.3 Detección de manoproteínas en el extracto crudo. Gel SDS-PAGE al 5%	19
5.4 Purificación de manoproteínas por el método de electroelución	19
5.5 Western blot	20
5.5.1 Inmunotransferencia de los extractos crudos de pared celular	20
5.5.2 Inmunotransferencia del producto de electroelución	21
5.6 Análisis estadístico	29
5.6.1 Análisis por el teorema de Bayes	29
5.6.2 Análisis de contingencia	30
6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	41
8. PROPUESTA	42
9. LITERATURA CITADA	43
10. ANEXO	48

Índice de cuadros

Cuadro	Título	Página
1	Conteo de células somáticas (SCC) de glándula mamaria de vacas sanas y con mastitis	1
2	Conteo de células somáticas (SCC) de glándula mamaria de cabras sanas y con mastitis	2
3	Muestras de leche colectadas	12
4	Sueros de leche de vacas utilizadas en la prueba de Western blot de los extractos crudos de pared de las cepas de referencia	15
5a	Aislados obtenidos de leche de cabra	17
5b	Aislados obtenidos de leche de vaca en un estudio previo	18
6	Determinación de proteínas por el método de Bradford del extracto crudo de pared de las cepas de referencia	19
7	Western blot con sueros de leche de vaca con y sin aislamiento de levaduras	22
8	Bandas de manoproteínas, detectadas en sueros de leche de vacas con mastitis clínica y con aislado de levaduras	25
9	Muestras de leche de cabra empleadas en el Western blot	26
10	Resultados del análisis de los datos del Western blot por el teorema de Bayes	30
11	Detección de manoproteínas por Western blot en muestras de suero de leche de vacas con diferente estado sanitario	31
12	Detección de manoproteínas por Western blot de muestras de suero de leche de vacas y aislado de levaduras	32

Índice de figuras

Figura	Título	Página
1	Manoproteínas y fosfolipomananas de la pared de <i>C. albicans</i>	7
2	Diferencias en la composición de la pared con respecto de las manoproteínas de <i>S. cerevisiae</i> (a), <i>C. albicans</i> (b) y <i>C. neoformans</i> (c)	8
3	Perfil electroforético de los extractos crudos de pared, teñido con azul de Coomasie	19
4	Manoproteínas purificadas por electroelución, teñido con azul de Coomasie	20
5	Western blot con extracto crudo de pared celular de especies de <i>Candida</i>	21
6	Western blot de diluciones de suero de leche de vaca	21
7	Western blot de diluciones de sueros de leche de cabra	22
8	Western blot de sueros de leche de vacas sanas sin aislamiento de levaduras	23
9	Western blot de sueros de leche de vacas sanas con aislamiento de levaduras	23
10	Western blot de sueros de leche de vacas con mastitis subclínica sin aislamiento de levaduras	24
11	Western blot de sueros de leche de vacas con mastitis subclínica con aislamiento de levaduras	24
12	Western blot de sueros de leche de vacas con mastitis clínica sin aislamiento de levaduras	25
13	Western blot de sueros de leche de vacas con mastitis clínica con aislamiento de levaduras	26
14	Western blot de sueros de leche de cabras sanas sin aislamiento de levaduras 1S y 5S	27
15	Western blot de sueros de leche de cabra sana con aislamiento de levadura 2S	27
16	Western blot de sueros de leche de cabras sanas con aislamiento de levaduras 3S y 4S	28
17	Western blot de sueros de leche de cabras sanas con aislamiento de levaduras 6S y 7S	28
18	Western blot de sueros de leche de cabras con mastitis subclínica	29
19	Western blot de sueros de leche de cabras con mastitis clínica	29
20a	Análisis de contingencia de la detección de anticuerpos contra manoproteínas de 53.2 kDa en sueros de leche de vaca por estado sanitario	31
20b	Análisis de contingencia de la detección de anticuerpos contra manoproteínas de 62 kDa en sueros de leche de vaca por estado sanitario	32
21	Análisis de contingencia de la detección de anticuerpos contra manoproteínas de 53.2 kDa en sueros de leche de vaca por estado sanitario y aislamiento de levaduras	33
22	Análisis de contingencia de la detección de anticuerpos contra manoproteínas de 62 kDa en sueros de leche de vaca por estado sanitario y aislamiento de levaduras	34

RESUMEN

La mastitis en rumiantes es una enfermedad que genera enormes pérdidas económicas, generalmente está asociada a bacterias y en menor porcentaje (4-13%) a levaduras, siendo más frecuentes aquellas del género *Candida*.

La identificación de levaduras se realiza por métodos micológicos tradicionales que requieren tiempo para su resultado e interpretación. Entre las alternativas de identificación se encuentran las pruebas serológicas como el ELISA indirecto que se ha empleado para detectar anticuerpos antimanas de *C. albicans* en suero de leche de vacas, logrando diferenciar entre vacas sanas de aquellas con mastitis. Otra técnica empleada es el Western blot que detecta anticuerpos en suero de humanos con candidiasis, contra manoproteínas que pesan 33, 49 y > 60 kDa.

El objetivo del presente estudio, fue detectar anticuerpos contra manoproteínas de *C. albicans* utilizando la prueba de Western blot en muestras de suero de leche de rumiantes para diferenciar el estado sanitario. Se colectaron 611 muestras de leche de cabras sanas de diferentes estados sanitarios. 596 muestras de 60 animales sanos fueron obtenidas a los 15, 60, 105 y 150 días de lactación, mientras que 12 muestras de leche de cabras con mastitis subclínica y 3 muestras clínicas se tomaron del medio afectado.

A partir de las leches de cabra se aislaron e identificaron por la metodología micológica tradicional a 4 aislados de *C. parapsilosis*, 2 de *C. lipolytica* y 1 aislado de *C. albicans*. Así mismo, el laboratorio de Micología proporcionó 266 muestras de leche de vacas (78 sanas, 45 con mastitis subclínica y 143 con clínica), de las que previamente se había realizado la identificación micológica tradicional de 176 aislados de diferentes especies de *Candida*.

Las mananas de *C. albicans* ATCC 10231 se obtuvieron por extracción química con β -mercaptoetanol y se purificaron por electroelución obteniendo una concentración de 577 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno. Para la prueba de Western blot, se utilizaron 150 $\mu\text{g/ml}$ de manoproteínas y diluciones de 1/50 de los sueros de leche de cabra y 1/800 de los sueros de leche de vaca. Dicha prueba tuvo una sensibilidad del 85.9%, una especificidad del 94.7%, un valor de predictivo negativo del 87.5% y un valor predictivo positivo del 94% con la detección de manoproteínas de 53.2 kDa.

Palabras clave: *C. albicans*, levaduras, elución, rumiantes, manoproteínas.

ABSTRACT

Mastitis in ruminants is a disease that results in high economic losses. Infectious mastitis is often associated with bacteria and in a small percentage (4-13%) yeasts, being the genus *Candida* the more frequently isolated. The identification of yeast is made by traditional mycological methods, including morphological and biochemical criteria which require time for results and interpretation. Among the identification alternatives include serological tests as indirect ELISA that has been used to detect antimannan antibodies of *Candida albicans* in whey from cow's milk, sorting the difference between healthy cows and those with mastitis. Another technique used is Western blot which detects mannoproteins antibodies weighing 33, 49 and > 60 kDa, in serum of humans with candidiasis.

The aim of this study was to detect mannoproteins antibodies of *C. albicans* using the Western blot test in whey samples of milk from ruminant animals to differentiate the sanitary status. The milk was obtained from 611 goats with different sanitary status. 596 samples from 60 healthy animals were taken at 15, 60, 105 and 150 milking days, 12 samples from goats with subclinical mastitis and 3 clinical samples from one of the affected udder half.

From goat milk were isolated and identified by the traditional mycological methods 4 isolates of *C. parapsilosis*, 2 *C. lipolytica* and 1 isolate of *C. albicans*. Likewise, the laboratory of Mycology provided 266 cow milk samples (78 healthy, 45 with subclinical mastitis and 143 with clinical mastitis), of which previously had performed the traditional mycological identification of 176 isolates of *Candida* species.

Mannans from *C. albicans* ATCC 10231 were obtained by chemical extraction with β -mercaptoethanol and purified by electroelution getting an antigen concentration of 577 mg/ml. In the Western blot test, 150 μ g/ml of mannoproteins were used and dilutions of 1/50 of whey from goat milk and 1/800 whey from cow milk. This test had a sensitivity of 85.9%, a specificity of 94.7%, negative predictive value of 87.5% and positive predictive value of 94% with the detection of the 53.2 kDa mannoproteins.

Key words: *C. albicans*, yeast, elution, ruminants, mannoproteins.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de mastitis

Un padecimiento importante en medicina veterinaria es la mastitis en rumiantes, que generalmente se presenta como respuesta a la invasión por microorganismos y sus toxinas, trauma físico, productos químicos, temperaturas extremas, entre otras ^{1,2,3,4}. En vacas, la mastitis es un padecimiento de control difícil por la gran cantidad de factores predisponentes involucrados: a) el estrés metabólico al que están sometidos los animales por las grandes cantidades de leche que producen, b) la dilución de los elementos propios de la leche que confieren protección a la glándula, c) mal manejo del ordeño, d) inmunosupresión del animal (por la edad, lactación y el parto), e) deficiencia de minerales y/o antioxidantes, f) desbalance energético, g) alimentación con plantas de alto contenido en fitoestrógenos, h) falta de higiene durante el ordeño y i) debilitamiento de la resistencia natural del conducto del pezón ^{1,2,5}. En cabras es poco lo que se sabe de los factores predisponentes de mastitis, sólo se reconoce que en un sistema de producción intensivo o en donde exista la infección previa por el virus de la artritis-encefalitis caprina aumenta el número de casos ^{6,7}. Los problemas de mastitis, tanto en vacas como en cabras, generan a nivel mundial enormes pérdidas económicas debido a la disminución de la producción láctea, incremento en los costos de servicios veterinarios, medicamentos y reemplazos de animales no planeados ^{1,8}. El diagnóstico de mastitis en campo se realiza mediante la exploración física, la prueba de tazón oscuro y la prueba de California. Las dos últimas pruebas basan sus resultados en la presencia de células somáticas, las cuales varían en el tipo y cantidad celular de acuerdo a la especie animal afectada, por ejemplo vacas (Cuadro 1) y cabras (Cuadro 2) ^{1,9,10}.

Cuadro 1. Conteo de células somáticas (SCC) de glándula mamaria de vacas sanas y con mastitis.

Cuarto	SCC	Composición de SCC (%)			
	(células/ ml de leche)	Neutrófilos	Macrófagos	Linfocitos	Células epiteliales
Sano	< 200,000	0-11	66-88	10-27	0-7
Con mastitis	>200,000	50-95	9-32	14-24	0-9

Tomado de Paape *et al* 2001.

Cuadro 2. Conteo de células somáticas (SCC) de glándula mamaria de cabras sanas y con mastitis.

Medio	SCC	Composición de SCC (%)			
	(células/ ml de leche)	Neutrófilos	Macrófagos	Linfocitos	Células epiteliales
Sano	<280, 000	45-74	15-41	9-20	1
Con mastitis	>1,690,000	71-86	8-18	5-11	6

Tomado de Paape *et al* 2001.

Para la identificación del agente causal de mastitis se cuenta con diferentes metodologías como la microbiológica tradicional, pruebas serológicas y moleculares ^{1,4,11,12,13,14}. Se sabe que a partir de muestras de leche de vacas con mastitis es posible aislar e identificar bacterias como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium bovis*, *C. pseudotuberculosis*, *Staphylococcus* spp, ^{1,3} *Streptococcus* spp, *Pasteurella haemolytica* y *Mycoplasma* spp. ⁶ así como levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus* además de hongos filamentosos como *Aspergillus* spp ¹⁵ y *Trichosporon* sp ¹⁶.

En mastitis en cabras se han reportado aislados de bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* cuagulasa negativos, *Clostridium* spp, *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *C. pseudotuberculosis*, *Mycoplasma* spp y coliformes ^{6,17}. Con relación a hongos, los aislados son escasos y se presentan los mismos géneros que en vacas.

Debido a que la proporción de mastitis causada por bacterias es mayor a cualquier otro agente casual, generalmente se proporcionan tratamientos con antibacterianos, siendo un factor predisponente para la presentación de casos de mastitis micótica ^{1,4}.

1.2 Mastitis micótica

Los casos de mastitis micótica en vacas varían del 2 al 13%, lo cual está relacionado con el clima, la región y las condiciones sanitarias del sistema de producción donde se haya realizado el estudio por ejemplo, en climas tropicales la prevalencia se ha reportado hasta en un 13%, mientras que en sistemas europeos no rebasa el 4% ^{5,16,18,19}. Además del tratamiento prolongado con antibacterianos, otros factores relacionados a la mastitis micótica en vacas son: a) la infección previa con otros microorganismos, b) mal manejo del ordeño, además, se ha observado una estacionalidad con aumento de casos de mastitis micótica en primavera ^{2,5}. Como se mencionó, a partir de leche de vacas con mastitis micótica, se han aislado levaduras

del género *Candida* y en menor medida a *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula* spp y hongos filamentosos ^{4,8,16,18}. Entre las especies del género *Candida*, *C. krusei*, *C. kefyr* y *C. tropicalis* se aíslan con frecuencia en muestras de leche de vacas con mastitis ^{4,8,16,19}, en tanto que en muestras de leche de vacas sanas se ha aislado con mayor frecuencia a *C. glabrata* ². Estas levaduras pueden causar una signología inespecífica con dolor, fiebre prolongada, inflamación de los nódulos linfáticos supramamarios, caída en la producción de leche, secreción con aspecto viscoso, mucoide y de color blanco–grisáceo y generalmente es una mastitis resistente a antibióticos, pero que puede resolverse satisfactoriamente con la aplicación de yoduros ^{1,20}. En casos de mastitis crónica por *C. maltosa* en vacas, se ha observado en la necropsia, tejido glandular con múltiples focos de necrosis, tejido de granulación, levaduras rodeadas de neutrófilos y células gigantes ²⁰.

Por otro lado, y con relación a otra especie animal afectada por levaduras, se ha observado que a partir de leche de cabras sanas (y sus derivados) es posible aislar *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *Pichia guilliermondii* ²¹. De manera experimental se ha demostrado la capacidad de *Candida albicans* de producir mastitis, la cual cursó con agalactia, secreción mucopurulenta, inflamación de los nódulos supramamarios, secreción sanguinolenta y neutrofilia; microscópicamente se hallaron granulomas de células gigantes que rodeaban a las levaduras ²². También se han realizado infecciones de manera experimental con *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* ²³ y *Cryptococcus neoformans* ²⁴, en todos los casos se tuvieron presentaciones clínicas semejantes a la descrita en la infección por *C. albicans*.

1.3 Diagnóstico de mastitis micótica

1.3.1 Diagnóstico tradicional

El diagnóstico de mastitis micótica está basado en la observación directa de las muestras además del cultivo, al igual que en otras micosis el diagnóstico se enfrenta a la problemática de no poder relacionar la presencia del microorganismo con una colonización ó un proceso de enfermedad, por lo tanto su diagnóstico debe ser realizado por un conjunto de pruebas y basado en evidencias clínicas ^{11,25,26}. Para la identificación de levaduras, suele utilizarse la metodología microbiológica tradicional basada en una combinación de criterios morfológicos y bioquímicos que permiten la diferenciación de especies. Estas pruebas involucran las características del cultivo, la formación de estructuras de reproducción asexual, presencia o ausencia de estructuras sexuales y sus características bioquímicas y fisiológicas (asimilación y fermentación de carbohidratos, ureasa, sensibilidad a la ciclohexamida y producción

de película en caldo Sabouraud). Sin embargo, esta metodología requiere mucho tiempo para concluir la identificación. Es posible encontrar pruebas comerciales como Uni-Yeast-Tek (Remel), CHROMOagar *Candida* (CHROMOagar) ⁴ ó API 20C AUX system (Bio Mérieux, France) ¹⁶ dichas pruebas proporcionan una identificación confiable que requieren de tiempo y no pueden identificar a todas las especies de *Candida* ⁴ ni determinar si se encuentran como comensales o como causantes del proceso de enfermedad ^{12,25}. Por lo anterior, se han diseñado herramientas moleculares y serológicas rápidas para la identificación de *Candida*, a partir de muestras que sean de relevancia clínica y epidemiológica ¹². Para el diseño de estas pruebas se han empleado factores de patogenicidad de *C. albicans* como: enzimas (fosfolipasa, ácido carboxil proteasa, hemolisinas), adhesinas que pueden inhibir la fagocitosis o suprimir la respuesta inmune humoral y celular (manoproteínas) y la formación de pseudohifas ^{26,27,28}.

