



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**SEROPREVALENCIA DE *COCCIDIOIDES* SPP EN PERROS HABITANTES DE
TORREÓN, COAHUILA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ALEJANDRA LIZBETH ALVAREZ GÓMEZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Misael González Ibarra**

VOCAL: **Profesor: Patricia Elvira Berrón Ruiz**

SECRETARIO: **Profesor: Laura Rosio Castañón Olivares**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Enrique Ortega Soto**

2° SUPLENTE: **Profesor: Beatriz Ruiz Villafán**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ASESOR DEL TEMA:

DRA. LAURA ROSIO CASTAÑÓN OLIVARES

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA

SUSTENTANTE:

ALEJANDRA LIZBETH ÁLVAREZ GÓMEZ

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Coccidioidomicosis	3
1.2. Manifestaciones clínicas humanas	3
1.3. Coccidioidomicosis canina	6
1.4. Diagnóstico en humanos	8
1.4.1. Estudios de gabinete y análisis clínicos	8
1.4.2. Análisis micológico	9
1.4.2.1. Examen directo	9
1.4.2.2. Frotis	10
1.4.2.3. Cultivos	10
1.4.3. Inmunológico	11
1.4.3.1. Inmunidad celular	12
1.4.3.2. Inmunidad humoral	12
1.4.4. Diagnóstico molecular	13
1.5. Diagnóstico en perros	14
1.6. Histopatología	15
1.7. Agente etiológico	15
1.7.1. Taxonomía	16
1.7.2. Morfología	16
1.7.2.1. Características de la fase micelial o saprobia (25 -30 °C)	17
1.7.2.2. Características de la fase de esférula o parasitaria (37°C)	18
1.7.3. Identificación molecular	19
1.7.4. Factores de virulencia	20
1.8. Epidemiología	22
1.9. Antecedentes mexicanos en coccidioidomicosis veterinaria	23
2. Planteamiento del problema	26
3. Hipótesis	27
4. Objetivos	28
4.1. Objetivo general	28
4.2. Objetivos particulares	28
5. Materiales y métodos	29
5.1. Muestras	29
5.2. Determinación de anticuerpos usando inmunodifusión doble	30
5.2.1. Fundamento de la técnica	31

5.3.	Estandarización de la inmunodifusión doble	32
5.3.1.	Prueba de coloides como soporte y concentración	32
5.3.2.	Diluciones del antígeno, sueros controles positivos y sueros problema	33
5.3.3.	Pruebas cruzadas	34
5.4.	Pruebas definitivas	36
5.5.	Contra inmunoelectroforesis	38
6.	Resultados	40
7.	Análisis de resultados	50
8.	Conclusiones	52
9.	Perspectivas a futuro	54
10.	Referencias	55
11.	Soluciones y reactivos	60

Resumen

La coccidioidomicosis, es una micosis profunda causada por dos especies del hongo: *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*, los cuales infectan a humanos y otras especies animales principalmente mamíferos, siendo la primera vía de infección, la respiratoria.

Entre las pruebas de diagnóstico se encuentran los exámenes directos con hidróxido de potasio (KOH) al 20% para la búsqueda de esférulas de 20-80 μm ; así como las serológicas, que además de ser confirmatorias de la presencia de la enfermedad, indican si hubo o no un primo-contacto con el hongo.

Los principales estudios sobre la enfermedad se han realizado en humanos. Poco se conoce dentro del ámbito veterinario, por lo que no se cuenta con datos sobre la prevalencia de la infección, ni de la enfermedad en animales.

El objetivo de este trabajo fue identificar anticuerpos anti-*Coccidioides* spp. en sueros de perros de una zona endémica (Torreón) y una zona no endémica (Distrito Federal), para estimar la prevalencia de primo-contacto.

Para alcanzar el objetivo, se realizaron dos pruebas de tipo serológico: inmunodifusión doble (IDD) y contra inmunoelectroforesis (CIE), usando un antígeno crudo (coccidioidina) y sueros de pacientes diagnosticados con coccidioidomicosis como controles positivos.

Se trabajaron 77 muestras séricas de perros, 52 provenientes de Torreón y 25 del Distrito Federal. Solo un suero de Torreón (1.92%) fue positivo en ambas técnicas.

Con este estudio se observó que no hay diferencia estadísticamente significativa en cuanto a seropositividad entre los perros de una zona considerada endémica de coccidioidomicosis (Torreón) y de otra no endémica (Distrito Federal).

1. Introducción

1.1. Coccidioidomicosis

La coccidioidomicosis, es una micosis profunda causada por alguna de las dos especies del hongo dimórfico *Coccidioides* spp. También se le conoce a la enfermedad como granuloma coccidioidal, reumatismo del desierto, enfermedad de Posadas, enfermedad de Wernicke o fiebre del Valle de San Joaquín [1].

Coccidioides spp se encuentra en el suelo y aire ambiental de zonas áridas, por lo que la principal vía de infección es la respiratoria, pero no la única; también puede haber infección por traumatismos cutáneos y en ambos casos se ponen en contacto los artroconidios enteroárticos del hongo con el organismo. Si la inmunidad del sujeto es deficiente puede desarrollarse la enfermedad, la cual va de asintomática hasta grave, poniendo en peligro la vida del paciente. Se desconoce la dosis infecciosa y no se ha reportado transmisión humano-humano, animal-humano ni animal-animal [2].

1.2 Manifestaciones clínicas humanas.

El conjunto de manifestaciones clínicas que presenta un paciente con coccidioidomicosis se resume en el cuadro 1.

La coccidioidomicosis primaria pulmonar se divide en dos grupos:

– Asintomática. Pacientes que tienen un primo-contacto sin manifestación de síntomas. La intradermorreacción con el antígeno coccidioidina o esferulina, es positiva [2].

– Sintomática. Puede ser leve o moderada, presentando síntomas parecidos a un cuadro gripal, fiebre moderada, cefalea, escalofríos, diaforesis nocturna y tos seca. Cuando es grave suele presentar neumonía, derrame pleural, en ocasiones afección miliar, fiebre de hasta 40 °C, dolor retroesternal, tos seca o con esputo blanco o purulento con sangre, anorexia, reducción de peso; a veces se presentan manifestaciones reactivas como eritema nodoso, conjuntivitis flictenular, dolor articular e inflamación o flogosis. [1] En la citometría hemática se reporta eosinofilia, leucocitosis, velocidad de sedimentación globular elevada [2].

La forma primaria cutánea se genera por un traumatismo en el cual la forma infectante del hongo queda en contacto con una solución de continuidad por la cual ingresa al organismo hospedero. Es poco frecuente, alrededor de un 2% de los casos totales. La topografía principal es cara, brazos y piernas. [2] Inicialmente hay presencia de un chancro nodular ulcerado o verrugoso el cual pasa a formar una úlcera con adenopatía [1].

La coccidioidomicosis residual es de tipo pulmonar la cual inicia como una pulmonar primaria asintomática que es detenida por el organismo del hospedero encapsulando al hongo, formando un coccidioidoma, en el cual el hongo queda latente aparentemente inocuo pero puede reactivarse [3]. Se descubre comúnmente de manera accidental cuando se aplica la intradermorreacción (IDR) con el antígeno coccidioidina o esferulina, o por medio de placas radiográficas o tomográficas observando lesiones cavitarias o tumorales encapsuladas, sin sintomatología, la serología es débil [2].

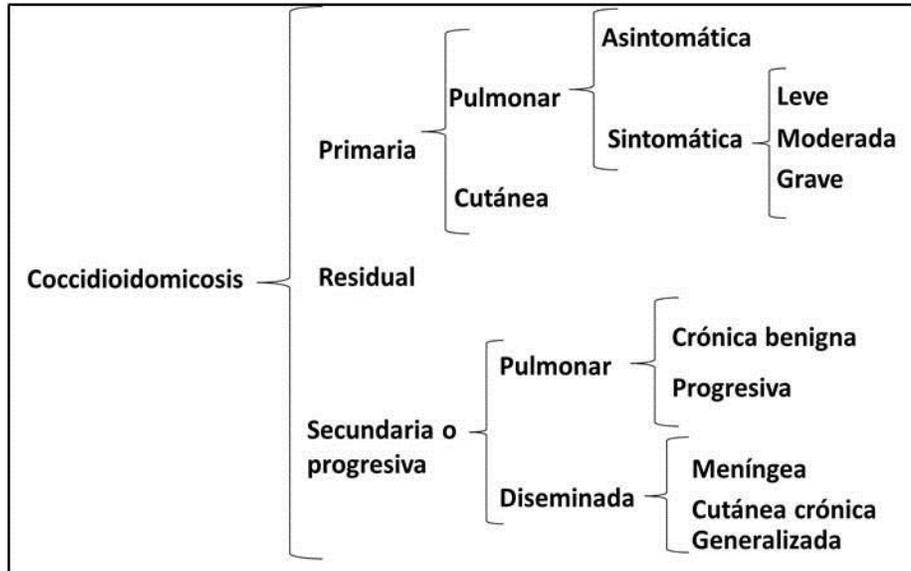
La coccidioidomicosis secundaria de tipo pulmonar puede subdividirse en crónica benigna o progresiva. Se presenta generalmente después de una diseminación, sin embargo, la respuesta inmune celular logra controlar a nivel local la infección, generando coccidioidomas, si las manifestaciones son

agudas hay fiebre, dolor torácico, tos con expectoración; en la forma progresiva suele haber cierta resistencia al tratamiento.[1] Los datos de laboratorio indican leucocitosis, eosinofilia moderada, volumen de eritrosedimentación globular elevada, IDR frente a la coccidioidina es positiva débil comúnmente, fijación de complemento y precipitinas indican títulos altos de anticuerpos IgG [2].

Pueden presentarse tres tipos de coccidioidomicosis diseminada:

- Meníngea: Esta se manifiesta en forma aguda o más común la crónica, casi siempre es posterior a una fase progresiva pulmonar, teniendo como manifestaciones clínicas cefaleas intensas, fiebre moderada, parálisis, trastorno de la memoria, desorientación y algunos síntomas psiquiátricos. El líquido cefalorraquídeo (LCR) tiene incremento de la celularidad, hipogluorraquia, hiperproteorraquia, aumento de densidad y turbidez [2]; puede complicarse y presentar hidrocefalia.
- Cutánea crónica: las lesiones son granulomatosas, ulceradas verrugosas o vegetantes; al haber diseminación por medio de sangre pueden aparecer pústulas, pápulas, nódulos, gomas, abscesos y placas. Su principal topografía son cabeza, cuello y tórax. Pueden haber fístulas debidas a lesiones en huesos y articulaciones y siempre presentan cicatrices [1].
- Generalizada, se disemina por vía linfática o hematógena y puede llegar a hígado, bazo, piel, tráquea, bronquios, daño en huesos y articulaciones; logrando diseminarse en ocasiones a cualquier órgano, incluso sistema nervioso central (SNC) [2].

Cuadro 1. Manifestaciones clínicas de coccidioidomicosis en humanos.



1.3 Coccidioidomicosis canina.

En México las investigaciones epidemiológicas de la coccidioidomicosis, han estado mayormente enfocadas al terreno humano. Muy poco se conoce acerca de la clínica y diagnóstico de la enfermedad en animales, a pesar de las diversas especies no humanas que pueden ser afectadas por el hongo.

Del grueso de los animales, se ha establecido en medicina veterinaria, que los más susceptibles a contraer la infección por *Coccidioides* spp son los primates [4] y los perros [5-7].

