



11
200

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN

**“IDENTIFICACION DE ANTIGENOS INMUNODOMINANTES EN CEPAS
DE *Dermatophilus congolensis* AISLADAS A PARTIR DE MUESTRAS
CLINICAS DE OVINOS CON DERMATOFILOSIS”**

PROYECTO DE INVESTIGACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

LAURA CANO ORTIZ

ASESORES: M. EN C. ENRIQUE SALAS TELLEZ
QFB. ALMA LUCILA NUÑEZ DEL ARCO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO DE MEX

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

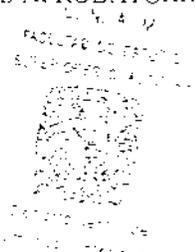
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

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

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

El Proyecto de Investigación: " Identificación de antígenos inmunodominantes en cepas de Dermatophilus congolensis aisladas a partir de muestras clínicas de Ovinos con Dermatofilia "

que presenta la pasante: Laura Cano Ortiz
 con número de cuenta: 8940296-2 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Biológica

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

ATENTAMENTE,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 15 de Junio de 1992

- PRESIDENTE M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez
- VOCAL Q.F.B. Marcela Hernández Vargas
- SECRETARIO M. en C. Enrique Salas Ceballos
- PRIMER SUPLENTE Q.F.B. René Damián Santos
- SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Víctor M. Zendejas Buitrón

AGRADECIMIENTOS.

A MIS PADRES.

Que me dieron lo más valioso que tengo "la vida" y que me han proporcionado la inmensa felicidad de vivirla. Gracias por su constante amor, esperanza, confianza y determinación para que juntos llegáramos a concluir esta meta.

Con todo mi corazón para ustedes, las personas más ejemplares, que me han guiado por el camino de la dedicación y la entrega y a los que tanto quiero mi gracias por ser como son, por enseñarme a ser lo que soy y por todo lo que han hecho por mí.

Maria Luisa Ortiz y Benigno Cano

A MIS HERMANAS.

Quiénes siempre han tratado de seguir mi ejemplo (por imposición o por convicción) sin saber que ellas son también fuente de mi inspiración para llegar a ser cada día mejor.

Veronica e Ivone.

A MIS AMIGOS.

Que al tenderme su mano me enseñaron lo más hermoso con que puede contar el ser humano "la amistad".

Gracias.

Claudia, Miguel, Angélica y Ricardo.

A MIS COMPAÑEROS.

A todos mis compañeros de generación por el apoyo que me brindaron y todas la enseñanzas que me dejaron ya que ahora forman parte de mi desarrollo personal y profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a todos mis profesores.

DEDICATORIAS

A Veleria Cano Ortiz

*Quien con cada sonrisa y cada beso que me regala, me motiva a y realizar
completamente todas las metas trazadas para ser cada día mejor y darme la oportunidad
de vivir el sueño de ser feliz.*

A Ricardo y Heidi por todo su cariño y apoyo durante la realización de este trabajo.

*¿A mi abuelito Espiri quien siempre creyó en mi y hasta el último momento me regalo
todo el amor que necesito para seguir adelante.*

ÍNDICE.

Contenido	Página
Resumen.	1
I. Introducción.	2
1.1 Generalidades.	2
1.2 Morfología.	4
1.3 Patogenia.	5
1.4 Epidemiología.	10
1.5 Inmunología.	11
1.6 Diagnóstico.	12
1.7 Tratamiento.	14
II. Objetivo General.	15
III. Objetivos Particulares.	15
IV. Justificación.	16
V. Diagrama de flujo.	17
VI. Material y Métodos.	18
6.1 Obtención de muestras clínicas de ovinos con probable dermatofitosis.	18
6.2 Aislamiento e identificación de cepas de <i>Dermatophilus congolensis</i> a partir de muestras clínicas.	18
6.2.1 Aislamiento.	18
6.2.2 Identificación.	19
6.3 Análisis electroforético de las proteínas de <i>Dermatophilus congolensis</i> .	20
6.3.1 Determinación del peso molecular de las proteínas.	22
6.4 Inmunotransferencia.	22
6.4.1 Identificación de las proteínas antigénicas mediante inmunotransferencia.	22
6.4.2 Detección de las proteínas transferidas.	23
6.5 Producción de suero hiperinmune contra las zoosporas de <i>Dermatophilus congolensis</i> en conejo.	24
6.6 Prueba de ELISA de tipo indirecto para la titulación de los sueros hiperinmunes.	25
6.6.1 Preparación de un extracto soluble de antígenos a partir de una cepa de <i>Dermatophilus congolensis</i> .	25
6.6.2 Método de ELISA de tipo indirecto	26
VII. Bibliografía.	28

RESUMEN.

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

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

La identificación de *D. congolensis* generalmente se basa en el hallazgo de las características morfológicas específicas en la tinción y el crecimiento en los medios de cultivo para *D. congolensis*; la identificación definitiva se hace en base en ciertas propiedades bioquímicas.