1.3.2 Diagnóstico molecular

De las herramientas moleculares diseñadas para la identificación rápida y precisa de levaduras del género *Candida* se cuenta con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el análisis de diferencias cariotípicas electroforéticas y polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción genómica (RFLPs) ^{12,29,30,31,32} y Southern blot ³³. Estas pruebas se basan en la detección de diferentes genes blanco para la identificación de especies basadas en la variación genética, siendo eficientes en la diferenciación de las principales especies de *Candida* involucradas en procesos clínicos, por ejemplo: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*. Sin embargo, estos métodos han sido diseñados para el diagnóstico de candidiasis en humanos a partir de diversas muestras clínicas ^{29,30,32} y se desconoce de una metodología implementada para detectar el ADN de estas levaduras a partir de muestras de origen animal. Con las herramientas moleculares se ha logrado determinar la presencia de *Candida*, aunque no de una forma cuantitativa y aún no pueden diferenciar entre una colonización y un proceso de enfermedad ¹¹. Con el afán de lograr ésta diferenciación, se han diseñado diferentes pruebas serológicas ¹³.

1.3.3 Diagnóstico serológico

La detección y titulación de anticuerpos en infecciones por *Candida* son una herramienta útil en su diagnóstico, aún cuando el papel que desempeñan los anticuerpos no es claro, se ha observado su capacidad para inhibir la adherencia de

la levadura a la célula huésped, inhibición del desarrollo del tubo germinal y una actividad anti *Candida* directa ³⁴.

Actualmente se emplea la detección y titulación de anticuerpos antimananas de *Candida* ²⁶, logrando en algunos trabajos con candidiasis humana, diferenciar entre una colonización y un proceso de enfermedad ¹³.

En animales se han utilizado pruebas como ELISA indirecta y Western blot, para evaluar la respuesta serológica de la ubre empleando el suero de la leche ^{13,34,35,36,37,38}, debido a que durante un proceso de mastitis se incrementa la permeabilidad de los vasos sanguíneos de la ubre y los anticuerpos pueden encontrarse en la leche en una concentración de hasta 80 mg/ml ³⁹, estos anticuerpos persisten durante el período seco e incluso en la siguiente lactación ³⁵. Se han determinado inmunoglobulinas IgA e IgG en suero de leche de vacas hiperinmunizadas con *C. albicans*, encontrándose que las IgG1 responden de manera específica contra las manoproteínas ³⁶. En otro estudio se utilizaron las mananas de *C. albicans* en la técnica de ELISA indirecta logrando detectar concentraciones de anticuerpos en suero de leche de vacas de la cual se aislaron *C. krusei* y *C. glabrata*, los títulos de anticuerpos permitieron diferenciar animales sanos de animales con mastitis subclínica y clínica ¹³.

Por otro lado, la prueba de Western blot se ha empleado experimentalmente para detectar anticuerpos antimananas en el suero sanguíneo de conejos hiperinmunizados con diferentes especies de *Candida* ⁴⁰⁻⁴⁵, y se logró determinar que comparten una banda de manoproteína con un peso mayor a los 200 kilo Daltones (kDa) cuando el extracto es de la fase micelial o del tubo germinal ^{40, 43}. Así mismo, se han observado bandas de manoproteínas que van de 30 a 200 kDa ⁴⁴, en particular bandas de 33, 49 ⁴¹ y > 60 ⁴⁵ kDa que son obtenidas de la fase levaduriforme, siendo la banda de 33 kDa común a todas las especies del género *Candida* excepto en *C. parapsilosis* ⁴¹. La prueba de Western blot ha sido utilizada en casos clínicos de humanos que cursan con una candidiasis sistémica y se ha logrado la detección de anticuerpos en muestras de sangre, contra manoproteínas de *Candida* con un peso de entre los 47 a 48 kDa ⁴⁶. En animales la prueba de Western blot se ha usado para detectar anticuerpos a partir de suero de leche de vaca, en el diagnóstico de mastitis ocasionada por una alga conocida como *Prototheca zopffi* ³⁵.

1.3.3.1 Características y métodos de obtención de manoproteínas

Como ya se mencionó anteriormente, para el diagnóstico serológico de procesos infecciosos por levaduras del género *Candida* se han estudiado diferentes propiedades y componentes de *Candida*. Los mejor conocidos son los componentes de la pared celular, como los complejos de carbohidratos de manosa (mananas) unidos a

fosfolípidos (fosfolipomananas, con un peso de entre 14-18 kDa) ó unidos covalentemente a proteínas (manoproteínas, con un peso de entre 30-200 kDa) (Figura 1). Se realizó una comparación en los títulos de anticuerpos contra ambos antígenos y se observó que los títulos de anticuerpos en individuos sanos son más altos en contra de fosfolipomananas mientras que, en individuos enfermos aumentan los títulos de anticuerpos contra manoproteínas ⁴⁶, por lo que estas últimas son el principal antígeno utilizado en estudios serológicos.

Aún cuando las manoproteínas están presentes en casi todas las células, existen diferencias importantes entre cada una de ellas. Esto puede observarse en las manoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae*, *C. albicans* y *C. neoformans* (Figura 2) ⁴⁷. Cuando se producen sueros hiperinmunes con manoproteínas de *C. albicans* se ha observado que son más eficientes para estimular la respuesta inmune ^{27,28,48} que las manoproteínas obtenidas de *C. neoformans* ⁴⁹.

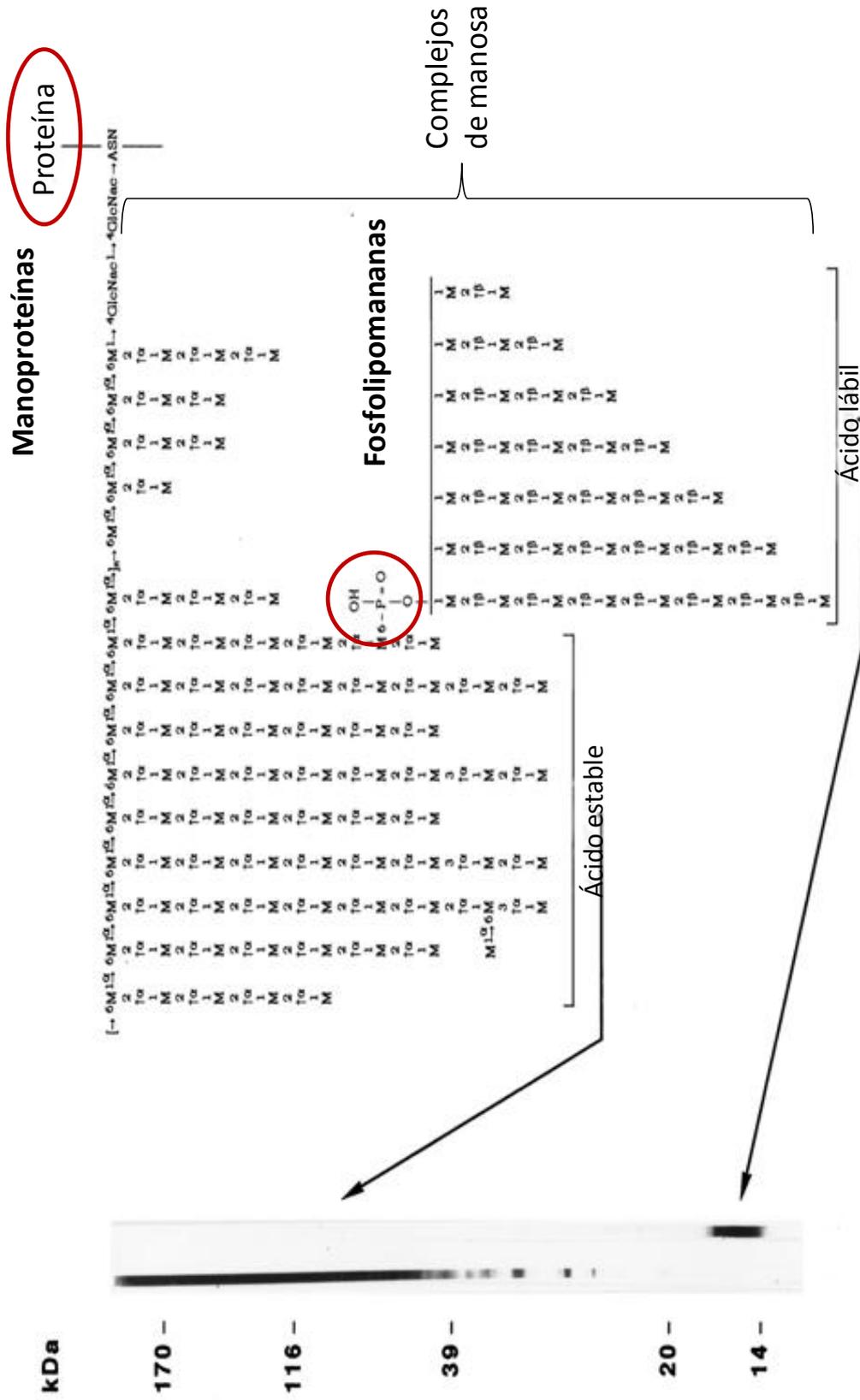


Figura 1. Manoproteínas y fosfolipomananas de la pared de *C. albicans*. Las cadenas de manosa se unen mediante enlaces β a los lípidos de la pared y por enlaces α a las proteínas lo que les confiere un gran tamaño. Modificado de Jouault *et al* 1997.

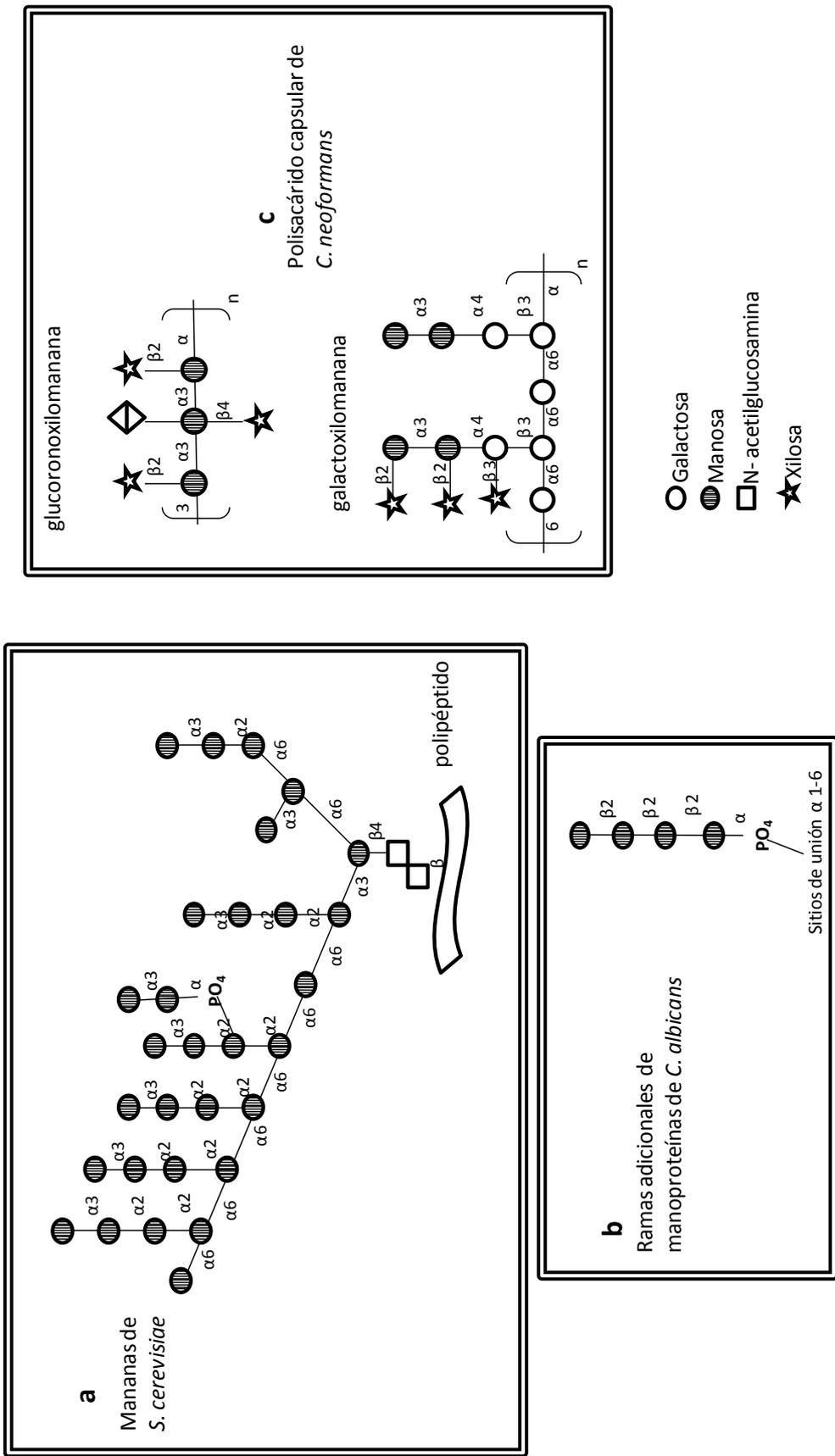


Figura 2. Diferencias en la composición de la pared con respecto de las manoproteínas de *S. cerevisiae* (a), *C. albicans* (b) y *C. neoformans* (c). Modificado de Varki-A et al 2009.

Las manoproteínas son un componente altamente antigénico de la pared de las levaduras del género *Candida* y el estudio sobre su función y estructura se ha realizado en *C. albicans* por considerarse la principal especie involucrada en procesos infecciosos en humanos. Las manoproteínas componen del 20 al 23% del extracto seco de la levadura y se considera que estas proteínas están unidas a más de 150 unidades manosiladas ^{13,46}, son un factor de adhesión importante para *Candida*, además de inducir la producción de citocinas al tener una interacción con TLR4 (receptores tipo Toll) de macrófagos ^{50,51}. Con base en la respuesta con sueros hiperinmunes de conejo inoculados con manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* se determinó que existen los serotipos A y B. Al emplear dichos sueros hiperinmunes contra aislados de diferentes especies de *Candida* recuperados de casos clínicos de candidiasis en humanos, se determinó que especies consideradas patógenas como *C. krusei* y *C. tropicalis* pertenecen al serogrupo A mientras que aquellas consideradas como oportunistas pertenecen al serogrupo B ^{40,42}.

Por otra parte se ha demostrado que es de suma importancia conservar la conformación natural de los dominios antigénicos de las manoproteínas para la fabricación de sueros monoclonales y policlonales ⁵², por lo que se deben considerar las siguientes condiciones para su obtención y purificación:

- 1) **Producción de biomasa.** La conformación de las manoproteínas puede cambiar en condiciones de estrés para la levadura, se sabe que cuando *Candida* está involucrada en un proceso de enfermedad los cambios en las manoproteínas permiten superar a la respuesta inmune. Esta misma capacidad de cambio de las manoproteínas puede controlarse en el cultivo de la levadura, modificando algunos parámetros como temperatura de crecimiento, composición del medio de cultivo y pH ^{34,53}, los cuales están involucrados con la transición de levadura a micelio. Dependiendo de la fase de desarrollo de la levadura se han descrito manoproteínas de diferentes pesos moleculares ^{40,43,44,54}.
- 2) **El método de extracción.** Se han empleado diferentes métodos como la hidrólisis alcalina y la precipitación con solución de Fehling, los cuales pueden modificar la estructura de los carbohidratos. En aquellos estudios donde se ha realizado la extracción de manoproteínas mediante el uso de enzimas, se tiene el inconveniente de degradar las glicoproteínas y como alternativa se han utilizado las extracciones químicas empleando mercaptoetanol, etilendiamida o ditiotreitól que han mostrado que conservan la estructura original de los dominios antigénicos ⁵².

3) **El método de purificación.** Se ha descrito la utilización de la enzima zimolasa que tiene un costo elevado aunque con esta metodología las manoproteínas interactúan con otros componentes de la pared y cambian sus características ⁴⁴. También están los métodos de Cetavlon, las columnas con Con-canavalina A ⁵³ y la electroelución, todos estos permiten seleccionar específicamente a las manoproteínas, sin embargo, el empleo de columnas es costoso y requiere experiencia. El método de electroelución en comparación a los otros métodos mencionados tiene la ventaja de ser de menor costo y fácil realización ^{27, 52, 53}. En el diagnóstico veterinario se desconoce qué antígenos pueden ser útiles para el diseño de una prueba serológica eficiente que permita la diferenciación entre una colonización y una mastitis ocasionada por *Candida*, por lo que en el presente estudio se utilizaron las manoproteínas de *Candida* con la prueba de Western blot para detectar anticuerpos antimananas en el suero de leche de vacas y cabras que permitan diferenciar el estado sanitario.