La coccidioidomicosis en caninos, así como en humanos, puede ser asintomática o con síntomas muy parecidos a los de un resfriado, pero si las células del sistema inmune no logran controlar la infección puede llegar a diseminarse [8].

Los principales signos asociados con la enfermedad primaria son tos, pérdida de peso, claudicación, fiebre, depresión y falta de apetito. La coccidioidomicosis en caninos presenta un amplio espectro de anomalías respiratorias y musculoesqueléticas y en raras ocasiones, cutáneas [5].

En perros la coccidioidomicosis diseminada ataca pulmones, bazo, hígado, riñones, corazón (pericardio), testículo, ojos, huesos largos, sistema nervioso central y piel [6].

Son varios los trabajos relacionados con el uso de pruebas serológicas para apoyar el diagnóstico de esta micosis en cánidos; por el contrario, pocos estudios se han publicado respecto a la prevalencia de la coccidioidomicosis medida a través de pruebas cutáneas (como se hace en los humanos).

Castañón y cols. [9], efectuaron la intradermoreacción (IDR) con coccidioidina, en 50 perros pertenecientes al Servicio Antirrábico de la ciudad de Tijuana en Baja California y sólo tres presentaron IDR+ a la coccidioidina, llamando la atención la baja frecuencia de positividad. Soltys y Smith reportaron que a diferencia del humano, la respuesta inmune celular a la coccidioidina en el perro es pasajera, con una duración incluso menor a la respuesta con anticuerpos séricos, además de que la proliferación celular en respuesta a la coccidioidina e histoplasmina, es más lenta en perros que en humanos [10], explicando la negatividad de pruebas cutáneas en perros habitantes de zonas endémicas de coccidioidomicosis.

En los perros, las inmunoglobulinas que pueden estar presentes al contacto con *Coccidioides* spp son IgA, IgE e IgG; sin embargo, la producción elevada de IgG es la que indica un contacto continuo con el hongo [8].

En los casos de coccidioidomicosis diseminada en perros, se han reportado tratamientos con: ketoconazol [6,7], fluconazol e itraconazol [5]; sin embargo, aproximadamente un tercio de los perros que llegan a padecer coccidioidomicosis mueren, un tercio son curados y el otro tercio tienen que estar en medicación de por vida [7].

1.4 Diagnóstico en humanos.

Cuando el médico sospecha de coccidioidomicosis, debe realizar un diagnóstico diferencial con enfermedades como son: tuberculosis, bronquitis, influenza, neumonía, histoplasmosis, blastomicosis, esporotricosis, paracoccidioidomicosis, leishmaniasis, sífilis, carcinoma espinocelular, tularemia, micetoma, epitelomas, ostiomielitis bacteriana, micobacteriosis atípica [1,2].

1.4.1 Estudios de gabinete y análisis clínicos.

En casos óseos y osteoarticulares, pueden realizarse: gammagrafía ósea, en donde se realiza un rastreo óseo de todo el esqueleto tras la administración de isótopos, y se identifica una hipercaptación en la zona afectada [11]; rayos X para observar daño en huesos y daños articulares, en imágenes de la resonancia magnética nuclear (RMN) sin medio de contraste, en los huesos pueden observarse derrames articulares por la densidad ósea [12].

En casos pulmonares es indispensable realizar placas de rayos X, puede observarse en ocasiones lesiones cavitarias, infiltrado de tipo neumónico o derrame pleural [2].

Cuando hay coccidioidomicosis meníngea, en la RMN se observa inflamación en las meninges, así como zonas donde pudo haber vasculitis coccidioidal [13].

Aunque no son estudios que permitan dar un diagnóstico específico los análisis clínicos de laboratorio sí son de apoyo en el diagnóstico diferencial, entre los cuales se encuentran las pruebas de citometría hemática ya que puede haber eosinofilia y/o leucocitosis; pruebas de velocidad de eritrosedimentación globular ya que suele estar elevada [2], análisis al líquido cefalorraquídeo con baja en glucosa y aspecto de agua de roca (cristalino, transparente) [14].

1.4.2 Análisis micológico.

Para realizar el diagnóstico de coccidioidomicosis, se busca la presencia de la forma parasitaria del hongo en muestras como: esputo, líquido de lavados bronquiales, LCR, líquido sinovial, escamas de piel, fragmentos de tejido y exudados diversos. Asimismo, pueden efectuarse estudios serológicos en suero, orina y líquido cefalorraquídeo, en las cuales se identificarán anticuerpos para apoyar el diagnóstico.

Por lo anterior, dependiendo del tipo de muestra, será elegida la técnica de diagnóstico, aunque lo recomendable es en lo posible efectuar todos los estudios.

1.4.2.1 Examen directo.

Se lleva a cabo con lugol, KOH o azul de algodón en muestras biológicas como: exudados, lavados bronquioalveolares, esputo, escamas. Si la muestra es positiva se observan al microscopio ordinario de luz esférulas

de 10-80 μm , de pared gruesa y refráctil, con endosporas de 2 a 5 μm . También es útil la tinción con blanco de calcoflúor la que será observada con microscopio de fluorescencia [1].

1.4.2.2 Frotis.

Al realizar un frote de exudados, lavados bronquioalveolares y esputo pueden ser vistas al microscopio esférulas de diferentes tamaños con endosporas o vacías con ayuda de alguna de las siguientes tinciones: Gomori-Grocott (en donde las esférulas/endosporas se tiñen de marrón oscuro o negro), Papanicolaou (rosado) y ácido peryódico de Schiff (fucsia o magenta) [2].

1.4.2.3 Cultivo.

La muestra se siembra en medios de cultivo como agar dextrosa Sabouraud con ciclohexamida (Micosel® o Mycobiotic®) más clorafenicol, en agar gelosa sangre, agar chocolate o agar infusión cerebro corazón [14] incubándola de 25-30°C. Si hay presencia del hongo, el crecimiento ocurre alrededor de tres a cinco días, pero en un período de dos semanas es cuando se considera una colonia madura y comienza a producir artroconidios enteroárticos [15].

En agar dextrosa Sabouraud al inicio las colonias se observan húmedas, blancas y membranosas, posteriormente producen un micelio blanco aéreo dándole un aspecto algodonoso, que con la maduración se pigmenta ligeramente de gris (Fig. 1). El reverso de la colonia puede ser blanco, amarillo o marrón [15].

Debido a que los artroconidios enteroárticos son las micropartículas anemofílicas infectantes, se recomienda en caso de hacer pruebas de identificación microscópica, deben realizarse con medidas extremas de seguridad, y en caso de ser posible en una cabina de bioseguridad clase III.

Microscópicamente, las colonias están formadas por hifas gruesas, ramificadas, septadas, hialinas que producen artroconidios enteroárticos de pared gruesa con forma de barril (2-4 μm x 3-6 μm) alternando entre ellos células vacías [15] o disyuntoras llamadas artículos [14], los cuales al debilitarse y romperse desprenden los artroconidios en los que se observan fibrillas anulares que son remanentes de las células disyuntoras (Fig. 2) [1].

1.4.3 Inmunológico.

Para la realización de las pruebas de apoyo en el diagnóstico inmunológico o para detectar individuos que han tenido contacto con el hongo se utilizan los antígenos coccidioidina o esferulina; siendo la primera un antígeno micelial y la esferulina un antígeno obtenido del sobrenadante citoplasmático de esférulas cultivadas y rotas por ultrasonido [16].

La coccidioidina es una mezcla de componentes antigénicos de origen glicoprotéico no purificados, del filtrado crudo del hongo crecido en un medio químicamente definido. La electroforesis en gel de acrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al ser teñida con plata pone en evidencia la presencia de 9 fracciones del antígeno, las cuales tienen un peso molecular de 100, 79, 62, 54, 45, 40, 33, 27 y 19 kDa [16].

1.4.3.1 Inmunidad celular.

La intradermorreacción (IDR) es una prueba cutánea que se usa principalmente para detectar la inmunidad celular.

Esta prueba emplea los extractos antigénicos coccidioidina o esferulina, de uno u otro se aplica 0.1ml en dilución 1:100 intradérmicamente en la cara anterior del antebrazo; la lectura de la prueba se realiza en 24 o 48 horas posteriores al inóculo[17].

Si el diámetro de la pápula, es mayor o igual a 5 mm de diámetro [17] la prueba es positiva; y si no hay signos ni síntomas, se interpreta como un contacto previo con el hongo que el sistema inmune celular resolvió; o a un contacto previo con otros hongos que comparten antígenos comunes con *Coccidioides* spp. Si es positiva durante el transcurso de la enfermedad, indica un buen pronóstico debido a que está presente inmunidad celular en el paciente [18].

Si la prueba es negativa, puede tener dos interpretaciones: nunca se ha estado en contacto con el hongo o hubo contacto pero al estar deprimido el sistema inmune, las células no son suficientes para dar respuesta al antígeno aplicado, de tal manera que el individuo es anérgico.

1.4.3.2 Inmunidad humoral.

Por medio de diversas técnicas serológicas se pueden detectar antígenos del tipo aglutininas (IgM) o precipitinas (IgG). Lo más común es la identificación de anticuerpos a partir de muestras de sueros.

Las pruebas de precipitación en tubo capilar y la de aglutinación con partículas de látex, ponen de manifiesto la presencia de anticuerpos tipo IgM, los cuales están presentes en la etapa temprana de la infección, pero solo son persistentes alrededor de 21 días debido a la vida media de las IgM, posteriormente las pruebas serán negativas a pesar de la infección. Pruebas como inmunodifusión doble, contra inmunoelectroforesis, fijación de complemento y ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) indican si hay presencia de anticuerpos de tipo IgG; generalmente éstas pruebas son positivas a partir de la tercera semana post-infección y además de diagnósticas son útiles para valorar el pronóstico del paciente, ya que títulos altos indican enfermedad grave y títulos con tendencia a disminuir, son de buen pronóstico para el paciente [14].

1.4.4 Diagnóstico molecular

Dentro de las finalidades de realizar un diagnóstico de tipo genético están: 1) reducir el tiempo en la obtención de resultados, 2) no es necesario el cultivo del hongo y 3) no depende de la respuesta inmunológica del hospedero [19]. No se ha comercializado algún "kit" de diagnóstico, pero varios son los estudios cuyo objetivo es el de efectuar la identificación de *Coccidioides* spp en cualquier producto biológico.

Bialek y cols., (2004) realizaron estudios con PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) analizando la secuencia del gen que transcribe para el antígeno-2/prolina (Ag2/PRA). Utilizaron una PCR anidada que amplificó parte de la región del gen estudiado y los cebadores diseñados fueron probados en muestras de pulmón y piel previamente parafinados. Los resultados fueron exitosos [19].

La región genómica ribosomal ARNr 18S (ADNr) fue estudiada por Johnson y cols., en 2004 para determinar si la región de ADNr de *Coccidioides* spp se puede identificar en el suero humano de pacientes con sospecha de coccidioidomicosis. Sus resultados mostraron la presencia de una banda de 239 pares de bases de ADN, correspondiendo a la región genómica buscada. Posteriormente en 2008, Kishi y su grupo de trabajo utilizando los mismos cebadores que Johnson y cols., identificaron la misma banda a partir de ADN extraído de tejido de pulmón incluido en parafina y fijado con formalina de pacientes con coccidioidomicosis [19].

Binnicker y cols., (2007), amplificaron una región de 170 pares de bases en la región ITS2 (espaciador transcrito interno 2) del genoma de ADNr de *Coccidioides* spp., confirmando la identificación de varios cultivos. Los cebadores diseñados fueron probados en muestras de vías respiratorias, identificando al hongo en aquellos casos que se les había diagnosticado coccidioidomicosis por histopatología, concluyendo que la región del genoma escogido como blanco, puede ser aplicable al diagnóstico [19].