Los antígenos de *D. congolensis* que están involucrados en una respuesta inmunológica no han sido bien definidos, el presente trabajo pretende identificar los antígenos inmunodominantes en las cepas aisladas a partir de ovinos.

Para tal efecto se realizará la identificación electroforética de las proteínas que constituyen a *D. congolensis* en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE); posteriormente se realizará el reconocimiento de los antígenos inmunodominantes por la técnica de inmunotransferencia, para lo cual serán producidos previamente sueros hiperinmunes en conejo contra este actinomiceto.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1 GENERALIDADES.

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

La dermatofilosis fue reportada en 1910 por Van Saceghem (Pospil, 1992). Esta infección fue descrita como una enfermedad específica del ganado bovino en el antiguo Congo Belga y al agente que la provoca se le denominó *Dermatophilus congolensis* (*D.congolensis*) (Holt, et. al., 1954).

Esta infección es también conocida bajo diferentes nombres dependiendo de la especie hospedadora y de su apariencia clínica. Esta fue originalmente llamada "dermatitis contagiosa" pero debido al número de agentes infecciosos conocidos que causan dermatitis bovina, el nombre resultaba inapropiado. Algunos otros nombres empleados como dermatitis nocardial y nocardiosis cutánea son erróneos ya que el agente causal es morfológicamente distinto de *Nocardia*. La enfermedad en ovejas es comúnmente denominada dermatitis micótica y la infección en ganado bovino se denomina estreptotricosis cutánea, aunque existen otros nombres locales incluyendo: enfermedad de Senkobo en África central y Kirchi en Nigeria (Zaria, 1993).

El término dermatofilia es un nombre común para esta infección en todas las especies afectadas (Radostits, 1985).

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

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

1.2 MORFOLOGÍA.

El agente causal de la dermatofilosis es una bacteria Gram positiva, microaerofílica, filamentosa, la cual se encuentra sólo en la epidermis.

Esta bacteria presenta características especiales en cuanto a su forma de reproducción. El estado infectivo son cocos móviles llamados zoosporas que son atraídos hacia lesiones microscópicas del estrato córneo donde proliferan hasta formar filamentos largos mal nombrados micelios; estos filamentos se dividen hasta formar paquetes de zoosporas las cuales pueden permanecer en las costras formadas y pueden sobrevivir por periodos muy prolongados cuando las condiciones son favorables, estos paquetes son liberados produciendo nuevas infecciones (Pijoan y Tortora, 1986).

La germinación de la espora da lugar a un micelio de filamentos estrechos y puntiagudos con ramificación lateral en ángulo recto. Al trazarse los tabiques longitudinales, los filamentos se abren desde su diámetro inicial de 0.5 a 1.5 μm , siempre adelgazándose distalmente. La formación de enjambres de zoosporas cocoides móviles completa el ciclo, tal como se ilustra en la figura 1 (Nicolet, 1985).

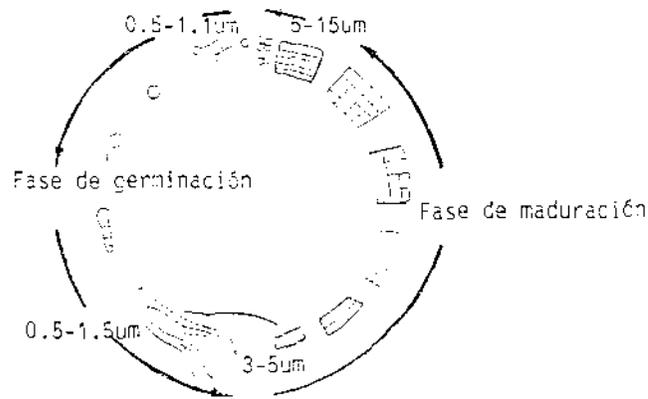


Figura No 1.

Ciclo evolutivo de *D. congolensis*.

(Nicolet, 1985).

1.3 PATOGENIA.

Existen muchas incógnitas sobre el conocimiento de la patogenia de la dermatofilosis, se sabe que las costras y escamas de animales infectados generalmente contienen elementos vivos de *D. congolensis*; cuando los animales están sanando las costras y escamas se desprenden, sugiriendo que un animal contaminado podría infectar a otros (Pijoan y Tortora, 1986). No obstante, puede presentarse una inhibición de *D. congolensis* por sustancias producidas por bacterias encontradas sobre la piel de animales sanos. Se ha reportado que la piel de borregos sanos contiene actividad inhibitoria para el crecimiento *in vitro* de *D. congolensis* (Kingali, et. al; 1990).

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

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

Los mecanismos de invasión pueden ser bloqueados mediante la estimulación de anticuerpos específicos de isotipo IgM e IgG2 que favorecen la inmovilización de las zoosporas en la superficie de la piel en rumiantes previamente inmunizados (Jenkinson, et. al; 1989).