2. HIPÓTESIS

Mediante la prueba de Western blot se detectaran anticuerpos antimananas de *Candida albicans*, en suero de leche proveniente de vacas y cabras, que permitirán diferenciar entre los estados sanitarios (sanas y con mastitis subclínica y clínica).

3. OBJETIVOS

1. Aislar y caracterizar levaduras a partir de leche de cabras con diferentes estados sanitarios por métodos bioquímicos para conocer la microbiota micótica en este tipo de muestras.
2. Obtener manoproteínas de *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 2001 y *C. krusei* ATCC 6258 por extracción química con β -mercaptoetanol.
3. Purificar manoproteínas de *C. albicans* por el método de electroelución para su uso en la prueba de Western blot.
4. Detectar anticuerpos contra manoproteínas de *C. albicans* ATCC 10231 en suero de leche de vacas y cabras sanas y con mastitis, mediante la prueba de Western blot para diferenciar estados sanitarios.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Aislamiento y caracterización de levaduras

4.1.1 Colección de muestras de leche de cabra y vaca

Se colectaron 611 muestras de leche de cabra a partir de 60 animales, dichas muestras fueron tomadas a los 15, 60, 105 y 150 días de lactación, además de dos calostros provenientes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) y la “Granja del Carmen”, ambas en Tequisquiapan, Querétaro. Otras 13 muestras de leche de cabra fueron proporcionadas por el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), 12 de ellas provienen de 11 animales con mastitis subclínica y una muestra de una cabra con mastitis clínica.

El laboratorio de Micología de la FMVZ proporcionó 266 leches de 266 vacas provenientes de un estudio previo⁴, de las cuales 78 eran de vacas sanas, 45 con mastitis subclínica y 143 con mastitis clínica (Cuadro 3).

Cuadro 3. Muestras de leche colectadas.

Especie	Sanas	Subclínicas	Clínicas	Total
Vacas	78	45	143	266*
Cabras	596	12	3	611
Total	674	57	146	877

*muestras proporcionadas por el laboratorio de Micología.

En ambos tipos de muestras, el estado sanitario se determinó con la prueba de California y el examen clínico y el muestreo se llevó a cabo previo al ordeño, despuntando, lavando los pezones con agua clorada, desinfectando con yodo al 3% y un posterior secado. Se colectaron 15 ml de leche en recipientes herméticos y estériles y se enviaron en refrigeración al laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), donde se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento⁴.

4.1.2 Aislamiento de levaduras de leche de cabra

Las muestras de leche se descongelaron a 4° C toda la noche y posteriormente se incubaron a 37°C/15 min, transcurrido ese tiempo se inocularon 500 µl en caldo Sabouraud pH 3.5 y se incubó a 37°C/10 días. Al final de la incubación se tomaron 50 µl del medio y se sembró en placas de agar dextrosa Sabouraud adicionado con

cloranfenicol, incubándose a 37° C /72 h. El crecimiento de colonias de levaduras fue confirmado mediante la tinción de Gram.

4.1.3 Identificación tradicional de levaduras

La caracterización mediante metodología tradicional, incluyó: a) morfología macroscópica, b) estructuras de reproducción asexual (blastoconidias, clamidoconidias), c) asimilación y fermentación de carbohidratos (glucosa, sacarosa, lactosa y maltosa, trehalosa, galactosa, xilosa, celobiosa, rafinosa), d) producción de ureasa, e) sensibilidad a ciclohexamida y f) producción de película en caldo Sabouraud^{1,4,16}. El aislamiento e identificación de levaduras de la leche de vaca fueron realizados en un estudio previo⁴.

4.2 Obtención del suero de leche para su empleo en la prueba de Western blot

La extracción del suero de leche se realizó tomando 1 ml de la leche y centrifugando a 1900 x g por 10 min. La fracción clarificada (suero) se conservó a -20°C para su uso posterior en el Western blot¹³.

4.3 Obtención de manoproteínas

4.3.1 Producción de biomasa

El laboratorio de Micología de la FMVZ de la UNAM, proporcionó cepas de referencia de *Candida albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 2001 y *C. krusei* ATCC 6258 que se inocularon a una concentración de 10⁵ células/ ml en 10 litros de caldo dextrosa Sabouraud e incubándose a 25°C por 48 h en agitación constante. Al término de la incubación, se centrifugó y la pastilla se lavó dos veces con agua destilada^{40,53,55}.

4.3.2 Rompimiento mecánico y obtención del extracto crudo de pared celular

Por cada gramo de células se adicionaron 2.5 ml de regulador de lisis (solución reguladora de fosfatos 0.2M, metilsulfonilfluorido 0.001M, β-mercapto-etanol 0.001M) y 7 g de perlas de vidrio (425-600 micrones, SIGMA). Esta suspensión se sometió a 20 ciclos de un minuto en homogeneizador, alternando con un minuto en hielo⁵⁶.

La solución se centrifugó a 10 000 x g/20 min para eliminar las células intactas, se recuperó el sobrenadante y este fue centrifugado a 25 000 x g/30 min para retirar los restos celulares, colectándose nuevamente el sobrenadante, el cual se almacenó a -20°C⁵³.

4.3.3 Determinación de proteínas por el método de Bradford

La curva tipo se realizó en microplaca, para la que fueron preparadas soluciones de 0.5 a 10 mg de albúmina, de estas soluciones, así como de las muestras se tomaron

5 µl de cada una y se adicionaron 5 µl de regulador de Tris-acetato y 200 µl de reactivo de Bradford. Se incubó por 5 min y se realizó la lectura a una absorbancia de 595 nm, en un lector de ELISA (Biotek Instruments EL-800, USA) ⁵⁷.

4.3.4 Identificación de manoproteínas. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) 5%

El extracto crudo de pared celular de cada una de las cepas de referencia se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 5%, en cámara Mini-protean III Cell (BioRad), a una concentración de 20 µg/ml de proteína, con el fin de revisar el perfil electroforético del extracto y buscar la presencia de las bandas ya reportadas como manoproteínas de *C. albicans* ^{41,53,55}. El extracto crudo se solubilizó en una solución reguladora de corrida 2X (Tris- HCl pH 6.8, SDS 10%, glicerol, azul de bromofenol 0.2%, 2-mercaptoetanol 10%) a 100°C/5 min. Las condiciones de la electroforesis fueron para geles de 0.75 mm, 10 mA/ 50 volts/ 1.5 h/ 4°C. El gel se tiñó durante dos horas con azul de Coomassie y luego se decoloró con una solución de metanol, agua destilada y ácido acético glacial (5:5:1) ^{43,56,58}.

4.3.5 Purificación de manoproteínas de *C. albicans* por el método de electroelución

Las manoproteínas son consideradas un antígeno común entre especies del género *Candida* y han sido estudiadas primordialmente en *C. albicans*, por esta razón es que se purificaron las manoproteínas extraídas de la cepa de referencia de esta especie. Con relación a los métodos de purificación de las manoproteínas se utilizó la electroelución, por ser un método de bajo costo y sencillo de realizar.

Para la electroelución se utilizaron geles preparativos (1.5 mm de espesor) SDS-PAGE 5%, las condiciones de la electroforesis del extracto crudo de la pared de *C. albicans* ATCC 10231 fueron 15 mA/ 60 volts/1 h 40 min/4°C ⁵⁶. Posteriormente el gel se sumergió en una solución de cloruro de potasio 20 mM por 20 minutos, para visualizar las bandas de las manoproteínas y con base en el marcador de peso molecular se cortaron las bandas con un peso molecular de entre 49 a 62 kDa. Estas bandas se sometieron a electroelución en una cámara Mini-protean III Cell a 10mA/ 200 V/ 2.5 h por cada tubo de electroelución empleado ⁵⁸. Al producto de electroelución se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Para verificar la presencia de las bandas puras de manoproteínas, el producto de electroelución fue sometido a electroforesis en un gel de SDS-PAGE 5%, tomando 20 µg/ml de proteína y tiñendo el gel como se describió con anterioridad.

4.4 Western blot

4.4.1 Inmunotransferencia de los extractos crudos de pared celular

Se empleó la prueba de Western blot para identificar manoproteínas en los extractos crudos de pared celular de las cepas de referencia (*C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 2001 y *C. krusei* ATCC 6258). Estos extractos fueron sometidos a electroforesis SDS-PAGE 5% utilizando geles preparativos de 0.75 mm y una concentración de proteína de 150 µg/ml, la inmunotransferencia se realizó en membranas de nitrocelulosa (HYBOND ELC) en regulador Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% pH 8.3, a 0.01 A/ 100 V/ 1 h. Al finalizar la transferencia, la membrana se colocó en un recipiente con solución de rojo de Ponceau para detectar si las proteínas se transfirieron con éxito y los sitios no ocupados se bloquearon con leche descremada al 3 % (Difco) a 4°C toda la noche. Se lavó tres veces con PBS (NaCl 0.9% y Tris 10 mM, pH 7.4) y Tween 20 al 0.1%, cada lavado fue de 5 min ⁴³. Las membranas se cortaron en tiras de 3 mm y se conservaron a -20°C hasta su uso ⁵⁸.

Para la inmunoreacción, la membrana de nitrocelulosa se incubó a 37°C/ 2 h con siete sueros de leche de vaca, de las que se obtuvieron aislados de diferentes especies de *Candida* (Cuadro 4), y el suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*, todos diluidos a 1/200 en solución salina de fosfatos (PBS) y leche descremada al 3%. Después se lavó tres veces con PBS y Tween 20. Posteriormente se incubaron a 25°C/1 h con una dilución 1/1000 de anti IgG conjugado con peroxidasa de bovino y conejo (Jackson) respectivamente. Las tiras se lavaron y se adicionó la solución reveladora de ortofenilendiamina (Sigma-Aldrich) al 0.04% hasta la aparición de las bandas, con un último lavado con agua destilada y dejando secar a temperatura ambiente ^{43,55,58}.

Cuadro 4. Sueros de leche de vaca utilizadas en la prueba de Western blot con los extractos crudos de pared de las cepas de referencia.

Candida aislada	Estado sanitario		
	Sana	Subclínica	Clínica
<i>C. albicans</i>	----	1	1
<i>C. glabrata</i>	1	1	----
<i>C. krusei</i>	1	1	1
Total	2	3	2

4.4.2 Inmunotransferencia del producto de electroelución

Una concentración de 150 µg/ml de proteína del producto de electroelución fue transferido a membranas de nitrocelulosa, siguiendo el protocolo descrito para inmunotransferencia.

Con la intención de conocer la dilución óptima que permitiera diferenciar entre los estados sanitarios, se realizó la inmunotransferencia con las manoproteínas purificadas, utilizando diluciones de 1/100 hasta 1/1600 ⁵⁸ de los sueros de leche de vacas, se decidió considerar dos muestras de leche de mastitis clínica, dos con mastitis subclínica y dos de vacas sanas, en todos los casos con aislamiento de levaduras. De las muestras de leche de cabras se utilizaron diluciones de 1/50 hasta 1/200 de dos muestras con mastitis subclínica (una con aislamiento de levaduras) y dos de cabras sanas (una con aislamiento de levaduras).

Una vez conocida la dilución óptima para cada tipo de muestra, se realizó el Western blot a todos los sueros de leche de vaca (78 sanas, 45 con mastitis subclínica y 143 con clínica)(Cuadro 3). De los sueros de leche de cabra sanas se decidió emplear las muestras obtenidas durante el período de lactación de animales en los que se obtuvo el aislamiento de levadura y como control las muestras de un animal en las mismas condiciones de producción, así mismo, se emplearon todas las muestras de animales con mastitis (12 con mastitis subclínica y 3 con clínica) (Cuadro 3).

4.5 Análisis estadístico

La prueba de Western blot, se validó calculando la sensibilidad y la especificidad mediante el teorema de Bayes, además, se realizó un análisis de contingencia para conocer las tendencias de las muestras agrupadas por los diferentes estados sanitarios ⁵⁹.

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento e identificación de levaduras

A partir de las muestras de leche de cabra se obtuvieron 6 aislados (6/596) de animales sanos y 1 aislado (1/12) de cabras con mastitis subclínica. El porcentaje de aislados de levaduras a partir de las muestras de leche de cabra fue del 1% (6/596) en cabras sanas, 8.33% (1/12) en mastitis subclínicas y ningún aislado de mastitis clínica (0/3) (Cuadro 5 a).

Cuadro 5 a. Aislados obtenidos de leche de cabra.

Especie de <i>Candida</i>	Estado sanitario			Total de aislados
	SANAS	SUBCLÍNICAS	CLÍNICAS	
<i>C. parapsilosis</i>	4	0	0	4
<i>C. albicans</i>	1	0	0	1
<i>C. lipolytica</i>	1	1	0	2
Total de aislados	6	1	0	7

De las muestras de leche de vaca proporcionadas por el laboratorio de Micología, en un estudio previo se obtuvieron 48 aislados de leche de vacas sanas (48/78), 15 de vacas con mastitis subclínica (15/45) y 113 de vacas con mastitis clínica (113/143) (Cuadro 5 b). El mayor número de aislados de leche de vacas sanas corresponde a *C. glabrata* (62.5%), seguido de *C. krusei* (10.4%) y *Candida* spp. (10.4 %) y en vacas con mastitis clínica corresponde a *C. krusei* (40.7%), seguido de *Candida* spp (30 %), *C. glabrata* (10.6 %) y *C. clausenii* (8.8 %).

Cuadro 5b. Aislados obtenidos de leche de vaca en un estudio previo.

Especie de <i>Candida</i>	Estado sanitario			Total de Aislados
	SANAS	SUBCLÍNICAS	CLÍNICAS	
<i>C. krusei</i>	5	1	46	52
<i>C. glabrata</i>	30	0	12	42
<i>C. intermedia</i>	1	0	1	2
<i>C. albicans</i>	0	1	3	4
<i>C. clausenii</i>	0	0	10	10
<i>C. kefyr</i>	1	0	2	3
<i>C. norvergica</i>	1	0	0	1
<i>C. slooffii</i>	1	1	0	2
<i>C. viswanathii</i>	1	0	0	1
<i>C. zeylanoides</i>	2	1	0	3
<i>C. cantarelli</i>	0	1	0	1
<i>C. incomunis</i>	0	1	0	1
<i>C. macedoniensis</i>	1	0	0	1
<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	5	9	34	48
Total de aislados	48	15	113	176

5.2 Obtención del extracto crudo de pared y determinación de proteínas

A partir de los 10 L de caldo dextrosa Sabouraud, se obtuvieron 160 g de biomasa de cada una de las cepas de referencia. De esta biomasa se obtuvieron 100 ml de extracto crudo de pared de cada una de las cepas de referencia con una concentración de proteínas de 119 mg/ ml de *C. albicans* ATCC10231, 93.8 mg/ml de *C. glabrata* ATCC 2001 y 77 mg/ml de *C. krusei* ATCC 6258 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Determinación de proteínas por el método de Bradford del extracto crudo de pared de las cepas de referencia.

Cepa de referencia	Concentración de proteínas mg/ml
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	119
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	93.8
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	77

5.3. Detección de manoproteínas en el extracto crudo. Gel de SDS-PAGE al 5%

En el perfil electroforético del extracto crudo de pared celular de cada una de las cepas de referencia (Figura 3) se observaron bandas de proteínas entre 38 y 70 kDa que están reportadas como manoproteínas.

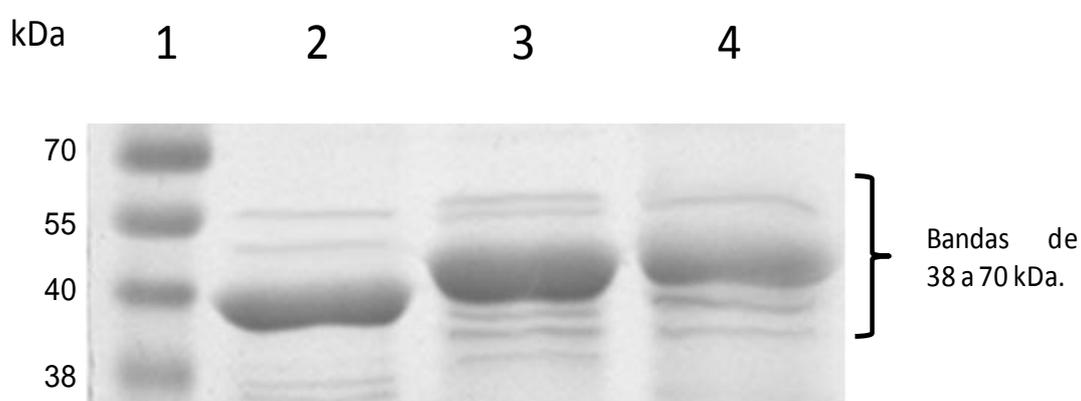


Figura 3. Perfil electroforético de los extractos crudos de pared, teñido con azul de Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular de 170 kDa, carril 2: *C. albicans* ATCC 10231, carril 3: *C. krusei* ATCC 6258 y carril 4: *C. glabrata* ATCC 2001.