1.5 Diagnóstico en perros.

El diagnóstico se realiza con base a la historia clínica mediante la localización de dolor en huesos y las coyunturas, presencia de los signos en las pruebas de laboratorio y gabinete que incluyen análisis de la sangre para investigar cambios en el recuento celular, y radiografía del tórax. Los estudios microbiológicos incluyen examen microscópico y cultivo de los productos patológicos (lesiones cutáneas, sangre, líquido cefalorraquídeo u otros líquidos biológicos) [6].

1.6 Histopatología.

Los tejidos más comúnmente analizados son de pulmón, piel y ganglios; en los cuales al teñirlos y observar la presencia de esférulas indican un diagnóstico positivo para coccidioidomicosis. Las tinciones utilizadas son hematoxilina y eosina, PAS (ácido periódico-de Schiff) y Grocott [1,2].

En los alrededores de las esférulas, suelen presentarse células plasmáticas, histocitos, células gigantes tipo Langhans, linfocitos, monocitos y eosinófilos, así como puede haber necrosis o carrierrexis [1,2].

En los tejidos de pulmón además de la reacción anteriormente descrita, avanzada la enfermedad se puede observar fibrosis, caseificación y calcificación y cuando son lesiones pulmonares localizadas se llegan a encontrar linfocitos T auxiliares en las partes centrales y T supresores en la periferia [1].

En estudios histopatológicos de caninos infectados con *Coccidioides* spp., pueden observarse focos granulomatosos con células retículoendoteliales, linfocitos, macrófagos mononucleares, neutrófilos y esférulas del hongo con o sin endosporas [8].

1.7 Agente etiológico.

Coccidioides immitis se ha aislado de pacientes que geográficamente se ubican en su mayoría al sur de California (EUA) y los estados de Baja California y Baja California Sur (México). Por su parte, *Coccidioides posadasii* se ha aislado de personas que habitan en el resto de las zonas consideradas endémicas (p. Ej: Arizona y Texas en EUA; Sonora, Coahuila en México; Centro y Sur América) [14].

Ambas especies son dimórficas y sólo pueden distinguirse por diferencias genotípicas [20].

1.7.1 Taxonomía

El género *Coccidioides* spp. se describió por primera vez en 1896 por Rixford y Gilchrist. Actualmente se encuentra dentro de la clasificación taxonómica como se observa en el cuadro 2 [21].

Cuadro 2. Taxonomía de *Coccidioides immitis* y *posadasii*

Reino:	<i>Eumycota</i>
Phylum:	<i>Dikaryomycota</i>
Sub- phylum:	<i>Ascomicotina</i>
Orden:	<i>Onygenales</i>
Familia:	<i>Onygenaceae</i>
Género:	<i>Coccidioides</i>
Especies:	<i>immitis</i> <i>posadasii</i>

1.7.2 Morfología

El género *Coccidioides* integra a hongos que son considerados dimórficos porque a temperatura no mayor a 30°C, se presentan en forma filamentosa (micelio y artroconidios), mientras que a 37°C se transforma en esférula con endosporas (forma parasitaria).

1.7.2.1 Características de la fase micelial o saprobia (25-30°C)

En agar dextrosa Sabouraud con ciclohexamida al inicio las colonias se observan húmedas, blancas y membranosas, posteriormente producen un micelio blanco aéreo (Fig. 1). Conforme pasa el tiempo y la colonia madura, su coloración cambia de ligeramente gris a marrón pálido, rosada o amarilla; el reverso de la colonia puede ser blanco a gris, algunas veces amarillo o marrón [15].



Figura 1. Colonias de aspecto algodonoso de *Coccidioides* spp.
Cortesía de Biól. Elva Bazán-Mora

Al microscopio se observan hifas ramificadas, septadas [15], hialinas que producen artroconidios de pared gruesa con forma de barril con dimensiones promedio de 2-4 μm x 3-6 μm alternando entre ellos, células vacías [15] o disyuntoras (Fig. 2). Los artroconidios libres pueden formar una nueva hifa o ser inhalados por algún mamífero, transformándose en la forma parasitaria.

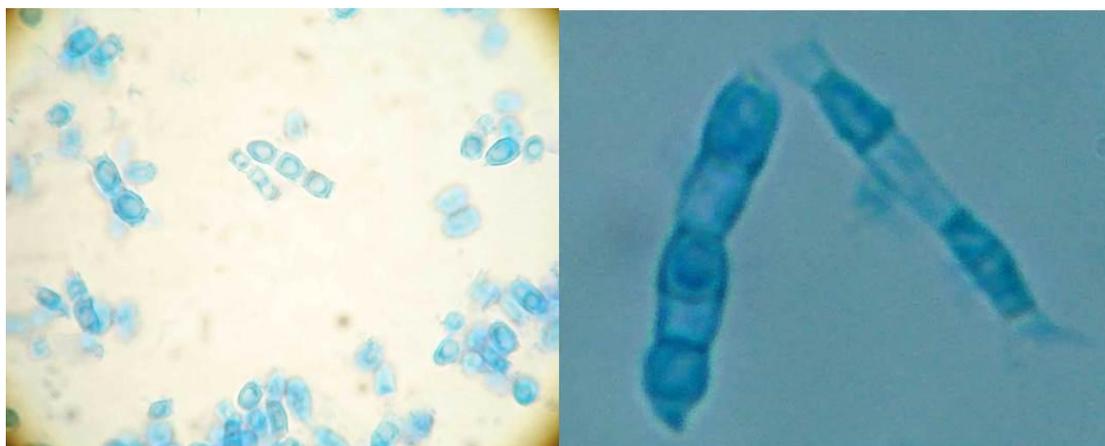


Figura 2. Arthroconidios de *Coccidioides* spp. Cortesía de Biól. Elva Bazán-Mora.

1.7.2.2 Características de la fase de esférula o parasitaria (37 °C)

La producción de esférulas *in vitro* requiere de cultivar el micelio del hongo en un medio especial, como lo es el medio líquido de Converse (mezcla de fosfatos, sulfatos, acetato de amonio y glucosa), incubando a 37-40°C en presencia de CO₂ a una concentración mayor del 20% [15]. La turbidez del medio confirma el desarrollo de las esférulas. En medios de cultivo sintéticos no se reportan las dimensiones de las esférulas pero su morfología es como se mencionará más adelante para tejidos.

Cuando los arthroconidios son inhalados por un mamífero, en presencia de células fagocíticas e incremento de CO₂, el hongo cambia de forma [22]. Primero el arthroconidio se ensancha hasta ser una forma esférica de aproximadamente 10-20 µm, esférula inmadura. La fase parasitaria aumenta hasta 20-30 µm de diámetro, y posteriormente el citoplasma de la esférula se segmenta por la aparición de trabéculas originadas a partir de la pared celular, y el núcleo va sufriendo divisiones, dando lugar a las endosporas cada una de las cuales miden de 1-4 µm cuando la esférula madura, llega a tener un diámetro de 50-70 µm y debido a la presión de las endosporas en

su interior la membrana y la pared de la esférula llegan a debilitarse y romperse para así liberar al medio externo las endosporas (Fig. 3) las cuales son atacadas por la inmunidad celular, pero las que sobreviven pueden dar origen a una nueva esférula cada una [22].

Por lo anterior en tejidos o fluidos corporales, se pueden observar esférulas, redondas, de pared gruesa, de 10 a 80 μm de diámetro, conteniendo endosporas que miden de 2-5 μm de diámetro [22].



Figura 3. Esférulas de diversos tamaños y en diferentes etapas de maduración. Imagen: Dr. Ramón Fernández. Hospital Gral. Dr. Manuel Gea González, En: Cátedra especial "Dr. Manuel Martínez Báez"

La identificación definitiva de un aislamiento de *Coccidioides* spp., requiere la demostración de la producción de esférulas *in vitro* (en el medio de Converse) o *in vivo* (inoculación experimental en animales).

1.7.3 Identificación molecular.

- Confirmación inmunológica:

Para identificar a *Coccidioides* spp. en cultivos se puede realizar la prueba de los exoantígenos. La fase micelial de *Coccidioides* spp. produce un exoantígeno termoestable y específico del hongo. Se obtiene un filtrado del cultivo del hongo del que se sospecha es *Coccidioides* spp. y se utiliza en una

inmunodifusión enfrentándolo contra un suero de referencia que contiene anticuerpos específicos contra el hongo, si la prueba es positiva, se confirma la identidad del hongo [22].

- Confirmación genómica:

Se reporta que *Coccidioides* spp. tienen un estimado de 4 cromosomas que se han logrado separar por el método de electroforesis en campo pulsado. El tamaño del genoma es de aproximadamente 28.9 Mb para *Coccidioides immitis* y 27 Mb para *Coccidioides posadasii* [23].

Análisis filogenéticos, usando técnicas como los polimorfismos obtenidos por nucleótidos simples, genes y micro satélites, han detallado los principales patrones *locus*-específicos de *C. immitis* [20].

1.7.4 Factores de virulencia.

Los artroconidios libres pueden formar una nueva hifa o ser inhalados por el hospedero alojándose en los alvéolos pulmonares activando la primera línea de defensa del sistema inmunológico (macrófagos, neutrófilos, células NK) [1] y dependiendo de su estado, la infección avanza o se elimina.

Los factores de virulencia son características que le permiten al patógeno causar daño al hospedero, asegurar su sobrevivencia y proliferación, aumentar su poder de penetración e invasión o evadir los mecanismos defensivos del hospedero [24].

Se han estudiado diversos factores de virulencia en *Coccidioides* spp. entre los cuales destacan los siguientes:

- La envoltura hidrofóbica que poseen los artroconidios, sirve como una protección pasiva contra la destrucción de las enzimas y productos oxidativos liberados por las células de defensa del hospedero y por lo tanto contribuyen a la sobrevivencia del patógeno [1].
- Capacidad de multiplicidad; una esférula libera una gran cantidad de endosporas, aproximadamente 500 y cada una de ellas es a su vez esférulas en potencia, lo cual ayuda a su proliferación [25].
- Sustancia mucilaginosa. Las endosporas al ser liberadas de la esférula tienen un tamaño pequeño que las hace fácilmente fagocitables, por lo cual salen envueltas en la sustancia mucilaginosa que actúa como protección contra los fagocitos del hospedero [1].
- El tamaño que llega a alcanzar la esférula (de hasta 80µm) es muy grande comparado con el de las células polimorfo nucleares (12-15 µm) por lo cual no se efectúa la fagocitosis.
- Se ha identificado la metaloproteinasa (MEP I) que ayuda al hongo a protegerse del sistema inmune, ya que degrada la glicoproteína de pared (SOWgp) de las endosporas, disminuyendo el reconocimiento de los determinantes antigénicos por los anticuerpos [1].
- Proteasas. *Coccidioides spp.* contiene serina proteasa en las paredes del micelio y esférulas, que sirve para promover la disolución de la pared de las esférulas maduras y permitir la salida de las endosporas. Además cuenta con proteínas de unión a estrógenos en citosol, lo cual puede representar un factor de virulencia [26]. La ureasa de las esférulas, enzimáticamente produce amoniaco que provoca que el medio se alcalinice, siendo ideal para el desarrollo del hongo [27].

1.8 Epidemiología.

Los casos de coccidioidomicosis se distribuyen principalmente en zonas semidesérticas, de clima árido o semiárido con precipitaciones pluviales entre 150-500 mm por año [2], suelos con alto contenido en sales y pH alcalino [14]; siendo sus temperaturas óptimas de 28°C en verano y 7°C en invierno, la variabilidad extrema es de 0°C a 45°C en un día [1].

Las zonas coccidioidogénicas mundialmente, se pueden clasificar en tres [1]:

- La zona del norte que es la principal, abarca la franja fronteriza de Estados Unidos con México. Aunque también hay estados en el centro de México como Michoacán, Guerrero, Colima, y Jalisco.
- Zona del centro del continente, se han encontrado focos aislados de coccidioidomicosis; presentes en Centroamérica y norte de Sudamérica.
- Una tercera zona involucra al norte de Argentina y parte de Paraguay.

La coccidioidomicosis se presenta en cualquier edad, pero debido a receptores hormonales con los que cuenta el hongo, el mayor número de casos se presentan en la edad adulta. Su presencia es mayor en hombres que en mujeres [14] y es en estas últimas, que se presenta más comúnmente reacción de hipersensibilidad como eritema nudoso. No hay predisposición racial [1].

La coccidioidomicosis se presenta en algunos grupos de trabajo con mayor frecuencia, comúnmente en los que están en contacto con la tierra como son campesinos, mineros, arqueólogos, militares, trabajadores de la construcción, etcétera [14].

Se han presentado casos de coccidioidomicosis en varios animales tanto domésticos como salvajes. Dentro de los domésticos se encuentran reportes en bovinos [28], cerdos [29], perros [5-7], caballos[30], llamas [31]. En especies no domésticas se ha identificado coccidioidomicosis, en chimpancés (*Pan troglodytes*) [4], armadillos[32], serpientes (*Pituophis melanoleucus affinis*) [33], delfines [34], nutrias [35], leones marinos [36] y leones [37].

1.9 Antecedentes mexicanos en coccidioidomicosis veterinaria.

En México el estudio de coccidioidomicosis ha dejado de lado la investigación veterinaria, teniendo escasos registros disponibles, dentro de los cuales se encuentran los siguientes trabajos:

En 1957 se tiene el primer reporte de coccidioidomicosis canina en México [38].

En 1978 Cervantes Olivares y cols., publican los resultados de dos estudios sobre la presencia de coccidioidomicosis en bovinos del estado de Sonora. El primer estudio fue una encuesta con coccidioidina mediante la prueba intradérmica (6.8% positivos de un total de 459 animales elegidos al azar) y el segundo, un estudio sobre los órganos de bovinos decomisados en un rastro tipo inspección federal de Hermosillo, por sospecharse de tuberculosis y que presentaban lesiones del tipo granulomatoso (de 3032 animales se obtuvieron 175 muestras, de las cuales en 77 se observaron esférulas con endosporas de *C. immitis*) [28]. (Cuadro 3)

En el mismo año, Velasco Castrejón y Campo-Nieto, realizaron una investigación de coccidioidomicosis porcina en el estado de Sinaloa. Usando

la técnica de contra inmunolectroforesis (CIE) trabajaron con 100 muestras de suero de cerdos de las cuales 12 resultaron positivas [29]. (Cuadro 3)

En el 2000 Martínez Neria, usó 76 sueros de perros provenientes de Sonora y Chihuahua y 108 del Distrito Federal, mediante las técnicas de reacción de fijación del complemento e inmunodifusión doble, identificó anticuerpos anti-*Coccidioides*. Obtuvo en la prueba de fijación de complemento 7 sueros positivos y 177 negativos [39]. (Cuadro 3)

En el cuadro 3 se resumen los trabajos mexicanos realizados en el área veterinaria para coccidioidomicosis y se incluye un trabajo de Arizona, EUA y uno de la provincia del Chaco, Argentina donde se realizaron pruebas para la identificación de anticuerpos anti-*Coccidioides* spp. en diversas especies animales.

Cuadro 3. Estudios de coccidioomicosis en animales.

Autor y año	Lugar	No. Animales	Prueba	Porcentaje de positividad
Cervantes, 1978 [28]	Sonora	459 bovinos	IDR	6.7
		175 bovinos	HP	44
Velasco, 1978 [29]	Sinaloa	100 porcinos	CIE	12
Castañón, 2010 [9]	Tijuana	55 perros	IDR	5.4
Canteros, 2010 [40]	Chaco, Argentina	89 perros	WB	1.1
Kirsch, 2012 [41]	Arizona, EUA	58 perros	ELISA	19
Martínez, 2012 [39]	Sonora y Chihuahua	76 perros	FC	3.9
	Distrito Federal	108 perros		3.7
	Sonora y Chihuahua	76 perros	IDD	10.5
	Distrito Federal	108 perros		4.6
Catalán, 2012 [42]	Baja California	40 roedores	IDD	0
			ELISA	10

IDR= Intradermorreacción

HP= Histopatología

IDD= Inmunodifusión doble

ELISA= Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

CIE= Contra inmunolectroforesis

WB= Western blot

FC= Fijación de Complemento

2 Planteamiento del problema.

Se ha reportado que los perros y otros animales son susceptibles a contraer la infección por *Coccidioides*; sin embargo, pocas son las investigaciones, que sobre el tema se han hecho. En México se tiene el registro de sólo dos estudios que intentan dar a conocer la prevalencia de infección de perros en zonas consideradas endémicas de esta micosis.

Esos antecedentes muestran frecuencias de infección, pero no concluyen cuál es el impacto epidemiológico. En consecuencia, es necesario elaborar una investigación que aclare ¿qué tan importante son los porcentajes de positividad obtenidos en las regiones muestreadas?, ¿los resultados obtenidos connotan una eminente endemidad de *Coccidioides* spp., en los lugares de origen de los perros muestreados? ¿Cuál es el significado epidemiológico que debe darse a los resultados obtenidos en este tipo de investigaciones?

3 Hipótesis.

Si Torreón Coahuila, es considerada como zona endémica de coccidioidomicosis entonces al detectar los anticuerpos anti-*Coccidioides* en sueros de perros, éstos presentarán títulos más altos que en aquellos sueros homólogos pero pertenecientes a zonas no endémicas.

4 Objetivos.

4.1 Objetivo general.

Identificar anticuerpos anti-*Coccidioides* spp. en suero de perros, de una zona endémica y otra no endémica de coccidioidomicosis, mediante las pruebas de inmunodifusión doble y contra inmunolectroforesis, para conocer la prevalencia de infección o primo-contacto por *Coccidioides* spp.

4.2 Objetivos particulares.

- Obtener muestras de suero de perros provenientes del estado de Coahuila y el Distrito Federal.
- Estandarizar la técnica de inmunodifusión doble para la detección de anticuerpos anti *Coccidioides* spp.
- Investigar si la técnica de contra inmunolectroforesis es una opción para la identificación de anticuerpos contra *Coccidioides* spp.
- Comparar la prevalencia de la zona endémica y no endémica.

5 Materiales y métodos.

5.1 Muestras

Se obtuvo un total de 77 sueros, 52 pertenecieron a perros habitantes de la ciudad de Torreón, Coah. (proporcionados por la Dra. Marisela del Rocío González de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila) y 25 de perros habitantes en el Distrito Federal (donados por la M. en C. Cecilia Quiroga Hernández, de la clínica veterinaria laboratorios Alhambra).

A partir de la vena cefálica, safena o yugular del perro, el veterinario a cargo obtuvo las muestras de sangre, la cual se dejó coagular, se centrifugó y removió el coagulo para obtener la máxima cantidad de suero posible.

Para cada muestra, fue llenada una "Ficha de Identificación" (Fig. 4) y los datos se capturaron en el programa Excel[®].

Cada uno de los sueros fue dividido en alícuotas de 100 μ l y fueron almacenados en congelación a -20°C hasta su uso.

Nombre de quién envía la muestra: _____

Dirección física, electrónica y teléfono de quién envía la muestra:

Fecha de la toma del suero: ____ / ____ / ____
DÍA MES AÑO

Lugar en dónde fue tomada la muestra: _____

Raza del perro: _____

Edad del perro: _____

Sexo del perro: M H

Peso del perro: _____

Breve historia clínica con signología (tos, problemas gástricos, problemas motores, etc)

Origen o tipo de perro (doméstico, callejero): _____

Lugar de procedencia del perro (clínica veterinaria, casa, estética, perrera municipal, calle, etc.):

Figura 4. Ficha de identificación para cada uno de los cánidos donantes de suero de Torreón, Coahuila.

5.2 Determinación de anticuerpos mediante inmunodifusión doble (IDD).

Se utilizaron como controles positivos, cinco sueros de pacientes humanos, diagnosticados con coccidioidomicosis por cultivo, proporcionados por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

La coccidioidina o antígeno metabólico, fue proporcionado por la Dra. Concepción Toriello (Unidad de Micología de la Facultad de Medicina, UNAM), identificado como el lote EH-657 L-5 y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

5.2.1 Fundamento de la técnica:

Las proteínas, anticuerpos y antígenos, pueden difundir en diferentes medios porosos como son los geles, en los cuales según su concentración de la matriz coloidal será su migración. En la IDD de Ouchterlony, al difundir tanto el antígeno soluble como los sueros con los anticuerpos específicos y encontrarse en concentraciones equivalente se insolubilizan formando líneas de precipitación entre los pozos de los reactivos (bandas o líneas de identidad). Si se enfrentan varios anticuerpos a un antígeno y observamos que la continuidad de las líneas de precipitación es absoluta, se considera que hay identidad completa entre los anticuerpos; pero si se cruzan las líneas significa que los anticuerpos son diferentes; la otra opción es que las líneas se confundan pero no sean totalmente continuas, lo que indica una identidad parcial [43] (Fig. 5).

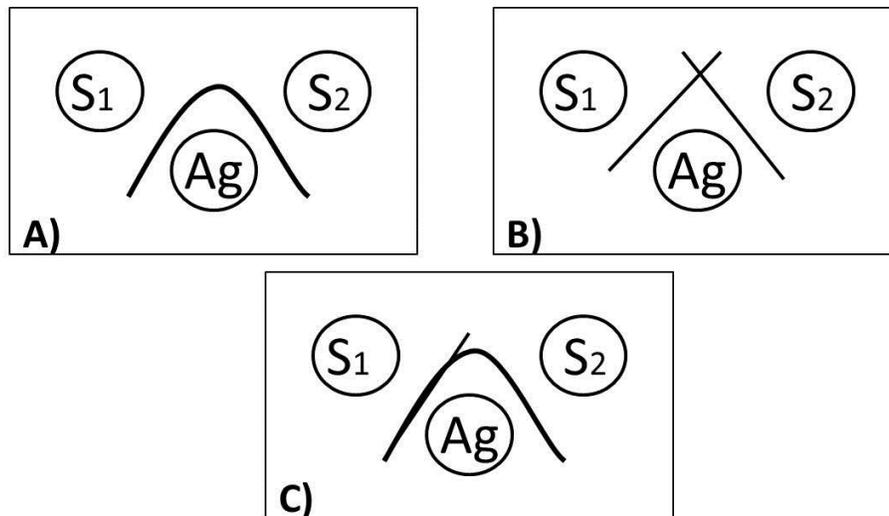


Figura 5. Interpretación de las líneas de identidad en inmunodifusión doble.
A) Identidad completa entre los anticuerpos de los sueros S1 y S2,
B) No identidad, anticuerpos diferentes entre S1 y S2,
C) Identidad parcial entre los anticuerpos de los sueros S1 y S2.