5.4 Purificación de manoproteínas por el método de electroelución

Del extracto crudo de pared celular de *C. albicans* ATCC 10231 se eluyeron las bandas de 49.7, 53.22 y 62 kDa, obteniéndose una solución con una concentración de 577 µg/ml. Se emplearon 20 µg/ml de proteína del producto de electroelución para visualizarlo en un gel SDS-PAGE 5% y poder compararlo con el extracto crudo de pared (Figura 4).

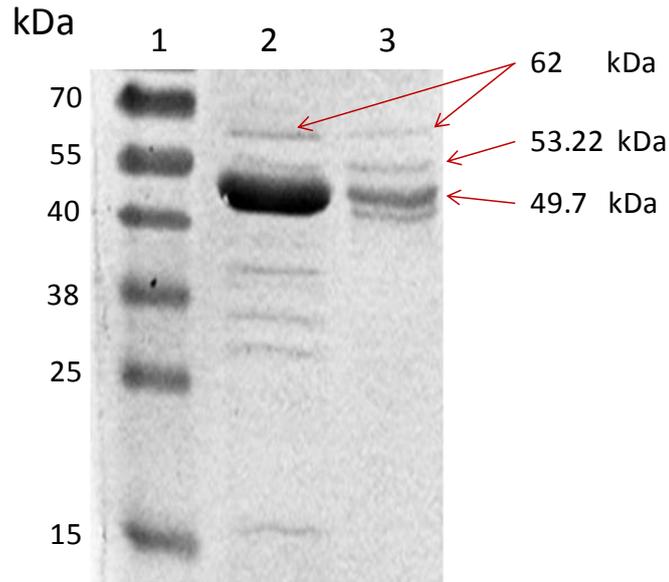


Figura 4. Manoproteínas purificadas por electroelución, teñido con azul de Coomasie.
 Carril 1: marcador de peso molecular de 170 kDa,
 Carril: 2 extracto crudo de pared de *C. albicans* y
 Carril 3: producto de electroelución .

5.5 Western blot

5.5.1 Inmunotransferencia de los extractos crudos de pared celular

Todas las muestras de leche de vaca, independientemente de la especie de *Candida* aislada, fueron reactivas a las manoproteínas entre los 38 y 70 kDa de *C. albicans*, el mismo grupo de bandas fue observado en la inmunotransferencia del extracto crudo de *C. glabrata* y el de *C. krusei* (Figura 5).

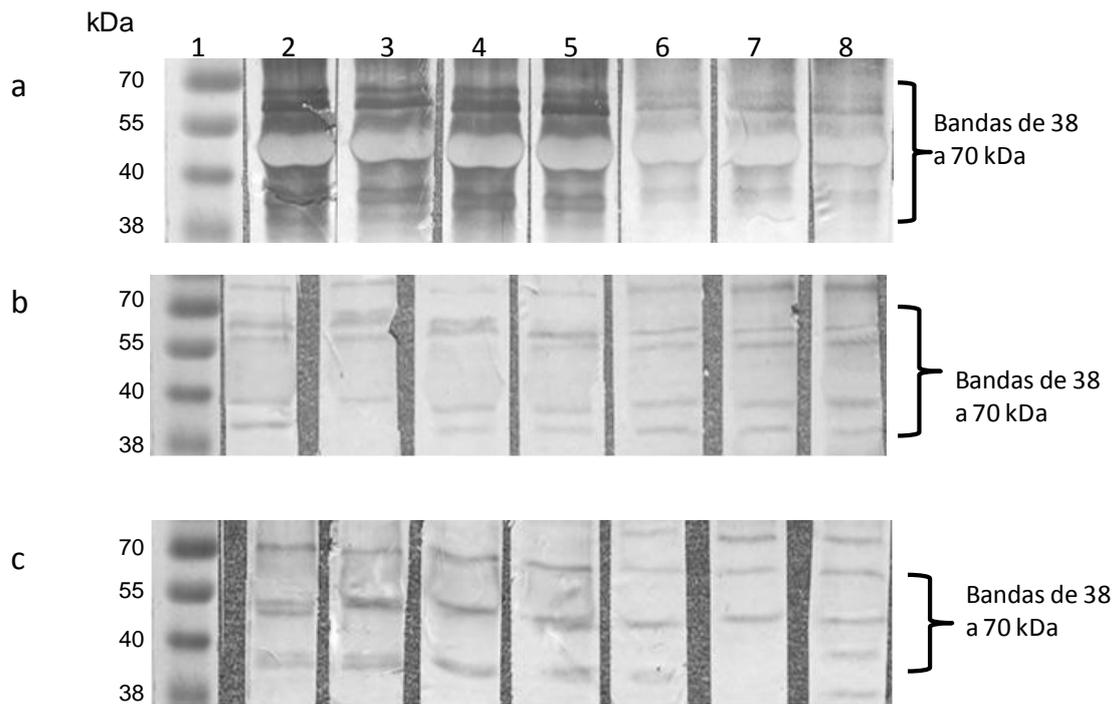


Figura 5. Western blot con extracto crudo de pared celular de especies de *Candida*. (a)*C. albicans*, (b)*C. glabrata*, (c)*C. krusei*. Carril 1: marcador peso molecular de 170 kDa. Carriles 2 y 3: sueros de leche de vacas con aislados de *C. albicans*. Carriles 4 y 5: sueros de leche de vacas con aislados de *C. glabrata*. Carriles 6, 7 y 8: sueros de leche de vacas con aislados de *C. krusei*.

5.5.2 Inmunotransferencia del producto de electroelución

Al emplear 150 µg/ml del producto de electroelución, se determinó que la dilución óptima del suero de leche de vaca que permitió diferenciar los estados sanitarios es de 1/800 (Figura 6) y en el caso de las leches de cabra fue de 1/50 (Figura 7).

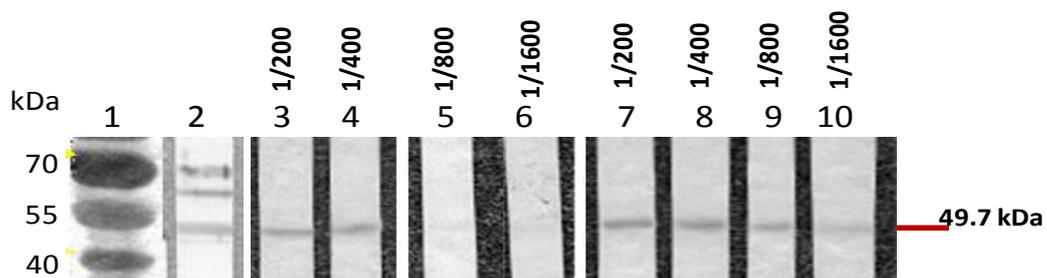


Figura 6. Western blot de diluciones de suero de leche de vaca. Carril 1: marcador de peso molecular 170 kDa. Carril 2: suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*. Carriles 3-6: diluciones del suero de leche de vaca sana. Carriles 7-10: diluciones del suero de leche de vaca con mastitis.

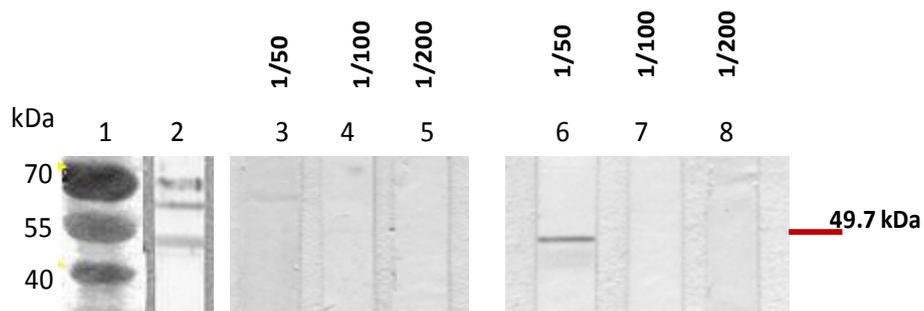


Figura 7. Western blot de diluciones de sueros de leche de cabra. Carril 1: marcador de peso molecular de 170 kDa. Carril 2: suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*. Carriles 3-5: Diluciones del suero de leche de cabra sana. Carriles 6-8: Diluciones del suero de leche de cabra con mastitis .

Se realizó el Western blot con los sueros de leche de vaca clasificadas por el estado sanitario, incluyendo si fue posible o no el aislamiento de levaduras. (Cuadro 7).

Cuadro 7. Western blot con sueros de leche de vaca, con y sin aislamiento de levaduras.

Estado sanitario	Con aislamiento	Sin aislamiento	Total
Sanas	48	30	78
Subclínicas	15	30	45
Clínicas	113	30	143
Total	176	90	266

En las muestras de vacas sanas, sin aislamiento de levaduras pudo detectarse la banda de 49.7 kDa (30/30) (Figura 8). Mientras que, 48 de las muestras de vacas sanas con aislados de levaduras se detectó la banda de 49.7 kDa (48/48) y sólo en tres de ellas (3/48) fue posible observar las bandas de 53.2 y 62 kDa (Figura 9).

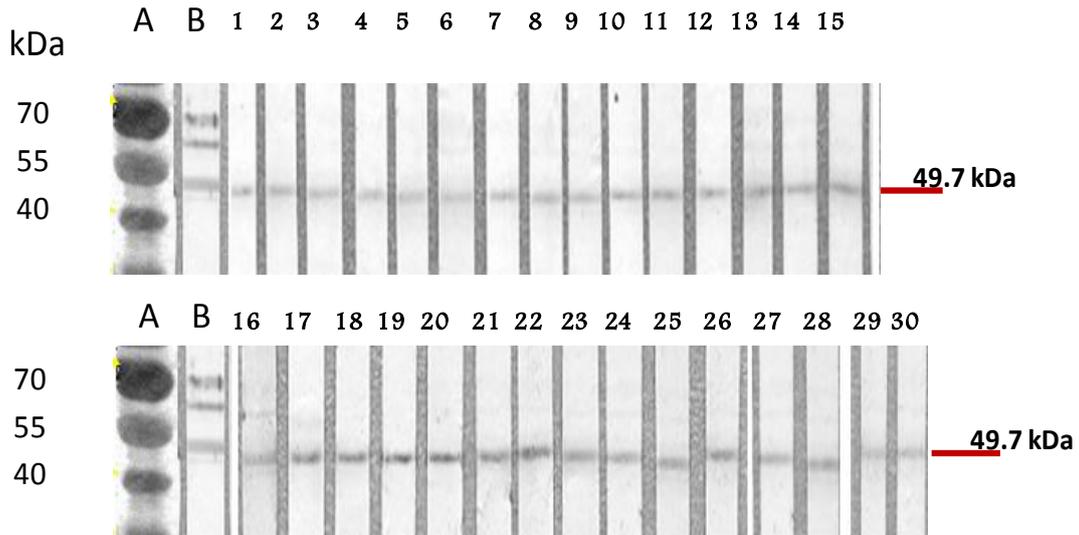


Figura 8. Western blot de sueros de leche de vacas sanas sin aislamiento de levaduras. Carril A: marcador de peso molecular de 170 kDa, carril B: control positivo de suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*, carriles 1-30: sueros de leche.

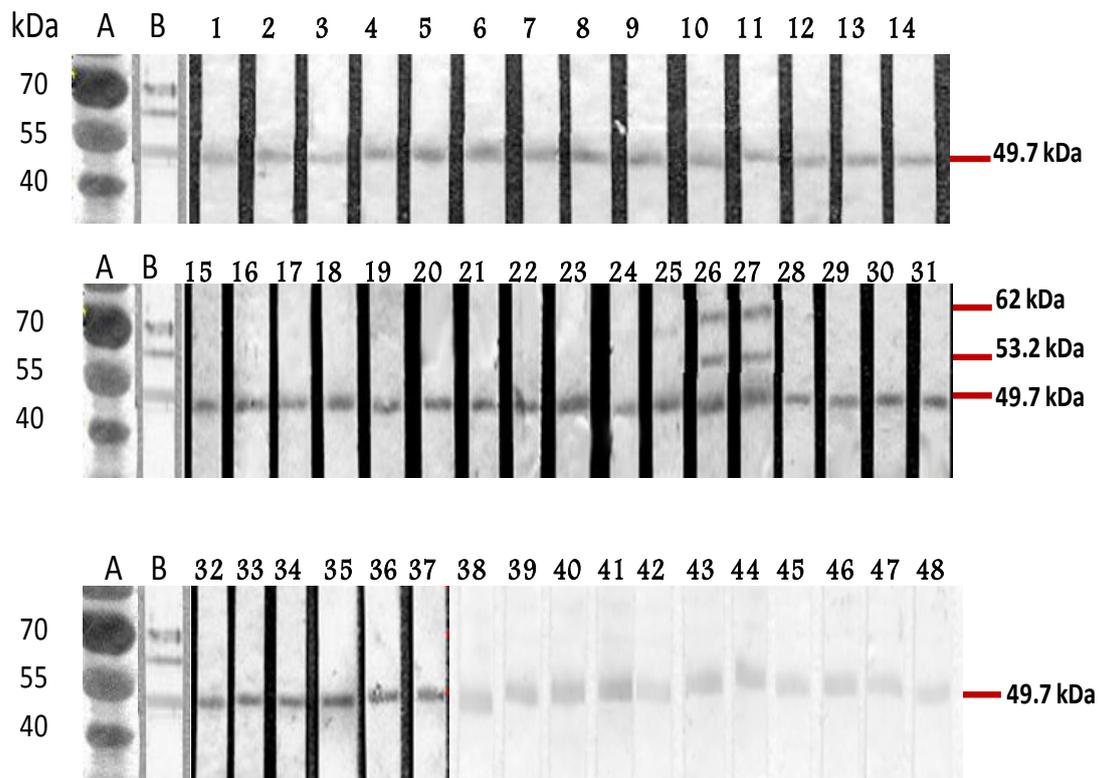


Figura 9. Western blot de sueros de leche de vacas sanas con aislamiento de levaduras. Carril A: marcador de peso molecular de 170 kDa, carril B: control positivo de suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*. Carriles 1-48 sueros de leche. Carriles 25-27 se detectaron las tres bandas de interés.

En las muestras de vacas con mastitis subclínica sin aislamiento de levaduras, se detectó en todas ellas la banda de 49.7 kDa y en tres de ellas (3/30) las bandas de 53.2 y 62 kDa (Figura 10). En las muestras en las que se obtuvieron aislados de levaduras se detectó en 10 de ellas la banda de 49.7 kDa (10/15) y en las 15 muestras las bandas de 53.2 y 62 kDa (Figura 11).

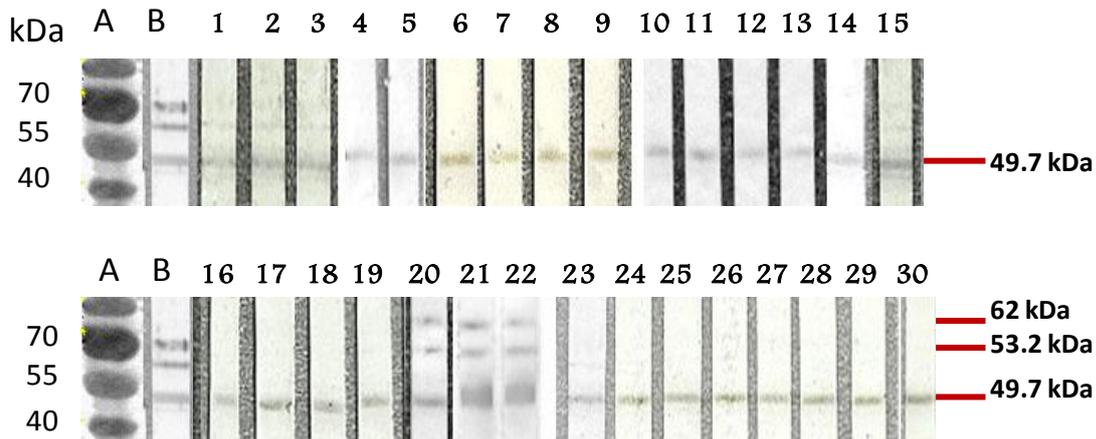


Figura 10. Western blot de sueros de leche de vacas con mastitis subclínica sin aislamiento de levaduras. Carril A: marcador de peso molecular, carril B: control positivo de suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*, carriles 1-30: sueros de leche. Carriles 20-22 se detectaron las tres bandas de interés.