5.3 Estandarización de la inmunodifusión doble.

5.3.1 Prueba de coloides como soporte y concentración.

Se utilizó agarosa al 1%, agar purificado 1.5% y 3% para observar en cuál coloide y a qué concentración se lograban ver mejor las bandas de identidad. Se utilizaron tres sueros de humanos positivos y agua inyectable en los otros tres pozos periféricos y coccidioidina en el pozo central. La elección de los coloides y su concentración, estuvo determinada por la experiencia que otros autores han reportado [44].

La IDD –un pozo central y seis periféricos- fue efectuada en portaobjetos de 7.6 x 2.6 cm, sobre los cuales se agregaron 7 mL del coloide usado como soporte. Cada pozo con un diámetro de 5 mm y distancia de 3 mm entre cada uno de ellos (Fig. 6), medidas basadas en la técnica de diagnóstico para aspergilosis llevada a cabo en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

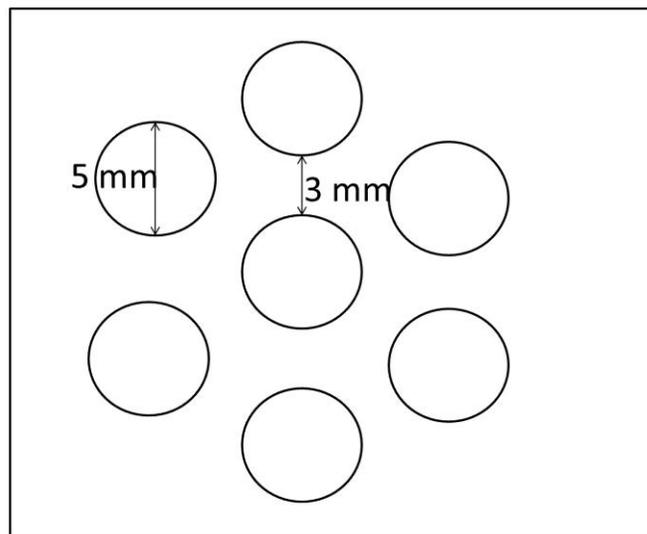


Figura 6. Esquema del sistema de IDD usado para estandarización.

5.3.2 Diluciones del antígeno, sueros controles positivos y sueros problema.

Una vez seleccionado el coloide adecuado y su concentración, se colocó el suero positivo en el pozo central y diluciones de la coccidioidina (1:2, 1:4, 1:8 y 1:16) en los pozos periféricos (Fig. 7), usando 70 μ l por pozo. Se realizaron las lecturas de la prueba a las 24 h (se llenaron nuevamente los pozos usando 20 μ l), 48 y 72 h, se observó hasta qué dilución la banda de identidad era evidente.

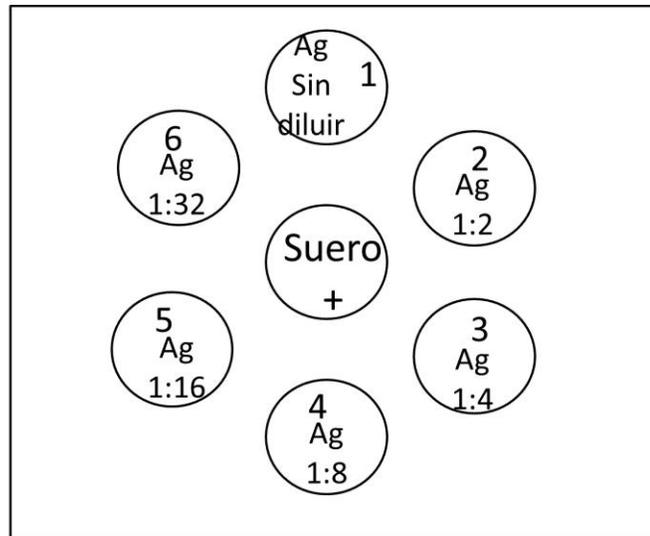


Figura 7. Esquema para estandarización de coccidioidina. Pozo central suero control positivo sin dilución. Pozo 1 Antígeno coccidioidina sin dilución. Del pozo 2-6 son diluciones de la coccidioidina.

Se realizó una tercera prueba en la cual la coccidioidina diluida se colocó en el pozo central y en los periféricos diluciones del suero control positivo (Fig. 8), después de 72 h se observa hasta qué dilución de los sueros se mostraron bandas de identidad.

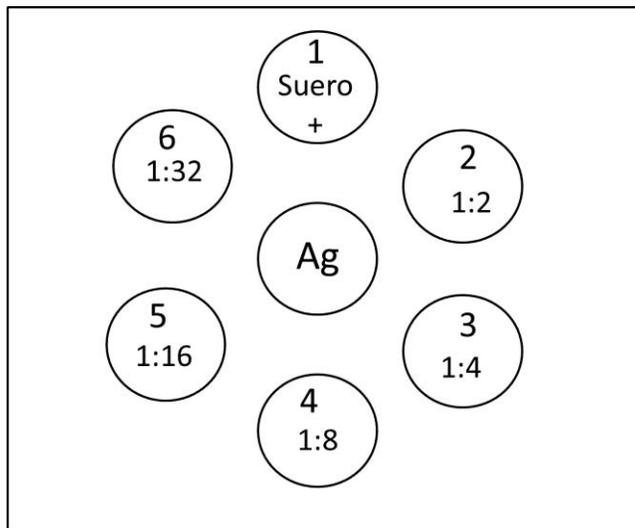


Figura 8. Esquema para estandarización del suero control positivo. Pozo central Antígeno sin dilución. Pozo 1 Suero control positivo sin dilución. Del pozo 2-6 son diluciones del suero control positivo.

Los geles se lavaron, colocando el portaobjetos en amortiguador salino de fosfatos pH 7.2 por 48 h (realizando un cambio a las 24 h por solución limpia) y posteriormente en agua destilada por 24 h. Se tiñeron los geles con negro de amido a 0.1% por 5 min, se destiñeron con una solución de metanol, ácido acético glacial, agua 5:1:4 respectivamente, se colocaron con la solución en agitador orbital de 3 a 4 ciclos de 10 min a velocidad de 80 rpm. Para secarlos se retiró el portaobjetos y el gel se colocó entre papel celofán en el cual se dejaron 48 h para absorber al máximo la humedad.

5.3.3 Pruebas cruzadas

Para descartar reacciones cruzadas en la técnica de inmunodifusión doble se realizaron pruebas con sueros de pacientes humanos y no humanos con micosis como histoplasmosis y aspergilosis, así como pruebas con antígeno de *Aspergillus* sp y coccidioidina. Los sistemas utilizados se muestran en las figuras de la 9 a la 11.

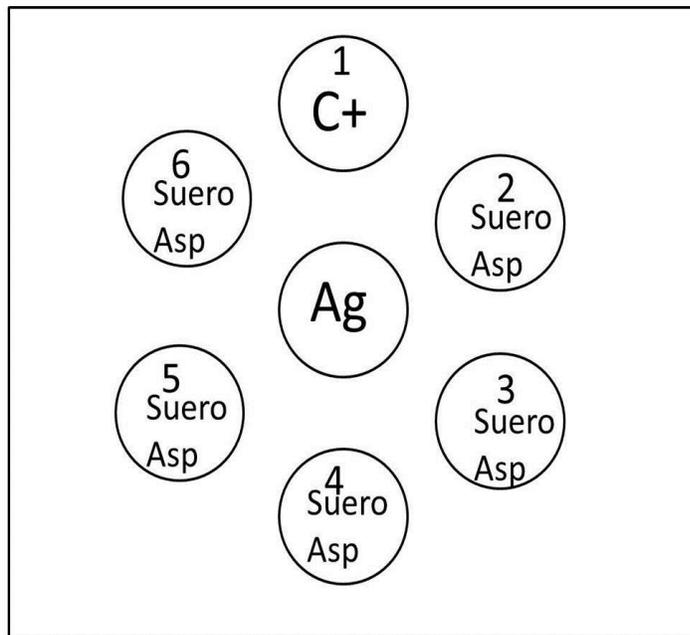


Figura 9. Esquema de reacción cruzada. Pozo central coccidioidina, pozo 1 suero de humano control positivo para *Coccidioides* spp., pozos 2-6 sueros de delfín diagnosticados con aspergilosis.

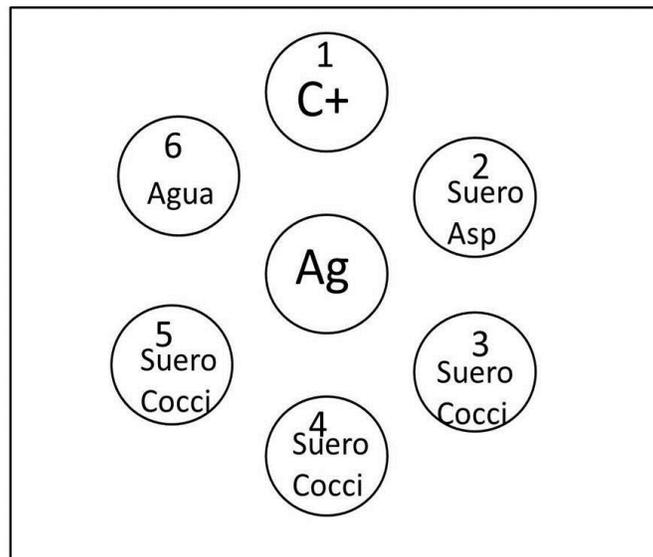


Figura 10. Esquema de reacción cruzada. Pozo central antígeno de *Aspergillus* sp, pozo 1 suero de humano control positivo para aspergilosis, pozos 2 suero de delfín diagnosticados con aspergilosis, pozos 3-5 sueros de humano controles positivos para coccidioidomicosis, pozo 6 agua..

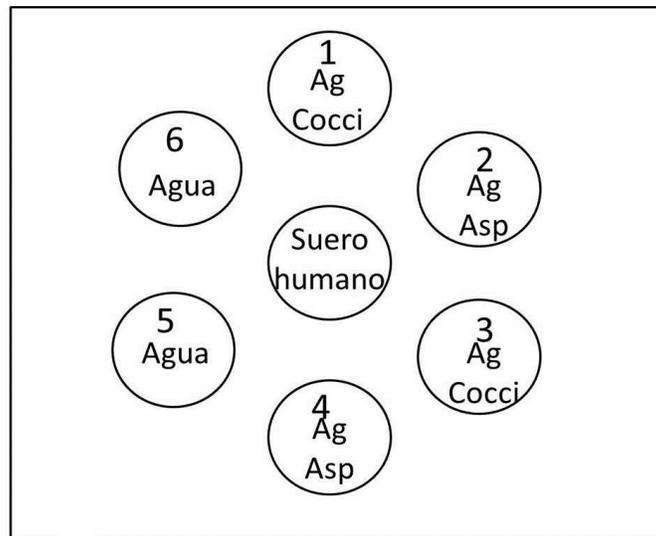


Figura 11. Esquema de reacción cruzada. Pozo central suero de humano diagnosticado con histoplasmosis, pozos 1 y 3 antígeno coccidioidina dilución 1:2, pozos 2 y 4 antígeno de *Aspergillus* sp, pozos 5 y 6 agua.

5.4 Pruebas definitivas.

Una vez que se determinaron las condiciones para el funcionamiento óptimo del sistema, se analizaron las muestras de sueros caninos.

En el siguiente diagrama se muestra cómo fueron distribuidos los reactivos en el sistema (Fig. 12):

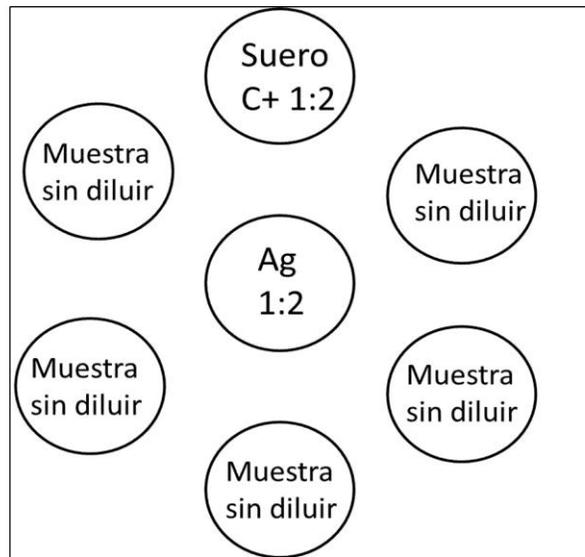


Figura 12. Esquema para muestras de sueros de perro, IDD.

Los pozos se llenaron con 80 μL (con antígeno o suero según correspondiera) se colocó en cámara húmeda, después de 2-3 h se rellenaron hasta el borde (en promedio 25 μL) haciéndose las lecturas a las 24, 48 y 72 h. Posteriormente se lavaron y tiñeron.

Para las muestras que resultaron positivas, se hizo una modificación al modelo con agar purificado al 1.5% pero con solo 2 perforaciones de 5 mm cada una y una distancia de 6 mm entre ellas (Fig. 13), [44] con el fin de revisar si en las pruebas positivas había más de un sistema Ag-Ac. En un pozo fue colocado el antígeno y en otro el suero sin diluir. Se llenaron los pozos a las 2 h y después a las 24 h. Se realizaron lecturas a las 24, 48, 72 y 96 h se lavaron, tiñeron y secaron de igual manera que los otros sistemas.

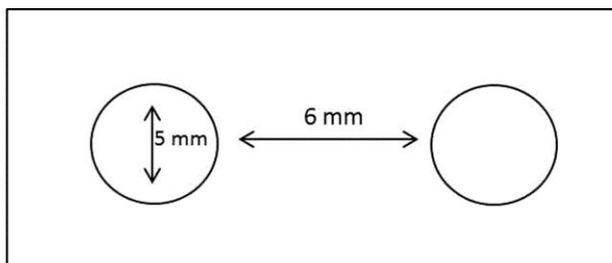


Figura 13. Sistema de dos pozos para muestras positivas.

5.5 Contra inmunolectroforesis (CIE).

Se colocaron 7 portaobjetos de 7.6 x 2.6 cm a lo largo de una placa de vidrio, se vertió 40 ml de agarosa al 1% con amortiguador Veronal pH 8.2 (ver anexo) y se refrigeró por 10 min a 4°C. Se perforó el gel de cada portaobjetos, por ende pozos en 6 filas y 3 columnas, se llenaron como se muestra en la figura 14.

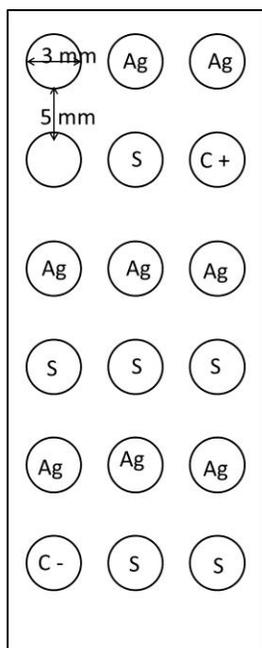


Figura 14. Esquema para contra inmunolectroforesis. Ag = coccidioidina dilución 1:2; S = sueros problema sin diluciones.

Se llenaron los pozos con 15 μ l de suero o coccidioidina 1:2 según correspondiera, se colocó la placa de plástico con los 7 portaobjetos en la cámara para CIE con amortiguador Veronal pH 8.2 usando un papel filtro húmedo para mantener el contacto entre el gel y el medio con electrolitos. Las condiciones en que se corrieron los geles fueron 44 mA por 50 min. Al término el gel se colocó por 10 min en refrigeración a 4°C, después se cortaron con un bisturí por el contorno cada uno de los portaobjetos y se separaron. Se lavaron los geles con PBS por 24 h y posteriormente con agua desionizada por 24 h más, después se secaron colocándolos en una incubadora a 37°C por 24 h hasta que quedan fijados al portaobjetos y se tiñeron cubriéndolos con negro de amido al 1% por 5 min, y se destiñeron con la misma solución que para la inmunodifusión doble.

6 Resultados.

- Identificación de las muestras.

Los datos de los sueros provenientes de perros de Coahuila, son mostrados en el cuadro 4. Las muestras de la 1 a 40, fueron tomadas en Albergue Corazón Canino, las restantes solo refieren Torreón, sin mayor especificación.

No se pudieron obtener datos de los perros provenientes del DF, ya que la clínica veterinaria a cargo no permitió el acceso a los historiales médicos de los perros.

Los datos de los sueros humanos usados como controles positivos se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 4. Datos de sueros de Coahuila.

ID	Raza	Edad	Sexo	Peso (kg)	Origen	Procedencia del perro	Con cuadro clínico
1	Criollo	5 a	H	14	Callejero	Torreón	No
2	Criollo	5 a	H	7	Callejero	Torreón	No
3	Criollo	7 m	H	12	Callejero	Torreón	No
4	Criollo	2 a	M	6	Callejero	Torreón	No
5	Criollo	7 m	H	9	Callejero	Torreón	No
6	Criollo	1.5 m	H	15	Callejero	Torreón	No
7	Criollo	1 a	M	11	Callejero	Torreón	No
8	Criollo	2 a	H	9	Callejero	Torreón	No
9	Criollo	6 a	H	10	Callejero	Torreón	No
10	Criollo	4 a	H	14	Callejero	Torreón	No
11	Criollo	6 a	H	8	Callejero	Torreón	No
12	Criollo	4 a	H	15	Callejero	Torreón	No
13	Criollo	2 a	H	13.5	Callejero	Torreón	No
14	Criollo	6 a	H	13	Callejero	Torreón	No
15	Criollo	1 a	M	10	Callejero	Torreón	No
16	Criollo	4 a	M	12	Callejero	Torreón	No
17	Criollo	4 a	H	12	Callejero	Torreón	No
18	Criollo	5 a	H	10	Callejero	Torreón	No

19	Criollo	2 a	H	9	Callejero	Torreón	No
20	Criollo	2 a	H	7	Callejero	Torreón	No
21	Criollo	5 m	M	7	Callejero	Torreón	No
22	Criollo	6 m	M	7	Callejero	Torreón	No
23	Criollo	9 m	H	7	Callejero	Torreón	Problemas respiratorios
24	Criollo	5 m	M	6	Callejero	Torreón	No
25	Criollo	5 m	M	5	Callejero	Torreón	No
26	Criollo	4 m	M	5	Callejero	Torreón	No
27	Criollo	5 m	M	6	Callejero	Torreón	No
28	Criollo	5 a	H	11	Callejero	Torreón	No
29	Criollo	5 a	H	8.5	Callejero	Torreón	No
30	Criollo	6 a	H	10	Callejero	Torreón	No
31	Criollo	5 a	H	9	Callejero	Torreón	No
32	Criollo	6 a	H	8	Callejero	Torreón	No
33	Criollo	9 m	H	6	Callejero	Torreón	No
34	Criollo	7 m	M	5	Callejero	Torreón	No
35	Criollo	6 m	M	5	Callejero	Torreón	No
36	Criollo	6 m	H	9	Callejero	Torreón	No
37	Criollo	6 a	H	13	Callejero	Torreón	No
38	Criollo	1.5 a	H	3	Callejero	Torreón	No

39	Criollo	1.5 a	H	4.5	Callejero	Torreón	No
40	Criollo	-	H	7	Callejero	Torreón	No
41	Dogo de Burdeos	1.8 a	H	40	Doméstico	Matamoros	Vómito
42	Sharpei	3 a	H	15	Doméstico	Matamoros	Insuf. pancreático exócrina
43	Husky Siberiano	13 a	H	25	Doméstico	Matamoros	Artritis, debilidad
44	Pastor alemán	1.5 a	M	35	Doméstico	Matamoros	No
45	French Poodle	6 a	M	12	Doméstico	Matamoros	No
46	Criollo	5 a	M	17	Callejero	Matamoros	No
47	-	-	M	-	-	-	-
48	-	-	M	-	-	-	-
49	Bull dog inglés	1 a	M	16	Doméstico	Torreón	Lactando
50	-	1 a	M	9	Doméstico	Matamoros	No
51	-	7 a	H	5	Doméstico	Matamoros	No
52	Weimaraner	1.3 m	-	26	Doméstico	Matamoros	No

H=Hembra M=Macho

Perros adultos mayores a un año.

a= años m=meses

Cuadro 5. Sueros humanos controles positivos.

ID	Iniciales	Sexo
59/07	OHN	M
52/08	E	M
01/03	VRC	M
07/02	DHG	M
20/05 *	VBM	M

*Paciente VIH positivo

M= Masculino

- Estandarización de IDD.

La coccidioidina utilizada tuvo una concentración de proteínas por el método de Bradford de 3.56 mg/ml

Los resultados de coloides y su concentración, mostraron que las bandas de precipitación se observaban mejor usando agar purificado al 1.5% (señaladas con flechas en figura 15).

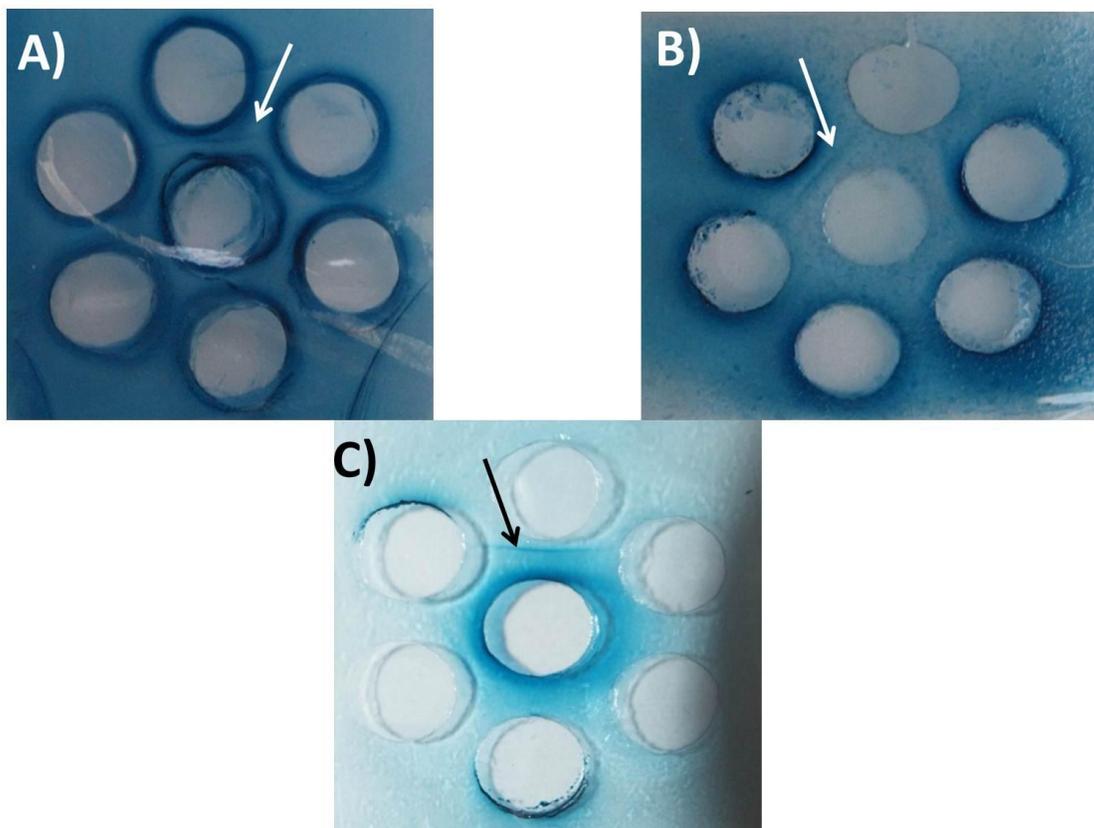


Figura 15. A) Agarosa al 1 %, B) Agar purificado al 3 %, C) Agar purificado al 1.5 %

En la prueba de estandarización del antígeno (coccidioidina), se observó que la banda de identidad era evidente hasta la dilución de coccidioidina 1:2. Mientras que en la prueba para saber la dilución del control positivo adecuada, después de las 72 h se observaron bandas de identidad francas hasta 1:2 sin teñir y bandas tenues hasta dilución 1:4, posterior a la tinción. Se decidió usar el control positivo en dilución 1:2 y coccidioidina 1:2. En resumen, las condiciones de estandarización de la IDD fueron:

- 7 ml de agar purificado al 1.5% en portaobjetos de 7.6 X 2.6 cm
- Llenado de los pozos con 80 µl de antígeno o suero según corresponda
- En caso necesario, volver a llenar los pozos a las 24 h con 20 µl de antígeno o suero según corresponda

– Reacciones cruzadas.