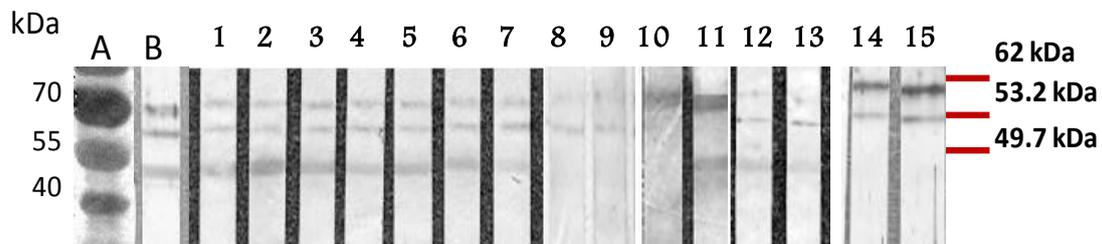


Figura 11. Western blot de sueros de leche de vacas con mastitis subclínica con aislamiento de levaduras. Carril A: marcador de peso molecular, carril B: control positivo de suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*, carriles 1-15: sueros de leche. Carriles 1-7 y 11-13 se detectó la banda de 49.7 kDa.

En las muestras de vacas con mastitis clínica sin aislamiento de levaduras, se detectó la banda de 49.7 kDa y sólo en una muestra (1/30) se observaron las bandas de 53.2 y 62 kDa (Figura 12).

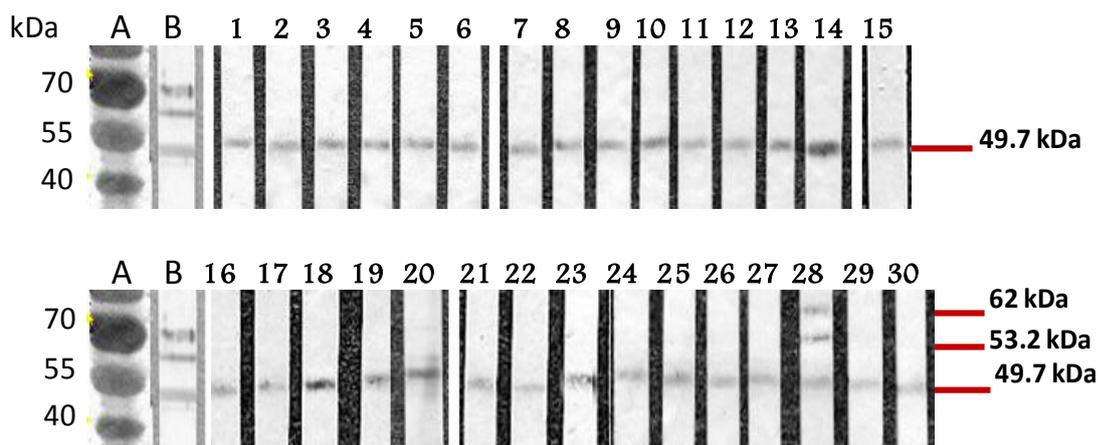


Figura 12. Western blot de sueros de leche de vacas con mastitis clínica sin aislamiento de levaduras. Carril A: marcador de peso molecular, carril B: control positivo de suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*, carriles 1-30: sueros de leche. Carril 28 se detectaron las tres bandas de interés.

Con el fin de clasificar los diferentes resultados obtenidos en las muestras de vacas con mastitis clínica y con aislamiento de levadura, se formaron seis patrones con base en la detección de bandas de manoproteínas. El patrón **uno** corresponde a las muestras en las que se detectó la presencia de la banda de manoproteínas de 49.7 kDa, en el patrón **dos** se detectó la banda de 62 kDa, en el patrón **tres** se detectaron las bandas de 49.7 y 53.2 kDa, en el patrón **cuatro** se detectaron las bandas de 49.7 y 62 kDa, en el patrón **cinco** se detectaron las bandas de 53.2 y 62 kDa, en el patrón **seis** se detectaron las bandas de 49.7, 53.2 y 62 kDa, además de aquellas muestras en las que no se observó ninguna banda (Cuadro 8) (Figura 13).

Cuadro 8. Bandas de manoproteínas detectadas en sueros de leche de vacas con mastitis clínica y con aislado de levaduras.

# Patrón	Bandas detectadas (kDa)	Muestras
1	49.7	35/113
2	62	1/113
3	49.7 y 53.2	11/113
4	49.7 y 62	1/113
5	53.2 y 62	3/113
6	49.7, 53.2 y 62	54/113
Sin patrón	—————	8/113
Total de muestras	—————	113

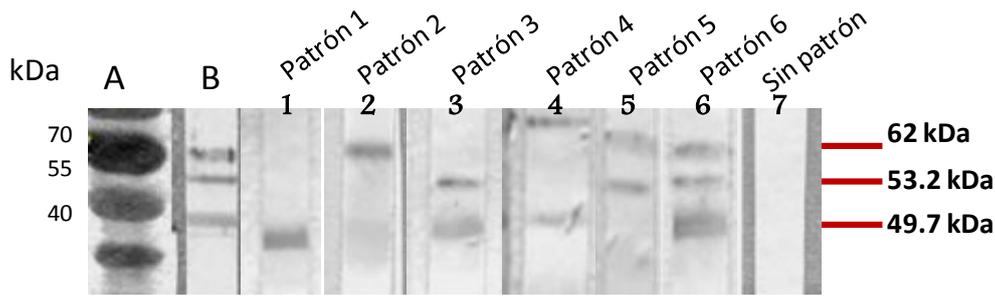


Figura 13. Western blot de sueros de leche de vacas con mastitis clínica con aislamiento de levaduras. Carril A: marcador de peso molecular de 170 kDa, carril B: control positivo de suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*. Carriles 1-7: sueros.

Las muestras de leche de cabra fueron agrupadas con base en el estado sanitario, por individuo y resultado del aislamiento (Cuadro 9).

Cuadro 9. Muestras de leche de cabra empleadas en el Western blot.

Estado sanitario	Sistema de producción	Identificación del animal	Día de lactación en que se colectó la muestra					Total de muestras
			Calostro	15	60	105	150	
Sanas (S)	CEIEPAA mixto	1 S	0	2	2	2	0	6
		2 S	2★★	2	2	2	2	10
		3 S	0	2★	2	2	0	6
	CEIEPAA estabulado	4 S	0	2	2	2	2★	8
		5 S	0	2	2	2	0	6
		6 S	0	2	2	2	1★	7
		7 S	0	2	2	2	2★	8
Subclínicas (SC)	INIFAP Estabulado	1 SC	Sin dato					1
		2 SC						1
		3 SC						1
		4 SC						1
		5 SC						1
		6 SC						1
		7 SC						1
		8 SC						1
		9 SC						2
		10 SC						1
		11 SC						1★
Clínicas (C)	CEIEPAA estabulado	1 C	Sin dato					2
	INIFAP estabulado	2 C						1
Total								66

★ Un aislado de levadura

★★ Dos aislados de levaduras

Puede observarse que, en las muestras de cabras sanas en las que no se obtuvieron aislados de levadura, no se detectaron las bandas a excepción del día 15 de la lactación (Figura 14). Mientras que en las muestras de cabras sanas de las que se obtuvieron aislados de levaduras se detectaron las bandas de 49.7, 53.2 y 62 kDa durante todo el período de la lactación de la cabra. (Figura 15, 16 y 17).

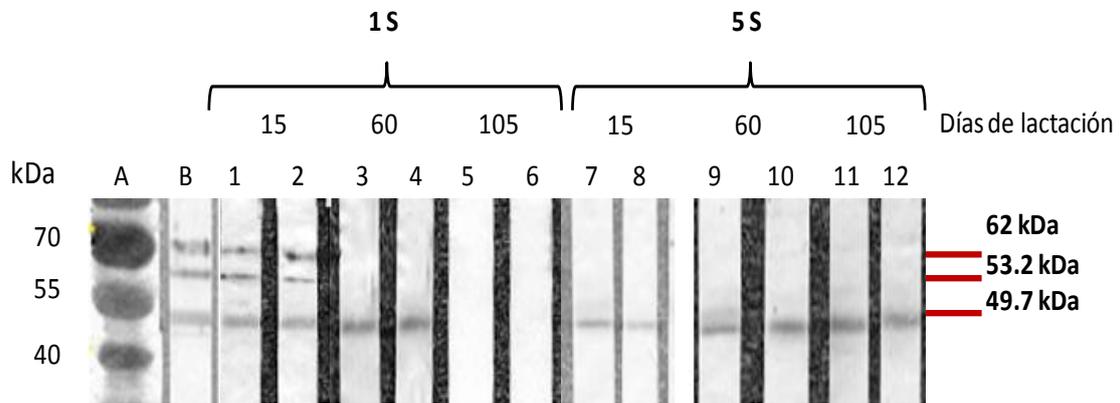


Figura 14. Western blot de sueros de leche de cabras sanas sin aislamiento de levaduras 1 S y 5 S. Carril A: marcador de peso molecular de 170 kDa, carril B: control positivo de suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*, carriles 1-12: sueros de leche.

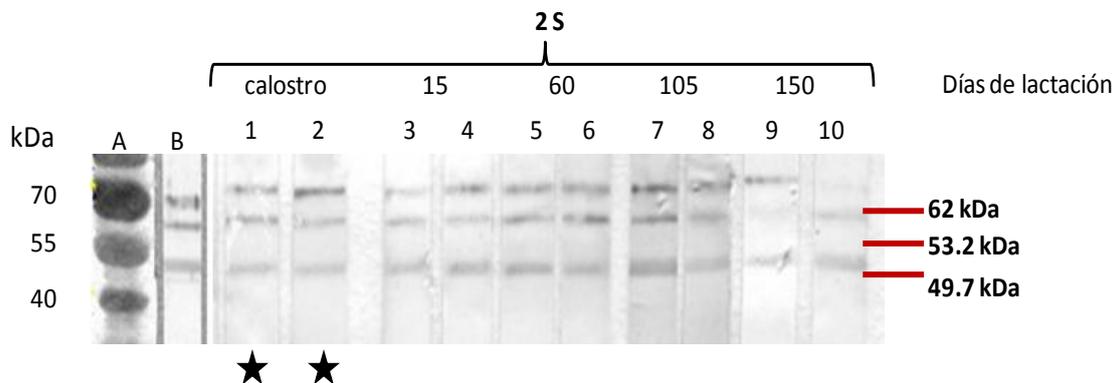


Figura 15. Western blot de sueros de leche de cabra sana 2 S con aislamiento de levadura. Carril A: marcador de peso molecular de 170 kDa, carril B: control positivo de suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*, carriles 1-10: sueros de leche. ★ a partir de esta muestra se obtuvo el aislado de levadura.

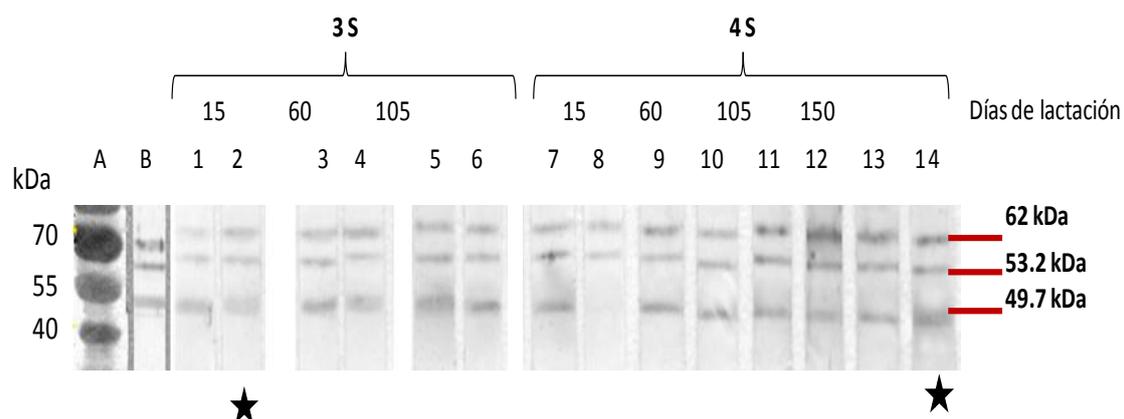


Figura 16. Western blot de sueros de leche de cabras sanas con aislamiento de levaduras 3S y 4S. Carril A: marcador de peso molecular de 170 kDa, carril B: control positivo de suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*, carriles 1-14: sueros de leche. ★ a partir de esa muestra se obtuvo el aislado de levadura.

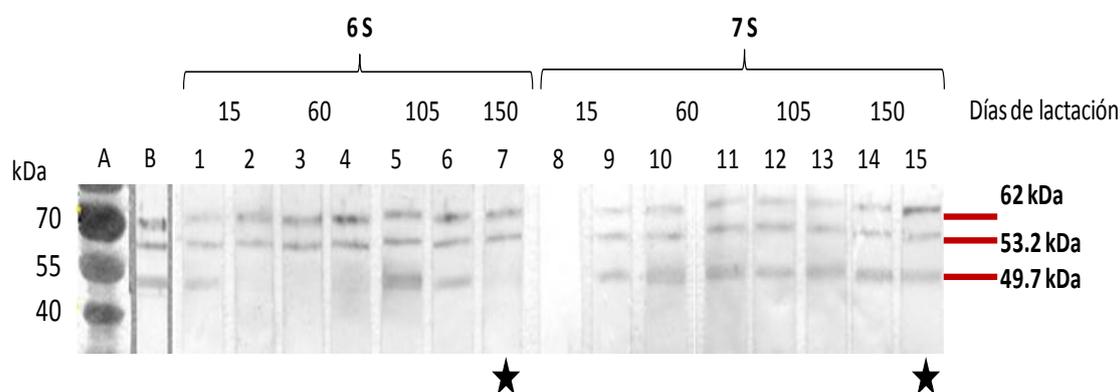


Figura 17. Western blot de sueros de leche de cabras sanas 6S y 7S con aislamiento de levaduras. Carril A: marcador de peso molecular de 170 kDa, carril B: control positivo de suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*, carriles 1-15: sueros de leche. ★ a partir de esta muestra se obtuvo el aislado de levadura.

Así mismo se tiene que, en las muestras de cabras con mastitis subclínica fue posible detectar en 12 muestras la banda de 49.7 kDa (12/12). En la muestra que tuvo aislamiento de levadura y en 4 negativas al aislamiento de levaduras se observaron las bandas de 53.2 kDa y 62 kDa (5/12) (Figura 18).

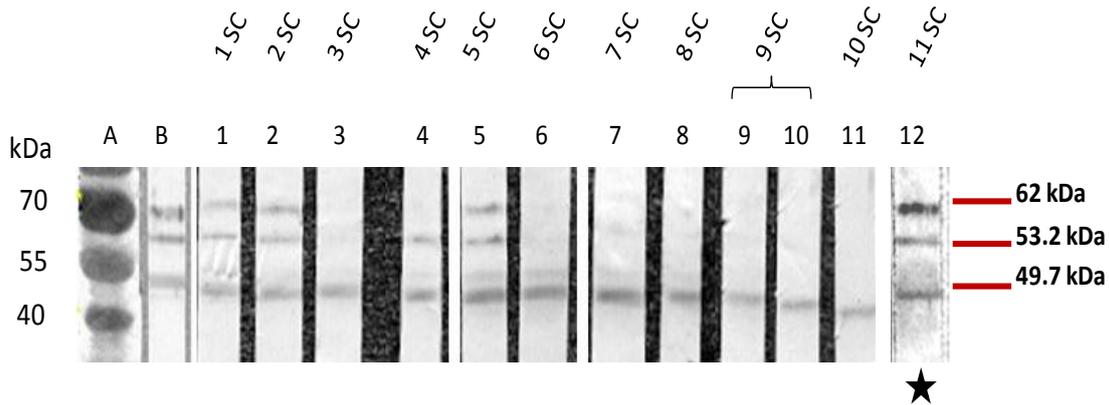


Figura 18. Western blot de sueros de leche de cabras con mastitis subclínica. Carril A: marcador de peso molecular de 170 kDa, carril B: control positivo de suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*, carriles 1-12: sueros de leche. ★ a partir de esta muestra se obtuvo el aislado de levadura. Carriles 1,2,4,5,12 se detectaron las tres bandas de interés. Carriles 9 y 10= muestras de 9 SC.

Finalmente, en las cabras con mastitis clínica aún cuando no se obtuvieron aislados de levaduras, en dos muestras (2/3) fue posible detectar las bandas de 53.2 y 62 kDa, cabe resaltar que pertenecen al mismo individuo (Figura 19).

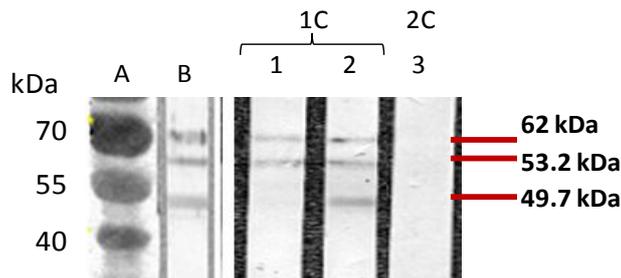


Figura 19. Western blot de sueros de leche de cabras con mastitis clínica. Carril A: marcador de peso molecular, carril B: control positivo de suero hiperinmune de conejo contra *C. albicans*, carriles 1-3: sueros de leche. Carriles 1 y 2= muestras de 1C.

5.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de la prueba de Western blot fue posible solo en el caso de los resultados obtenidos de los sueros de leches de vacas, ya que en este caso se cumplió con el número de muestras suficientes para realizar el análisis, lo que no ocurrió en el caso de las muestras de suero de leche de cabra.

5.6.1 Análisis por el teorema de Bayes

Para obtener la especificidad y sensibilidad del Western blot se empleó el teorema de Bayes. El análisis se realizó considerando como resultados verdaderos positivos de la prueba los sueros obtenidos de 128 leches de vacas con mastitis subclínica y clínica

con aislamiento de levaduras y que cumplieran con alguna de las siguientes condiciones:

- 1) Muestras de suero de leche en las que se detectaron dos bandas de manoproteínas: 53.2 y 62 kDa.
- 2) Muestras de suero de leche en las que se detectó solo una banda de manoproteínas: a) 53.2 b) 62 kDa.
- 3) Muestras de suero de leche en las que se detectaron una de dos bandas de manoproteínas: a) 53.2 ó 62 kDa. (Cuadro 10).

Como resultado negativo, en todos los casos (1, 2 y 3), se emplearon 30 muestras de cada estado sanitario sin aislamiento de levaduras (Cuadro 10).

La banda de 49.7 kDa fue detectada por todas las muestras y no fue útil en la evaluación de la prueba.

El mejor resultado se obtuvo de la condición al detectar la banda de 53.2 kDa con una sensibilidad del 85.9% y una especificidad del 91.7%, con un valor predictivo positivo de 94% y un valor predictivo negativo del 81.3%, seguido de los resultados obtenidos de las combinaciones de las bandas de 53.2 y 62 kDa en ambas condiciones (1 y 3) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Resultados del análisis del Western blot por el teorema de Bayes.

Peso de la banda (kDa)	Condición			
	1	2		3
	53.2 y 62	<u>53.2</u>	62	53.2 ó 62
Sensibilidad de diagnóstico	72.1%	85.9%	35.2%	56.9%
Especificidad	97.5%	91.7%	97.6%	92.2%
Eficiencia global	86.5%	88.3%	60.1%	68.1%
Valor predictivo positivo	95.7%	94.0%	95.7%	94.1%
Valor predictivo negativo	82.1%	81.3%	50.0%	49.7%

5.6.2 Análisis de contingencia

Se realizó el análisis de contingencia a la prueba de Western blot, clasificando las muestras de suero de leche de vaca por estado sanitario y banda detectada (Cuadro 11). Al considerar al Western blot como única prueba en el diagnóstico de mastitis micótica, se observó que en las muestras de suero de leche de vacas con mastitis subclínica (42.2%) y clínica (63.53%) se detectó la banda de 53.2 kDa, la cual no fue detectada en las muestras de suero de leche de vacas sanas (Cuadro 11) (Figura 20a).

Cuadro 11. Detección de manoproteínas por Western blot en muestras de suero de leche de vacas con diferente estado sanitario.

Estado sanitario	Muestras de suero de leche	Banda detectada (kDa)	
		53.2	62
Sanas	78	0 (0 %)	0 (0 %)
Subclínicas	45	19 (42.22 %)	16 (35.56 %)
Clínicas	143	98 (63.53 %)	31 (21.68 %)
Total de muestras	266	-----	-----

P < 0.05.

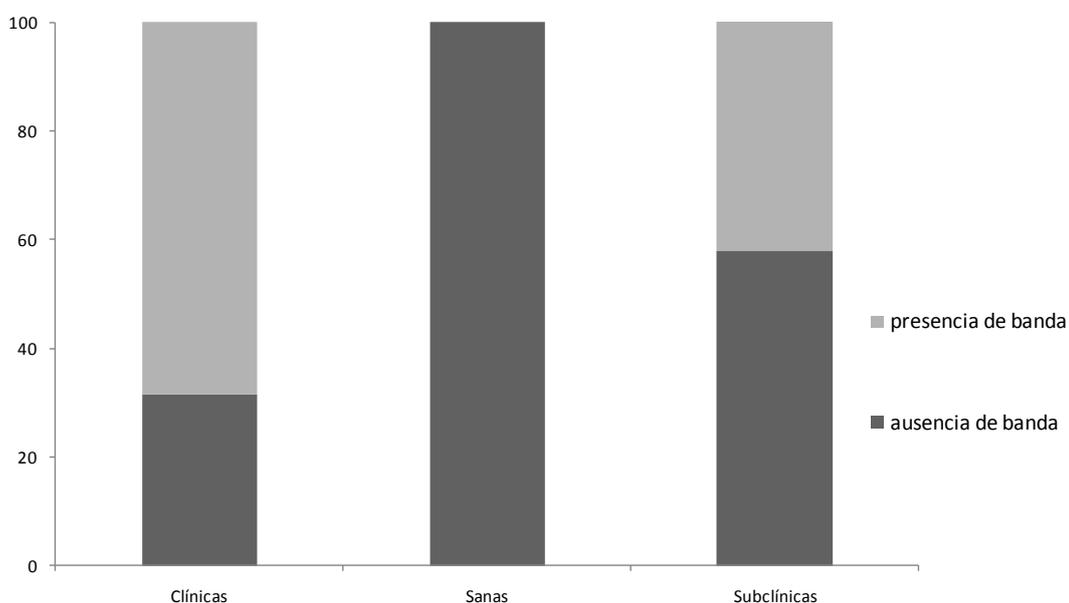


Figura 20a. Análisis de contingencia de la detección de anticuerpos contra manoproteínas de 53.2 kDa en sueros de leches de vacas por estado sanitario.

La detección de la banda de manoproteínas de 62 kDa también permitió diferenciar entre los estados sanitarios, sin embargo, el porcentaje de detección fue menor al encontrado con la banda de 53.2 kDa, con un 35.56% en los casos de mastitis subclínica y un 21.68% en los de mastitis clínica (Cuadro 11) (Figura 20b).

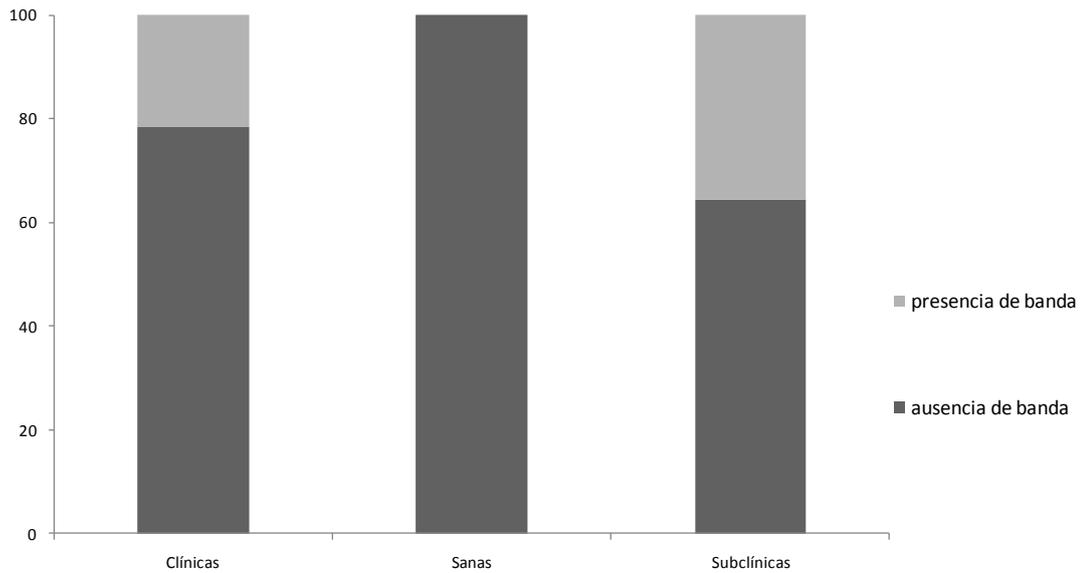


Figura 20b. Análisis de contingencia de la detección de anticuerpos contra manoproteínas de 62 kDa en sueros de leches de vacas por estado sanitario.

En un segundo análisis de contingencia las muestras se clasificaron con base en el estado sanitario, el aislamiento o no de levaduras y las bandas de manoproteínas detectadas (Cuadro 12).

Cuadro 12. Detección de manoproteínas por Western blot de muestras de suero de leche de vacas y aislado de levaduras.

Estado sanitario	Muestras de suero de leche	Aislamiento	Banda detectada (kDa)	
			53.2	62
Sanas	78	Con aislamiento n= 48	0/48 (0 %)	0/48 (0 %)
		Sin aislamiento n= 30	0/30 (0 %)	0/30 (0 %)
Subclínicas	45	Con aislamiento n= 15	13/15 (86.67 %)	14/15 (93.33 %)
		Sin aislamiento n= 30	6/30 (20 %)	2/30 (6.67 %)
Clínicas	143	Con aislamiento n= 113	97/113 (85.84 %)	31/113 (27.43 %)
		Sin aislamiento n= 30	1/30 (3.33 %)	0/30 (0 %)
Total de muestras	266	266	-----	-----

P < 0.05.

El porcentaje de detección de la banda de 53 kDa es mayor en las muestras de vacas con mastitis subclínica con un 86.67% y en clínicas del 85.84% a partir de las cuales se obtuvo algún aislado de levadura comparado con la proporción de muestras sin aislamiento de levaduras con un 20% en las subclínicas y 3% en clínicas (Cuadro 12) (Figura 21).

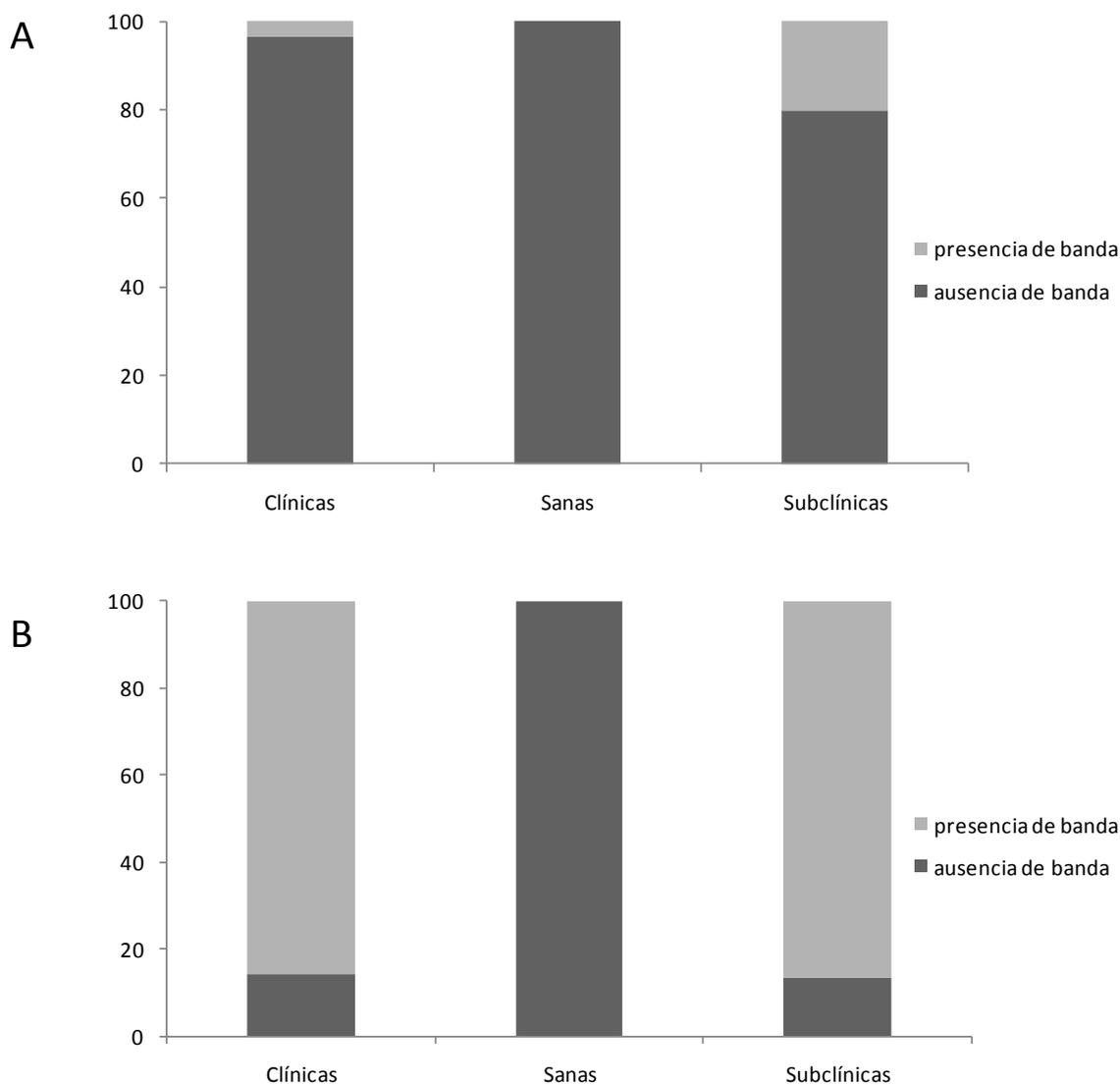


Figura 21. Análisis de contingencia de la detección de anticuerpos contra manoproteínas de 53 kDa en sueros de leche de vaca por estado sanitario y aislamiento de levaduras. **A:** muestras sin aislamiento de levaduras, **B:** muestras con aislamiento de levaduras.

Con la banda de 62 kDa se puede diferenciar entre estados sanitarios (Figura 22), tanto en el caso de los sueros de leche de vacas con mastitis subclínica y clínica con aislado de levadura (93.3% y 27.43% respectivamente) y sin aislado de levadura (6.67% y 0% en el mismo orden) (Cuadro 12).