La evaluación de especificidad del antígeno coccidioidina con sueros de otros animales con anticuerpos anti-*Aspergillus* y anti-*Histoplasma*, dieron pruebas negativas.

- Inmunodifusión doble y contra inmunoelectroforesis.

De los 77 sueros de perros analizados, el cuadro 6 muestra los resultados obtenidos.

Cuadro 6. Resultados de las muestras

Origen de las muestras	Positivos	Negativos	Suma
Torreón	1	51	52
Distrito Federal	0	25	25
		Total	77

El suero positivo número 29 de Torreón (Fig. 16), sus datos nos indican que es un perro de 5 años de edad, de origen callejero y sin signos de enfermedad pulmonar u ósea.

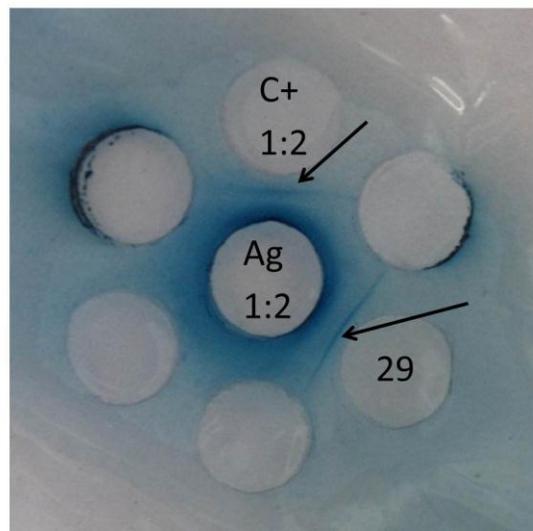


Figura 16. Suero 29 y control positivo en IDD.

Cuando el suero positivo, se probó en la modalidad de 2 pozos, pudieron verse dos bandas definidas, aunque una más tenue que la otra, mostrando la presencia de dos sistemas Ag-Ac. (Cuadro 7), (Fig. 17).

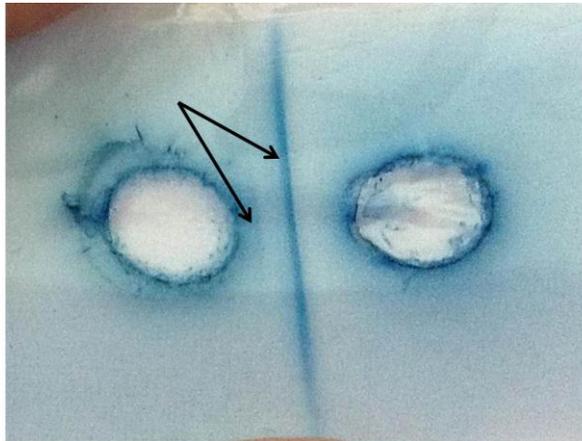


Figura 17. Sistema de dos pozos para suero positivo.
 Dos bandas (señaladas con flechas).

Cuadro 7. Resultados de IDD variando la distancia entre los pozos.

Distancia entre pozos	Control Positivo	Suero 29 Torreón
3mm	1 banda	1 banda
6mm	2 bandas	2 bandas

En la técnica de CIE, nuevamente el suero 29 de Torreón fue positivo presentando más de una banda de identidad en el gel.

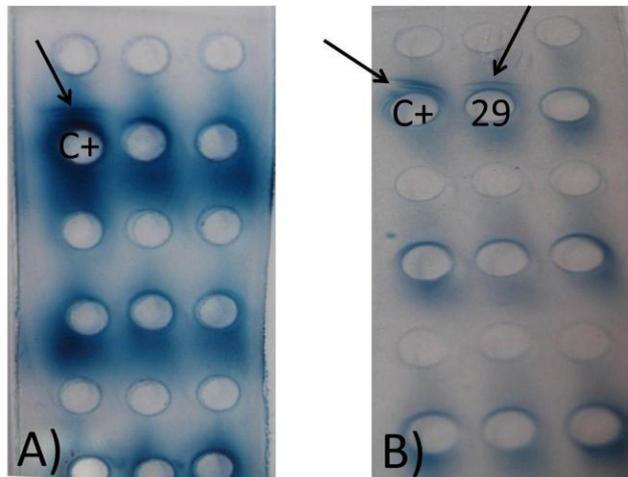


Figura 18. Contrainmuno electroforesis, en el primer pozo se observan bandas del control positivo dilución 1:2;
A) no hay sueros problema positivos;
B) Bandas observadas en el pozo 2 , suero 29 de Torreón.

El porcentaje de positividad para los sueros de Torreón fue de 1.92%. En los datos obtenidos, al aplicar la prueba de χ^2 , con un nivel de significancia de 0.05 el resultado obtenido fue estadísticamente no significativo.

7. Análisis de resultados.

Se pudo obtener sueros de perros de zonas endémicas y no endémicas de coccidioidomycosis, desafortunadamente el número de muestras provenientes del Distrito Federal no pudieron igualarse en número a las de Torreón, debido a la falta de acceso a los animales en perreras, veterinarias y particulares. Así mismo las fichas de identificación de cada uno de los perros del D.F. no pudieron ser llenadas entre otras cosas por un problema de tipo logístico: la clínica veterinaria que nos proporcionó los sueros nos informó que para el acceso a los datos e historias clínicas de los perros era necesaria la autorización de los dueños de los animales, para lo cual se tendría que buscar comunicación con ellos; sin embargo, la clínica no puede brindar los datos personales como teléfono y nombre de los dueños, por seguridad.

La técnica de inmunodifusión doble, fue exitosamente estandarizada como técnica específica para la identificación de anticuerpos anti-*Coccidioides*; quedando registradas las condiciones para su reproducibilidad y en especial para brindar apoyo diagnóstico.

Ambas técnicas, IDD y CIE mostraron resultados exactamente iguales en la identificación de anticuerpos anti-*Coccidioides* spp., en los sueros de perros analizados; sin embargo, por la experiencia obtenida, se observó que la técnica de CIE tiene ciertas ventajas sobre el uso de la IDD: se utiliza una menor cantidad de reactivos, se puede analizar un mayor número de muestras simultáneamente y el registro de resultados se obtiene en máximo 1 h.

En la modalidad de IDD de dos pozos, pudo observarse más de un sistema antígeno-anticuerpo, lo cual demuestra la presencia de varios epítopes que son reconocidos por los anticuerpos anti-*Coccidioides*. De manera homóloga tanto la IDD con dos pozos como la CIE, dieron consistentemente la presencia de dos bandas de precipitación como reconocimiento Ag-Ac.

A pesar de que las técnicas serológicas usadas pudieron demostrar la presencia de anticuerpos anti-*Coccidioides*, la prevalencia de 1.92% obtenida para los sueros provenientes de la zona endémica de Torreón, no fue la esperada.

Según el análisis estadístico, los resultados obtenidos evidencian en este estudio que no hay diferencia en los sueros de perros pertenecientes a zona endémica o no endémica.

Comparando nuestros resultados, con otros estudios similares (cuadro 3) podemos observar que los diferentes autores muestran la prevalencia de infección en porcentajes; sin embargo, no hay referencia de un estudio estadístico que confirme que esos porcentajes obtenidos son significativos epidemiológicamente. Quizá el resultado más significativo fue el obtenido por Cervantes y cols., en 1978 donde estimó 44% de infección por *Coccidioides* spp., en 175 vacas en Sonora; en el resto de los estudios se muestran porcentajes de infección por debajo del 19%. Independientemente de la prevalencia obtenida, al analizar el cuadro por sí solo, es difícil concluir cuál es la tasa o porcentaje a partir de los cuales puede definirse el impacto epidemiológico de esos resultados.

8. Conclusiones.

La prueba de IDD estandarizada demostró ser específica y confiable, por lo que efectuada en las condiciones descritas, puede recomendarse como un método para detectar primo-contacto y apoyar el diagnóstico en animales que ya tienen la infección. Los ensayos efectuados demostraron que no sólo identifican anticuerpos anti-*Coccidioides* spp. en suero de perros, sino también bajo la sospecha de cualquier otra micosis utilizando el antígeno fúngico específico; siguiendo los pasos de la estandarización descritos en este trabajo para así asegurar que las condiciones son las adecuadas.

De acuerdo a los antecedentes, es la primera vez que se reporta la contra inmunolectroforesis para la identificación de anticuerpos anti-*Coccidioides* spp. en suero de perros. Aunque el objetivo de este trabajo no fue estandarizar ésta técnica, se demostró que tiene una confiabilidad igual a la IDD, ya que los resultados fueron iguales con ambas técnicas.

Aunque en nuestro estudio se obtuvieron mayor cantidad de muestras positivas de Torreón (1.9%) que en las de Distrito Federal (0%), la prueba de χ^2 nos indica que la diferencia no es significativa. Por lo que se concluye que los perros del área endémica de coccidioidomicosis muestreados, no necesariamente tienen títulos de anticuerpos anti-*Coccidioides* más altos que aquellos perros que viven en zonas no endémicas, como es el Distrito Federal.

Las investigaciones acerca de la epidemiología de la coccidioidomicosis en México, han comprendido: 1) estudios ambientales en los hábitats considerados como reservorios del hongo en la naturaleza, 2) investigación

sobre los diversos cuadros clínicos de la coccidioidomicosis en humanos y 3) el análisis de la prevalencia de primo-contacto en humanos medida por pruebas cutáneas con los antígenos del hongo. Para complementar los estudios de epidemiología y dar una aproximación a los criterios de endemidad la presente investigación ha demostrado que la prevalencia de primo-contacto por *Coccidioides* spp., en perros es menor de lo que suponen micólogos médicos dedicados al ámbito de la medicina humana.

La baja frecuencia de sueros positivos encontrados en Torreón pudo deberse a: 1) El tipo de antígeno utilizado (podría utilizarse un antígeno menos "crudo"), 2) Las técnicas usadas para la identificación de anticuerpos (IDD y CIE son específicas pero quizá poco sensibles), 3) La inmunidad propia de los perros y 4) La procedencia de los perros, ya que si *Coccidioides* spp., se encuentra como saprobio común en el suelo, pero los perros provienen de ciudad o lugares pavimentados, en donde los perros no hayan tenido contacto previo con el hongo y en consecuencia la posibilidad de primo-contacto es baja en estos ambientes urbanizados. Es necesario explorar todas esas posibilidades para mejorar los estudios epidemiológicos y obtener mayor conocimiento de ésta enfermedad dentro del área veterinaria.

9. Perspectivas a futuro.

Purificar el antígeno coccidioidina para poder aplicarlo en pruebas serológicas más sensibles, sin que esto afecte su especificidad.

Estandarizar con ese antígeno, técnicas serológicas más sensibles como por ejemplo ELISA, para poder identificar concentraciones bajas de anticuerpos anti-*Coccidioides*.

Aumentar el número de zonas endémicas a estudiar, el número de muestras y expandir la investigación de prevalencia en animales silvestres de las zonas endémicas.

10. Referencias.

1. Arenas R. Micología médica ilustrada. Sección 4 Micosis sistémicas. Coccidioidomicosis. Ed 4. Editorial Mc Graw Hill. México, DF 2011 p.179-91
2. Bonifaz A. Micología médica básica. Parte 4 Micosis profundas o sistémicas. Capítulo 17 Coccidioidomicosis. Ed 3. Editorial Mc Graw Hill. China 2010 p. 223-39
3. Jores MH, Bushueff BD. Pulmonary coccidioidomicosis. Clinical and roentgenological observations in residual lesions. CHEST 1952; 22(1):55-67
4. Herrin KV, Miranda AA, Loebenberg DD. Posaconazole therapy for systemic coccidioidomicosis in a chimpanzee (*Pan troglodytes*): a case report. Mykosen 2005; 48(6):447-52
5. Iglesias CJ, Suárez AR, Lee W, Rivas MC, Davel G, Canteros CE. Coccidioidomicosis diseminada en un canino. Rev Argent Microbiol 2008; 40:109
6. Ramírez RR, Frausto RJ, Andrade ME, Nevárez GA. Coccidioidomicosis diseminada en el perro. Presentación de un caso. Vet Mex 1991: 22(2): 181-4
7. Rubensohn M, Stack S. Coccidioidomycosis in a dog. Can Vet J 2003; 44:159-60
8. Gutierrez Pabello JA. Inmunología veterinaria. Capítulo 14 Respuesta inmune contra hongos. . Ed. El Manual Moderno. México 2010; p.170-1
9. Castañón OL, Laniado LR, Toriello C, Muñoz HB, Aroch CA, Aranda UI, Flores SM, González MM, Hernández NA, Manjarrez ZM, Miranda MS, Palma G, Pérez MA. Clinical comparasion of two Mexican coccidioidins. Mycopathologia 2010; 169:427-30

10. Soltys MA, Smith GS. Systemic mycoses in dogs and cats. *Can Vet J* 1971; 2(10):191-99
11. Hernández SM, Zarzoso FS, Navarro GM, Santos SM, González MF, Saavedra LJ. Osteomielitis y artritis séptica. *Protocolos de infectología. Asociación Española de Pediatría. Capítulo 20.* 2011. Ed 3. Editorial ERGON. p.205-20
12. May DA, Disler DG. Case 50: Primary coccidioidal sinovitis of the knee. *Radiology* 2002; 224(3): 665-8
13. Erly WK, Bellon RJ, Seeger JF, Carmody RF. MR Imaging of acute coccidioidal meningitis. *ASNR* 1999; 20:509-14
14. Moroyoqui NLA, Figueroa SSR. Coccidioidomycosis. *Med Int Mex* 2008; 24(2):125-41
15. Larone D. Medically important fungi. A guide to identification. Parte 2 Hyaline hiphomycetes. *Coccidioides* spp. Ed 5. Editorial ASM PRESS. Washington, DC 2011: 272-73
16. Hernández Nevárez JA. Caracterización del antígeno coccidioidina para intradermorreacción. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, México D.F. 2009
17. Barquero FL. Intradermorreacciones y su aplicación. (Revisión bibliográfica). *Rev Med Costa Rica y Centroamérica* 2009; 66(587):85-8
18. Guzmán Fierro XY. *Coccidioides immitis* y su relación con pacientes portadores de VIH. Capítulo 5 Métodos diagnósticos para *Coccidioides immitis*. Tesis. Universidad de Sonora. Vía web, consultada el 25 de Junio del 2013. http://www.bibliotecadigital.uson.mx/bdg_tesisIndice.aspx?tesis=3933
19. Ampel NM. The diagnosis of coccidioidomycosis. *Medicine reports* 2010; 2(2):1-4

20. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 2002; 94(1):73-84
21. NCBI Taxonomy Browser. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5501&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> Consultado en mayo 2013.
22. Pappagianis D, Zimmer BL. Serology of coccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3(3): 247-68
23. Sharpton TJ, Stajich JE, Rounsley SD, Gardner MJ, Wortman JR, Jordar VS, Maiti R, Kodira CD, Neafsey DE, Zeng Q, Hung CY, McMahan C, Muszewska A, Grynberg M, Mandel MA, Kellner EM, Barker BM, Galgani JN, Orbach MJ, Kirkland TN, Cole GT, Henn MR, Birren BW, Taylor JW. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res* 2009; 19:1722-31
24. Romero CR. Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Unidad 4 Bacteriología. Ed 3. Editorial Panamericana. Impreso en México, DF 2007 p.671
25. Hung CY, Yu JJ, Seshan KR, Reichard U, Cole GT. A parasitic phase-specific adhesion of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. *Infect Immun* 2002; 70:3443-56
26. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9(4): 469-88
27. Mirbod-Donovan F, Schaller R, Hung CY, Xue J, Reichard U, Cole GT. Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. *Infect Immun* 2006; 74(1): 504-15

28. Cervantes O, Solórzano S, Pijoan A. Presencia de coccidioidomicosis en bovinos del estado de Sonora. Rev Lat Amer Microbiol 1978; 20: 247-49
29. Velasco C, Campos N. Estudio serológico de la coccidioidomicosis porcina en el estado de Sinaloa (México). Bol Soc Mex Mic 1978; 12: 131-35
30. Ziemer EL, Pappagianis D, Madigan JE, Mansmann RA, Hoffman KD. Coccidioidomycosis in horses: 15 cases (1975-1984). J Am Vet Med Assoc 1992; 201(6): 910-6
31. Fowler ME, Pappagianis D, Ingram I. Coccidioidomycosis in llamas in the United States: 19 cases (1981-1989). J Am Vet Med Assoc 1992; 201(10): 1609-14
32. Eulalio KD, de Macedo RL, Cavalcanti MA, Martins LM, Lazéra MS, Wanke B. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí; northeast Brazil. Mycopathologia 2001; 149(2): 57-61
33. Timm KI, Sonn RJ, Hultgren BD. Coccidioidomycosis in a Sonora gopher snake, *Pituophis melanoleucus affinis*. J Med Vet Mycol 1998; 26(2): 101-4
34. Reidarson TH, Griner LA, Pappagianis D, McBain J. Coccidioidomycosis in a Bottlenose dolphin. J Wildlife Dis 1998; 34 (3): 629-31
35. Cornell LH, Osborn KG, Antrim JE, Simpson JG. Coccidioidomycosis in a California sea otter (*Enhydra lutris*). J Wildlife Dis 1979; 15(3):373-8
36. Fauquier DA, Guillard FMD, Trupkiewicz JG, Spraker TR, Lowenstine LJ. Coccidioidomycosis in free-living California sea lions (*Zalophus californianus*) in a central California. J Wildlife Dis 1996; 32(4):707-10
37. Adaska JM. Peritoneal coccidioidomicosis in a mountain lion in California. J Wildlife Dis 1999; 35(1): 75-7

38. Schnaas G, González O, Martínez B. Coccidioidomycosis natural en el perro. *Ciencias Veterinarias* 1957; 2(4): 417-21
39. Martínez Neria JC. Estandarización de la prueba de fijación de complemento directa para determinar la presencia de anticuerpos contra *Coccidioides* spp en perros de la zona endémica de México. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México, D.F. 2012
40. Canteros CE, Madariaga MJ, Lee W, Rivas MC, Davel G, Iachini R. Agentes de micosis endémicas en un área rural de Argentina: estudio seroepidemiológico en perros *Rev Iberoam Micol* 2010; 27(1): 14-9
41. Kirsch EJ, Greene RT, Prah A, Rubin SI, Sykes JE, Durkin MM, Wheath LJ. Evaluation of *Coccidioides* antigen detection in dogs with coccidioidomycosis. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19(3): 343-5
42. Catalán Dibene J. Caracterización de la comunidad de roedores en el Valle de las Palmas como portadores del agente causal de la coccidioidomycosis. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada B.C. 2012
43. Tizard IR. Inmunología veterinaria. Capítulo 8 Identificación y medición de la respuesta inmune humoral. Ed 1. Editorial Interamericana. México 1982 p118-55
44. Cervantes OR. Studies on antigens of *Aspergillus*: their use in veterinary micology. Tesis de doctorado. 1983, University of Glasgow.

11. Soluciones y reactivos

- Regulador salino de fosfatos (PBS) pH 7.2

Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 g
Hidrógeno de fosfato potásico (K_2HPO_4)	1.21 g
Dihidrógeno de fosfato potásico (K_2HPO_4)	0.34 g
Agua desionizada c.b.p.	1000 mL

Suspender los reactivos en 900 ml de agua, ajustar el pH 7.2 y llevar a volumen de 1000 ml.

- Agar purificado 3%

Agar purificado	3.0 g
Azida de sodio	0.1 g
Regulador salino de fosfatos (PBS)	50 mL
Agua desionizada	50 mL

Disolver el agar purificado en agua desionizada, añadir PBS y azida de sodio, calentar hasta ebullición.

- Agar purificado 1.5%

Agar purificado	1.5 g
Azida de sodio	0.1 g
Regulador salino de fosfatos (PBS)	50 mL
Agua desionizada	50 mL

Disolver el agar purificado en agua desionizada, añadir PBS y azida de sodio, calentar hasta ebullición.

- Agarosa al 1% para inmunodifusión doble.

Agarosa	1.0 g
Azida de sodio	0.1 g
Regulador salino de fosfatos (PBS)	50 mL
Agua desionizada	50 mL

Disolver la agarosa en agua desionizada, añadir PBS y azida de sodio, calentar hasta ebullición.

- Colorante Negro de amido 0.1%

Negro de amido	1.0 g
Agua destilada	100 mL

- Solución decolorante (5:1:4) 1L

Metanol	500 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Agua	400 mL

- Amortiguador Veronal pH 8.2

Ácido barbitúrico dietílico (Barbitona)	3.32 g
Barbitona dietil de sodio (Barbiturato)	25.52 g
Azida de sodio	2.0 g
Agua desionizada	2000 ml

La barbitona se disuelve en agua desionizada caliente, el barbiturato se disuelve en la solución anterior, se ajusta el pH 8.2 y se lleva a un volumen de 2000 ml, se adiciona azida de sodio para preservar.

- Agarosa 1% para CIE

Amortiguador Veronal pH 8.2 50 ml

Agua desionizada 50 ml

Agarosa 1.0 g

La agarosa se disuelve en el agua y el amortiguador, calentar hasta ebullición.