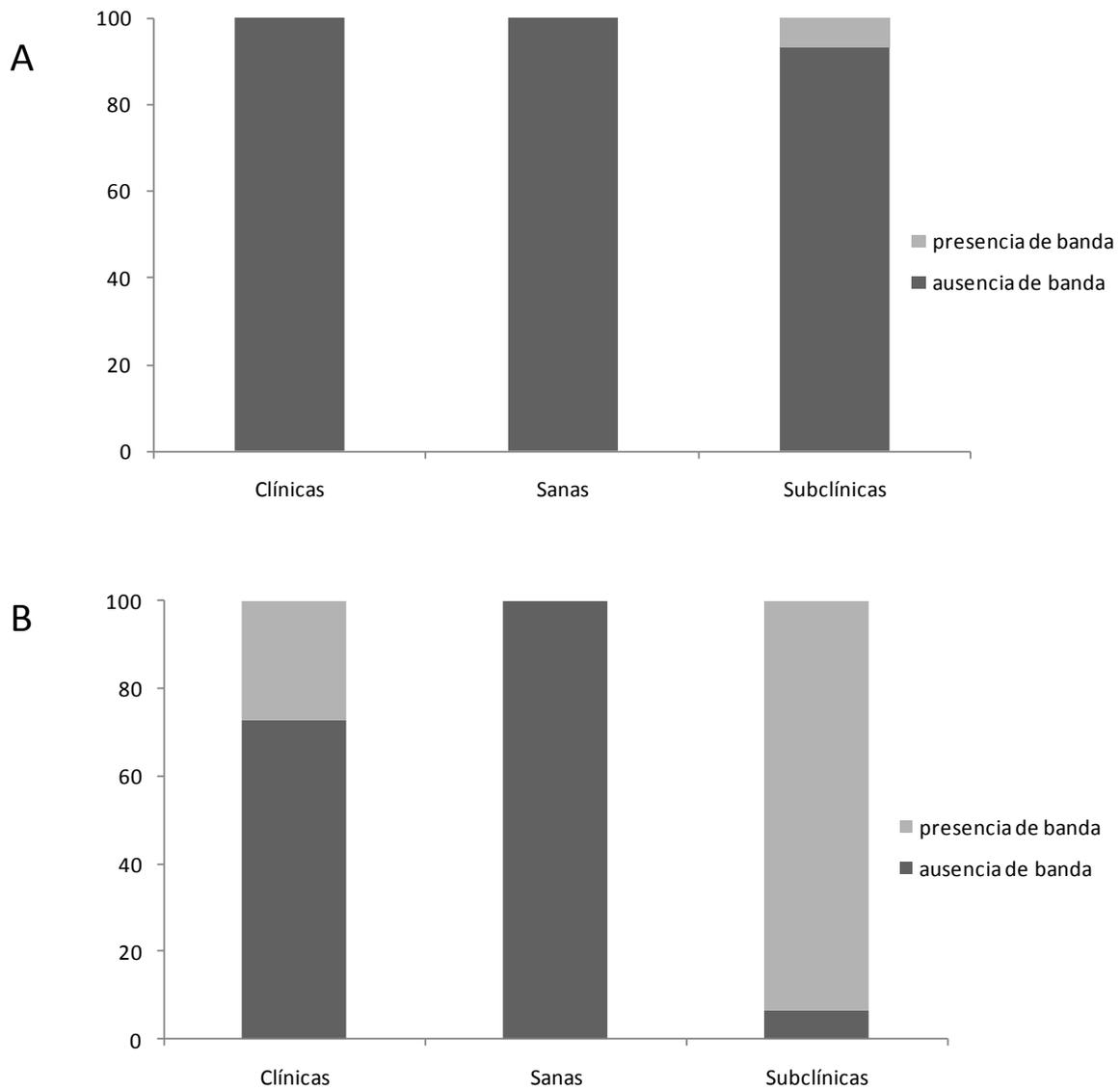


Figura 22. Análisis de contingencia de la detección de anticuerpos contra manoproteínas de 62 kDa en sueros de leche de vaca por estado sanitario y aislamiento de levaduras. **A:** muestras sin aislamiento de levaduras, **B:** muestras con aislamiento de levaduras.

6. DISCUSIÓN

Los casos de mastitis en cabras fueron considerablemente menores a los casos que se reportan en vacas ^{18,19}, lo cual se atribuye de forma importante a la resistencia natural de las cabras a este padecimiento. Se ha visto que las células de defensa en casos de mastitis en vacas no les confieren la protección adecuada contra este padecimiento, situación contraria en las cabras, en las cuales se ha observado que la cantidad de neutrófilos presentes en la ubre les confiere una adecuada protección contra bacterias y hongos. Cuando los causantes de mastitis en cabras son los hongos y en particular levaduras del género *Candida*, se ha reportado que la respuesta inmune de neutrófilos con radicales superóxido es efectiva contra estas levaduras ^{9,50}. Lo anterior ha sido confirmado en estudios realizados en pacientes humanos con inmunodeficiencias por neutropenias, donde se observó un aumento en la predisposición a infecciones por *Candida* ⁵⁰. Además de la protección inmunológica a microorganismos causantes de mastitis, la secreción láctea de tipo apócrino de las cabras, permite un mayor número de células de descamación que favorecen el arrastre de microorganismos y por lo tanto inhiben su proliferación ⁹.

Aún cuando se encontraron pocos casos de mastitis subclínica y clínica en cabras para este estudio, estas muestras provenían de producciones con un sistema estabulado que, de acuerdo a lo reportado por Sheaker *et al* ⁶ este tipo de sistemas incrementan los casos de mastitis en esta especie animal. Otra parte de las muestras provenían de un rancho (CEIEPAA) donde se han detectado casos de artritis encefalitis caprina ⁷ y es sabido que infecciones previas, por el virus causal de este padecimiento, predisponen a la presentación de mastitis ⁶.

Con respecto a las vacas, el alto número en casos de mastitis en esta especie animal, está relacionada a numerosos factores predisponentes que han sido bien estudiados, se sabe por ejemplo, que la selección genética para tener grandes productoras favorece un estrés metabólico relacionado con una baja resistencia a la mastitis, además de que conforme aumenta el volumen de producción de leche los elementos que le confieren protección contra microorganismos se diluyen. Existen factores fisiológicos que disminuyen la capacidad de la respuesta inmune de la ubre de las vacas como son: la edad del animal, el número de parto y el tiempo transcurrido después del parto, los primeros días y el final de la lactación. Como factores externos al animal se han considerado: una alimentación con plantas de alto contenido en estrógenos ¹, un mal manejo en el ordeño ⁴ y se ha observado que en primavera y verano aumentan los casos de mastitis ⁵.

Además de las diferencias ya mencionadas entre vacas y cabras hay que considerar que el comportamiento de cada especie y su anatomía permite que la exposición a los microorganismos sea diferente ¹.

En cuanto al aislamiento de levaduras a partir de las muestras de leche de cabras, el presente estudio es uno de los escasos trabajos en México enfocados a la determinación de levaduras en este tipo de muestras. El porcentaje de aislados de levaduras a partir de las muestras de leche de cabra fue del 1% (6/596) en cabras sanas, 8.33% (1/12) en mastitis subclínicas y ningún aislado de mastitis clínica (0/3). La cantidad de aislados obtenidos de leche de cabras con mastitis subclínica fue mayor a lo reportado por Misrha *et al.* ¹⁷, en ese estudio obtuvieron 44 leches de cabras con mastitis subclínica de las que aislaron un 2% (1/44) de levaduras. En otro estudio realizado por Spanenberg *et al.* ¹⁸, aislaron levaduras en un 59% (14/25) de muestras de leche de cabra en tanque y subproductos lácteos.

Respecto a la identificación de levaduras, el mayor número de aislados obtenidos correspondió a *C. parapsilosis* 57% (4/7) seguido de *C. lipolytica* 28.57%(2/7) y *C. albicans* 14.28% (1/7). Lo anterior concuerda con lo descrito por Spanenberg *et al* ¹⁸ quienes también aislaron a *C. parapsilosis* en un 12.5% (7/56) y *C. lipolytica* en un 3.57% (2/56). El hecho de que no se presentara mastitis en la cabra de la cual se recuperó *C. albicans* se atribuye a la resistencia del sistema inmune de la ubre de la cabra y a que se requiere de una cantidad elevada de levaduras para causar mastitis, esto último fue observado por Singh *et al* ²² en un ensayo experimental donde inoculó 60×10^6 células de *C. albicans/ml*, vía intramamaria para causar mastitis clínica en 10 cabras. En cuanto a los aislados de *C. parapsilosis* y *C. lipolytica* de leche de cabras sanas, aún no se establece la relevancia del aislamiento de estas levaduras, por lo que debe considerarse que ocurre algo semejante a lo observado en vacas, donde la presencia de levaduras se atribuye a que se encuentran en diferentes sustratos del ambiente (agua, suelo, plantas) que están en contacto con los animales ⁴.

Finalmente, el aislado de *C. lipolytica* obtenido de una leche mastítica se atribuye a que ésta especie se considera un patógeno oportunista relacionado con la aplicación de antibacterianos de amplio espectro ^{59,60}.

La cantidad de aislados de levaduras obtenidos de leche de vacas, de un estudio previo, se ha atribuido principalmente a tratamientos prolongados con antibacterianos y la falta de higiene en el ordeño ^{1, 4}. A partir de las leches de vacas sanas y con mastitis clínica, el mayor número de aislados correspondió a *C. glabrata*, *C. krusei* y *Candida* spp lo que corresponde con varios trabajos en los que se han aislado estas mismas especies de *Candida* (Kitamura *et al* en 1990 ²⁰, Elad *et al* en 1995 ⁴⁵, Bergonier *et al* en 2003 ³ y Wawrov *et al* en 2010 ¹⁶).

Con relación al método de obtención de las manoproteínas de los extractos crudos de las cepas de referencia de *Candida*, se eligió una extracción química, por resultar económica, de fácil realización y que además no modifica la estructura del antígeno a diferencia de otras metodologías como son la hidrólisis alcalina y la precipitación con licor de Fehling^{52,53}. Los patrones electroforéticos de los extractos crudos de pared de cada una de las cepas de referencia, mostraron diferencias entre sí, lo que corresponde a lo observado por Burnie *et al*⁴¹ y Bikandi *et al*⁴⁰, quienes compararon el perfil electroforético de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei* entre otras. Asimismo, se demostró la presencia de bandas ubicadas entre los 49 y 70 kDa, lo que corresponde a las manoproteínas ya reportadas de la fase levaduriforme de *C. albicans*^{41,43,45}. Con estos extractos crudos de pared se realizó el Western blot con el que se detectaron anticuerpos contra manoproteínas en el suero de leche de vacas, de las que se habían aislado diferentes especies de *Candida*, lo que indicó una reacción cruzada a manoproteínas de este género, estos hallazgos se observaron en estudios donde se titularon anticuerpos antimananas en suero sanguíneo de conejo hiperinmunizados con manoproteínas de diferentes serotipos de *C. albicans* que reaccionaron de manera cruzada con sueros de conejo infectados con diferentes especies de *Candida*^{41,42,55}, además de un estudio previo donde se emplearon mananas de *C. albicans* en una ELISA indirecta para la detección de anticuerpos en suero de leche de vacas, logrando diferenciar entre los estados sanitarios¹³.

Respecto a la purificación de las manoproteínas a partir de los extractos crudos de *C. albicans*, se eligieron las bandas de entre 49 a 62 kDa que ya se han descrito en estudios previos^{41,55}. Dichas bandas se purificaron por electroelución y fue posible separar las manoproteínas de interés con un rendimiento de 1.7 mg de manoproteínas a partir de 119 mg de proteína del extracto crudo de pared, tal como lo reportó Moragues *et al*³⁴, quienes lograron separar manoproteínas empleando una metodología similar aunque no reportó el rendimiento del antígeno obtenido. En el presente estudio, el rendimiento del antígeno fue menor a lo obtenido por Farahnejad *et al*⁵² (1.5 mg de manoproteína a partir de 30 mg de proteína del extracto crudo de pared), en dicho estudio se empleó cromatografía de intercambio iónico con columnas de sefrosa con concanavalina A, una técnica muy específica y con alto rendimiento. Al comparar el método de electroelución con otras metodologías para la obtención de manoproteínas, la cromatografía de intercambio iónico con columnas de concanavalina A o de sefrosa son muy específicas⁴⁸ sin embargo, son muy costosas y laboriosas, otras metodologías que emplean enzimas como la zimolasa o químicos como el ditiotreitól también son costosas y no tan específicas, además de que la zimolasa puede alterar la conformación de las manoproteínas⁵³.

Existen estudios donde se ha empleado la prueba de Western blot para la detección de anticuerpos contra *P. zopfi*³⁵, pero hasta donde tenemos conocimiento este es el primer trabajo donde se detectan anticuerpos contra manoproteínas de *C. albicans* en leche de vaca y cabra.

El análisis estadístico de los resultados del Western blot se realizó a partir de los datos obtenidos de las muestras de suero de leche de vacas, ya que con estos datos fue posible formar grupos de análisis. En el caso de las muestras de leche de cabra no fue posible realizar el mismo análisis debido a que el número de muestras no fue homogéneo. Al realizar la inmunodetección de anticuerpos en el suero de leche de vaca, la banda de 49.7 kDa fue detectada por todas las muestras independientemente del estado sanitario de la leche o de si existió o no aislamiento de levaduras a partir de la muestra. Este resultado hizo que la especificidad de la prueba, aún en combinación con las otras dos bandas (53.2 y 62 kDa), fuera baja. Lo anterior puede deberse a que existen manoproteínas que se comparten con *S. cerevisiae*⁶¹, una levadura que se encuentra en el tracto digestivo de rumiantes y que además puede ser adicionada en el alimento como probiótico, otra teoría, es que existen procesos de enfermedad por *Candida* que pasan desapercibidas para el clínico y que sin embargo estimulan la respuesta inmune³⁸.

La banda de 53.2 kDa tiene una alta especificidad y sensibilidad, esto puede deberse a que son manoproteínas específicas del género *Candida* y debido al método de extracción empleado con 2 mercaptoetanol el antígeno conservó su arreglo original, lo que permitió que fuera reconocida en un mayor número de muestras, lo que corresponde a lo observado en el estudio ya mencionado de Farahnejad *et al*⁵², en el que las manoproteínas fueron obtenidas por el mismo método de extracción química y determinó que se conservaba la conformación de epitopos importantes en las manoproteínas, mediante la detección con anticuerpos monoclonales.

La banda de 62 kDa tuvo una alta especificidad y una baja sensibilidad, lo que debe estar relacionado al serotipo de la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 empleada, no hace reacción cruzada con todos los aislados obtenidos de las leches de vaca lo que corresponde a lo observado por Bikandy *et al*⁴⁰ y Calderone *et al*⁴², quienes determinaron que las especies que presentan reacción cruzada con el serotipo A de *C. albicans* no son las mismas que hacen reacción cruzada con el serotipo B, además de que las especies relacionadas a un mayor número de padecimientos en infecciones en humanos pertenecían al serotipo A. Así mismo, cuando se analizó la información con base en la detección de anticuerpos contra ambas bandas de manoproteínas (53.2 y 62 kDa) disminuyó la sensibilidad de la prueba lo cual era un resultado

esperado, considerando el bajo número de muestras que detectaron la banda de 62 kDa.

Cuando se realizó el análisis de contingencia con base al estado sanitario de las muestras, pudo observarse que todas las muestras provenientes de vacas sanas detectaron anticuerpos contra la banda de manoproteínas de 49.7 kDa. Así mismo, un alto porcentaje de muestras de vacas con mastitis subclínica y clínica (82.2 y 97.2% respectivamente) fueron inmunoreactivas contra dicha banda. Lo que demuestra nuevamente que debe existir reacción cruzada con las manoproteínas de *S. cerevisiae*.

En este mismo análisis, a partir de las muestras de vacas sanas no se detectaron anticuerpos contra las bandas de 53.2 y 62 kDa. Un mayor número de muestras con mastitis subclínica y clínica (42.2 y 63.53% respectivamente) presentó anticuerpos contra la banda de 53.2 kDa, en comparación con los casos detectados con la banda de 62 kDa (35.56% en subclínicas y 21.68% en clínicas). Lo que indica una mayor respuesta antigénica contra la banda de manoproteínas de 53.2 kDa.

Al analizar los datos considerando si se obtuvo aislamiento de levaduras de las muestras se observó que, el porcentaje de leches mastíticas positivas a la banda de 53.2 kDa aumentó cuando hubo presencia de levaduras confirmada por el cultivo (86.6% subclínicas y 85.8% clínicas), que cuando no lo hubo (20 y 3.3% respectivamente). Lo mismo ocurrió con la banda de 62 kDa cuando hubo aislamiento de levaduras (93.3% subclínicas y 27.4% clínicas) y cuando no (6.6 y 0% respectivamente).

Empleando las manoproteínas de 53.2 y 62 kDa, fue posible detectar con una alta especificidad y sensibilidad anticuerpos en suero de leche que permitieron diferenciar aquellas muestras en las que la presencia de la levadura implica un proceso inflamatorio, por lo que se logró diferenciar entre estados sanitarios. Esto ya se había observado en un estudio previo donde se emplearon mananas de *C. albicans* en una ELISA indirecta con la cual se diferenció entre vacas sanas de las que padecían mastitis. Además, en otro estudio realizado por Roesler *et al*³⁵ observaron algo semejante al emplear la prueba de Western blot para detectar anticuerpos contra antígenos de *P. zopfii* a partir de sueros de leche de vacas, logrando diferenciar entre vacas sanas y con mastitis.

Por otra parte, mediante el Western blot fue posible la detección de anticuerpos en suero de leche de cabras, las cuales eran muestras seriadas de un periodo de lactación. La detección de anticuerpos contra las bandas de manoproteínas de 49.7 kDa en muestras de suero de leches de cabras sanas y con mastitis clínica y subclínica, impidió diferenciar entre los estados sanitarios.

Con las bandas de manoproteínas de 53.2 y 62 kDa se detectaron anticuerpos en aquellas muestras de suero de leche de cabras sanas de las que se obtuvo algún aislado de levadura. Lo anterior hace suponer que estos anticuerpos se generaron de una infección previa y que persisten durante todo el periodo de lactación. En las muestras de suero de leche de cabra con mastitis subclínica de la que se aisló *C. lipolytica* también se detectaron anticuerpos en contra de las manoproteínas de 53.2 y 62 kDa, lo que se interpretaría como un proceso de enfermedad ocasionado por la levadura, sin embargo, no se tienen suficientes muestras para que estos resultados sean concluyentes.

7. CONCLUSIONES

La presencia de casos de mastitis en cabras fue menor a lo observado en vacas, atribuido a la resistencia natural de la especie a la mastitis.

C. parapsilosis fue la especie de *Candida* con mayor número de aislados de leche de cabras seguida de *C. lipolytica*, que reflejan la tendencia de numerosos trabajos que indican que *C. albicans* deja de ser el principal agente involucrado en procesos de enfermedad.

En la prueba de Western blot, con la banda de manoproteínas de 53.2 kDa se logró diferenciar entre los estados sanitarios de los sueros de leche de vacas con una sensibilidad del 85.9% y una especificidad del 91.7%.

Los títulos de anticuerpos contra manoproteínas de *Candida*, presentes en leche de vacas fueron mayores a los presentes en la leche de cabras.

Mediante el Western blot, la detección de anticuerpos contra manoproteínas de 53.2 kDa, fue mayor en los grupos de sueros de leche de vacas con mastitis con aislados de levaduras del género *Candida*.

En la prueba de Western blot con las bandas de 53.2 y 62 kDa se lograron detectar anticuerpos en todo el período de lactación en el suero de leche de cabras con aislados de levaduras.

8. PROPUESTA

La producción del antígeno fue simple y económica, sin embargo, se obtuvo un bajo rendimiento, por lo que debe considerarse otro sistema de extracción.

Del antígeno obtenido se observó la presencia de bandas de manoproteínas que pueden ser de utilidad para implementar una prueba de diagnóstico, como lo es la ELISA indirecta en la cual puede trabajarse un gran número de muestras con un menor costo. Sin embargo, como se ha visto en trabajos anteriores, debe tomarse en cuenta que el empleo de una sola técnica de diagnóstico es insuficiente para determinar un proceso de enfermedad causado por *Candida*, por lo que las pruebas de diagnóstico deben ser complementarias. Además de la detección de anticuerpos puede incluirse la detección de manoproteínas en el suero de leche, empleando anticuerpos monoclonales generados con el antígeno obtenido en el presente estudio. Así mismo, es necesario coleccionar un mayor número de muestras de leche de cabra en otros sistemas de producción para conocer la prevalencia de levaduras.

9. LITERATURA CITADA

1. Ávila S. Fisiopatología de la Glándula Mamaria y Ordeño. México: FMVZ UNAM, 2001.
2. 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.
3. Bergonier D, Crémouxb R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. Vet Res 2003, 34: 689–716.
4. Segundo ZC. Caracterización de hongos unicelulares aislados de leches normales y mastíticas, mediante pruebas bioquímicas y moleculares (tesis de doctorado). Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2008.
5. Steeneveld W, Hogeveen H, Barkema HW, Van den Broek J, Huirne RBM. The influence of cow factors on the incidence of clinical mastitis in dairy cows. J Dairy Sci 2008; 91:1391–1402.
6. Sheaker J, Harris Jr. Mastitis of dairy goats. Universidad de Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/DS120>. Universidad de Florida. 22 de enero de 2009.
7. Vázquez Franco N. Estudio sobre la seroprevalencia de la artritis-encefalitis caprina en sistemas lecheros intensivos en la región del altiplano mexicano. Tesis de licenciatura). México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2008.
8. Krukowski H, Saba L. Bovine mycotic mastitis (A review). Folia Vet 2003; 47(1): 3-7.
9. Paape MJ, Poutrel B, Contreras A, Marco JC, Capuco AV. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. J. Dairy Sci 2001; (84 Suppl E.):E237-E244.
10. Riollet C, Rainard P, Poutrel B. Cells and Cytokines in Inflammatory Secretions of Bovine Mammary Gland. MJ, Clegg R editores. Biology of the Mammary Gland. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer 2002 (Vol 480): 247-258.
11. Pontón J. El diagnóstico microbiológico independiente del cultivo en la candidiasis invasora. Importancia de los marcadores fúngicos. 2006; 23: 20-25.
12. Jones, J M. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. Clin Micro Rev 1990; 3(1): 32-45.
13. Quiroga-Hernández C. 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 de licenciatura). México DF.

- Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2008.
14. López C, Giro L, Ramos L, Ramadán S, Bulacio L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. R Argen Microbiol 2005; 37: 16-21.
 15. Pérez V, Corpa JM., García JE, Adriz JJ, Jensen HE. Natural disease. Mammary and systemic aspergillosis in dairy sheep. Vet Path 1998; 1: 35235-240.
 16. Wawron W, Bochniarz M, Piech T. Yeast mastitis in dairy cows in the middle-eastern part of Poland. Bull Vet Inst Pulawy 2010; 54: 201-204
 17. Mishra PR, Hazari S, Pal A. Subclinical mastitis in goat with special reference to fungus. Indian J. Dairy Sci 1996; 59(3): 209-210.
 18. Spanamberg A, Wunder E, Brayer Pereira D, Argenta J, Cavallini Sanches E, Valente P, Ferreiro L. Diversity of yeasts from bovine mastitis in southern Brazil. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 154-156
 19. Seker E. Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in western Turkey. *Mycopath* 2010; 169(4):303-8.
 20. Kitamura H, Anri A, Fuse K, Seo M, Itakura C. Chronic mastitis caused by *Candida maltosa* in a cow. Vet Pathol 1990; 27: 465,466.
 21. Spanamberg A, Pais Ramos J, Leoncini O, Hartz Alves S, Valente P. High frequency of potentially pathogenic yeast species in goat's raw milk and creamed cheese in Southern Brazil. *Acta Scien Vet* 2009; 37(2): 133-141.
 22. Singh P, Sood N, Gupta P. P, Jand S.K, Banga H.S. Experimental candidal mastitis in goats: Clinical, haematological, biochemical and sequential pathological studies. *Mycopath* 1998; 140: 89–97.
 23. Jand SK, Dhillon SS. Mycotic mastitis produced experimentally in goats. *Mykosen* 1975; 18: 363–66.
 24. Singh M, Gupta PP, Rana JS, Jand SK. Clinic-pathological studies on experimental cryptococcal mastitis in goats. *Mycopath* 1994; 126 (3): 147-55.
 25. 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.
 26. Calderone R, Cihlar R. editores. Fungal Pathogenesis. Principles and clinical applications. Marcel Dekker, Inc. New York. 2002.
 27. Nelson R D, Shibata N, Podzorski R P, Herron M J. *Candida* mannan: chemistry, supresión of cell mediated immunity, and possible mechanisms of action. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4(1):1-19.

28. Casanova M, Lopez-Ribot J, Monteagudo C, Llombart-Bosch A, Sentandreu R, Martinez JA. Identification of a 58 kilodalton cell surface fibrinogen binding mannoprotein from *Candida albicans*. *Infect Immun* 1992; 60 (10): 4221-4229.
29. Lim Y, Lee D. Rapid PCR method for detecting *Candida albicans* using primers derived from the integrin-like protein gene *INT1* of *Candida albicans*. *J Microbiol* 2000; 38 (2): 105-108.
30. Fredricks D, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43(10): 5122–5128.
31. Arancia S, Sandinin A, Cassone F, De Bernardis R, La Valle S. Construction and use of PCR primers from 65 kDa mannoprotein gene for identification of *C. albicans*. *Mol Cell Probes* 2004; 18:171-175.
32. Jaeger E, Carroll N, Choudhury S, Dunlop A, Towler H, Matheson M, Adamson P, Okhravi N, Lightman S. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38(8): 2902-2908.
33. Flauth M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 395–401.
34. Moragues M, Omaetxebarria M, Elguezabal N, Sevilla M, Conti S, Polonelli L, Pontón JA monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three Anti- *C. albicans* activities. *Infect and Immun.* 2003; 71(9): 5273–5279
35. Roesler U, Hensel A. Longitudinal analysis of *Prototheca zopffi* specific immune responses: correlation with disease progression and carriage in dairy cows. *J. Clin Microbiol* 2003; 41(3): 1181-1186.
36. 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 Res.* 2007:1-7.
37. 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.
38. Srinivasan A, Ni Y, Tizard I. Specificity and prevalence of natural bovine antimannan antibodies. *Clin Diagnos Lab Immun* 1999; 6(6): 946–952.
39. Tizard I. *Inmunología veterinaria*. 4a ed. Interamericana McGraw-Hill. México. 1995

40. Bikandi J, San Millán R, Regúlez P, Moragues M, Quindós G, Pontón J. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes during experimental infections by different *Candida* species. Clin Diagn Lab Immunol 1998; (5)3: 369–374.
41. Burnie JP, Matthews R C, Fox A, Tabaqchali S. Use of immunoblotting to identify antigenic differences between the yeast and mycelial phases of *Candida albicans*. J Clin Pathol 1985; 38:701-706.
42. Calderone RA, Braun PC. Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. Micro Rev 1991; 55(1): 1-20.
43. Ponton J, Jones JM. Analysis of cell wall extracts of *Candida albicans* by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot techniques. Infect Immun 1986; (53)3:565-572.
44. Martínez J, Asanovajo M, Lopez-Ribot I, Arciade J, Entandreu R. Wall mannoproteins in cells from colonial phenotypic variants of *Candida albicans*. J Gen Micro 1990; 136: 2421-2432.
45. Elad D, Shpigel NY, Winkler M., Klinger I, Funchs V, Saran A, Faingold D. Feed contamination with *Candida krusei* as a probable source of mycotic mastitis in dairy cows. J Am Vet Med Assoc 1995; 5 (207): 620-622.
46. Jouault T, Delaunoy C, Sendid B, Ajana F, Poulain D. Differential humoral response against α and β -Linked Mannose residues associated with tissue invasion by *Candida albicans*. Clin Diagnos Lab Immun 1997; 4(3): 328–333.
47. Varki-A, Cummings R, Esko H. Essentials of glycobiology. Segunda edición. California EUA, CSH Press 2009. Libro en formato electrónico www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch21 24.06.10
48. Han Y, Ulrich MA, Cutler JE. *Candida albicans* mannan extract–protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. J Infect Dis 1999; 179:1477–84.
49. Mody C, Sims KL, Wood CJ, Syme RM, Spurrell J, Sexton M. Proteins in the cell wall and membrane of *Cryptococcus neoformans* stimulate lymphocytes from both adults and fetal cord blood to proliferate Infect. Immun, 1996; 11 (64): 4811–4819.
50. Romani L. Chapter 1 Immunity to fungi. Kavanagh K editor. New Insights in Medical Mycology. Springer, 2007:1-18.
51. Netea M, Gow N, Munro C. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. J Clin Invest 2006; 116(6):1642-1650.
52. Farahnejad Z, Rasaei M, Yadegari H, Frouzandeh Moghadam M. Purification and characterization of cell wall mannoproteins of *Candida albicans* using intact cell method. MJIRI 2004; 18(2):167-172.

53. Ellsworth J H, Reiss E, Bradley R L, Chmel H, Armstrong D. Comparative serological and cutaneous reactivity of candidal cytoplasmatic proteins and mannan separated by affinity for concanavalin A. *J Clin Microbiol* 1977; 5(1): 91-99.
54. Martinez J, Gil L, Casanova M, Lopez-Ribot S, García De Lomas J, Sentandreu R. Wall mannoproteins in cells from colonial phenotypic variants of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 2421-2432.
55. Manning-Zweerink M, Maloney C, Mitchell T, Weston H. Immunoblot analyses of *Candida albicans* associated antigens and antibodies in human sera. *J Clin Microbiol* 1986; (23)1: 46-52.
56. Segundo C. Producción de anticuerpos monoclonales contra la enolasa de *Candida albicans*. (Tesis de maestría). México DF. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 2001.
57. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
58. García-Latorre E, Domínguez LML, Cancino DM, Quezada PF, Moreno LC, López SR, Reyes ME. Manual del curso de prácticas de Inmunología Molecular. IPN. ENCB. México 1998.
59. Johansen Mehner C. Evaluación de la prueba de conductividad eléctrica de la leche, como método alternativo de diagnóstico de mastitis subclínica en cabras lecheras (tesis de licenciatura). Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1993.
60. Hazen, KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:462-478.
61. Nakajima T, Ballou CE. Characterization of the carbohydrate fragments obtained from *Saccharomyces cerevisiae* mannan by alkaline degradation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7679-7684.

10. ANEXO

Electroforesis

Solución	Reactivo	Cantidad
Regulador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	Tris hidroximenilaminometano	18.17 g
	Agua destilada	50 ml
	Ajustar con HCl 1 N Aforar con agua destilada a 100 ml	
Regulador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	Tris hidroximenilaminometano	6.057 g
	Agua destilada	40 ml
	Ajustar el pH con HCl 1 N Aforar con agua destilada a 100 ml	
Solución SDS(duodecil sulfato de sodio) al 10%	Duodecil Sulfato de Sodio	10 g
	Aforar a 100 ml de agua destilada	
Solución de monómeros al 30.8 % de concentración total. NEUROTOXICO	Acrilamida	30 g
	Bis acrilamida	0.8 g
	Aforar a 100 ml con agua destilada y conservar en frasco ámbar	
Persulfato de amonio al 10 %. Preparar justo antes de usar	Persulfato de amonio	0.1g
	Agua destilada	1ml
Regulador de corrida 2X	Solución Tris- HCl pH 6.8	1.25 ml
	SDS 10 %	2 ml
	Glicerol	1 ml
	Azul de bromofenol 0.2 %	250 µl
	2- mercaptoetanol	500 µl
Amortiguador de corrida	Tris hidroximenilaminometano	3 g
	Glicina	14.4 g
	SDS	1 g
	Agua destilada	1 L

Solución	Reactivo	Cantidad
Colorante azul de Coomasie para proteínas (500 ml)	Azul de Coomasie R-250	1.25 g
	Agua destilada	227 ml
	Metanol	227 ml
	Ácido acético glacial	45 ml
Solución decolorante (1L)	Metanol	455 ml
	Agua destilada	455 ml
	Acido acético glacial	45 ml

Lisis celular

Solución	Reactivo	Cantidad
Solución de lisis	Solución A fosfato de sodio monobásico	0.2 M
	Solución B fosfato de sodio dibásico	0.2 M
	Metilsulfonilfluorido	0.001 M
	B- mercaptoetanol	0.01 M
	Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)	0.001 M

Determinación de proteínas. Método de Bradford

Solución	Reactivo	Cantidad
Regulador de Tris acetato 0.05 M, pH 7.5	Tris base	6.05 g
	Ácido acético glacial	1.42 ml
	Ajustar pH Aforar a 1000 ml con agua destilada	
Reactivo de Bradford	Colorante azul brillante de Coomasie G-250	100 mg
	Etanol 95%	50 ml
	Ácido fosfórico al 85%	100 ml
	Aforar a 1000 ml con agua destilada. Conservar a 4° C	

Transferencia

Solución	Reactivo	Cantidad
Solución de Towbin	Trizma	3 g
	Glicina	14 g
	Metanol	200 ml
	Aforar a 1000 ml con agua destilada	

Western blot

Solución	Reactivo	Cantidad
Solución de fosfatos. PB 10 X	Fosfato de sodio monobásico monohidratado	2.62 g
	Fosfato de sodio di-básico anhidro	11.5 g
	Agua destilada	200 ml
	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	PB 10X	100 ml
	NaCl	8.75 g
	Agua destilada	800 ml
	Ajustar el pH a 7.2 y aforar a 1000 ml con agua destilada.	
Amortiguador de lavado. PBS-Tween 20 al 0.05%	Solución salina de fosfatos pH 7.2	1000 ml
	Tween 20	0.5 ml
Solución de bloqueo (leche descremada al 3%) Debe prepararse hasta su uso.	Leche descremada en polvo	3 g
	PBS Tween 20	100 ml
Solución cromógeno sustrato (30 ml) Se prepara antes de usarla	4-cloro-1-naftol	25 mg
	Metanol absoluto	5 ml
	Una vez disuelto se agregan:	
	PBS	25 ml
	Peróxido de hidrogeno al 3%	25 µl

Electroelución

El amortiguador es el mismo empleado para la electroforesis pero debe ser nuevo. Antes de utilizar las membranas deben tratarse a 60°C/1 h y conservarse en refrigeración, en el amortiguador de corrida adicionado con 0.05% de azida de sodio.