La hifa es la etapa del ciclo biológico más estrechamente relacionada con la permanencia del microorganismo vivo en la epidermis.

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

Durante crecimientos *in vitro* la hifa secreta antígenos y enzimas proteolíticas en el medio de cultivo. La actividad proteolítica se ha asociado a la virulencia de *D.congolensis* (Ambrusen, 1996). Se puede presentar una invasión bacteriana secundaria y producir una supuración extensa y una toxemia severa (Radostis, 1985), o bien producirse una infección simultánea por virus. Se ha reportado que la dermatofilosis puede estar asociada con el virus de ectima contagioso en borregos (Tortora, et. al; 1991).

La dermatofilosis en ovinos, afecta las partes cubiertas con lana. Los signos tempranos de la infección son observados como áreas eritematosas seguidas de exudado con formación de costras las cuales se separan de la piel cuando la lana crece; es posible que estas costras permanezcan unidas a la lana, o bien si las fibras de la lana se rompen las costras pueden desprenderse. En casos crónicos las costras y las fibras unidas a ellas pueden permanecer pegadas a la piel produciendo con ello un engrosamiento y endurecimiento de la misma.

Si es removido este material es común observar úlceras con puntos hemorrágicos que le dan la apariencia de fresa, de ahí que a esta infección se le da el nombre de pudrición en fresa o Dermatitis proliferativa (Pijoan y Tortora, 1986).

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

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

La dermatofilia afecta la reproducción animal en varias formas, en 1983 se reportaron algunos casos de esterilidad en toros que presentaban infección escrotal generalizada y espermatogénesis anormal.

Las vacas pueden sufrir de atrofia de ovarios como resultado de un efecto debilitante general provocado por la infección (Samui y Hugh-Jones; 1990).

Se ha observado también que las lesiones que se presentan en el vientre de las vacas a menudo afecta las ubres provocando con esto la formación de costras haciendo casi imposible que amamante a los animales lactantes, esto eventualmente conlleva a un bajo crecimiento de los animales lactantes y puede resultar letal para animales jóvenes (Samui y Hugh-Jones; 1990).

En humanos, la enfermedad ha sido reconocida en varias formas y algunos investigadores creen que *D.congolensis* puede estar asociado con queratólisis humana (Loyd and Walker. 1993). Además se ha observado en humanos que la dermatofilia produce una dermatitis pustular dolorosa aguda. Recientemente la bacteria ha sido identificada microscópicamente en la lesión de queratólisis demostrándose que es el agente causal de esta enfermedad asintomática erosiva la cual es confinada primeramente al estrato córneo de la piel (Albrecht, et. al., 1974). Sin embargo la enfermedad no es muy reportada en humanos, por lo tanto se tiene poco conocimiento de la relación de este agente infeccioso en humanos (Noble, 1980).

1.4 EPIDEMIOLOGÍA.

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

El daño a la lana provoca severas pérdidas económicas representadas por una disminución del 39% de su valor y un 40% en el valor de la piel (Radostis, 1985). Además, esta enfermedad tiene gran impacto en la reproducción del ganado vacuno, producción de leche y carne (Samui y Hugh-Jones, 1990; Wilkinson, 1979).

Estudios realizados en ganado en África reportan porcentajes de prevalencia de aproximadamente el 15% con un porcentaje de infección del 100% en algunos rebaños. En climas templados la enfermedad es esporádica, pero puede representar un factor de considerable importancia económica en manadas y rebaños donde existen factores predisponentes que resulten en una alta prevalencia de la enfermedad (Radostis, 1985).

Animales de todas las edades son susceptibles, incluyendo lactantes de pocas semanas de nacidos. En los animales jóvenes la infección inicia en el hocico probablemente debido al contacto directo con el cuerpo de la madre al momento de alimentarse (Radostis, 1985). Se han comprobado experimentalmente que la mal nutrición de animales jóvenes influye en una mayor predisposición a la infección por *D.congolensis* (Sanders, et. al; 1990), afectando

también los resultados obtenidos en la aplicación de vacunas (Sanders et. al, 1991).

Se sabe que la susceptibilidad de los animales esta dada por las deficiencias en los mecanismos de inmunidad inespecífica. Sasaika y col. en 1993 han enfatizado que defectos en la inmunidad mediada por células granulocíticas, macrófagos y células NK incrementan la susceptibilidad a la dermatofilosis en ratones gnotobióticos con deficiencia inmune congénita; en contraste, aquellos ratones atímicos con deficiencia de células T fueron menos susceptibles a padecer la infección (Sasaika, et. al; 1993).

1.5 INMUNOLOGÍA.

La inmunología de la dermatofilosis no esta bien entendida; no obstante estudios en la materia se han enfocado principalmente a la serología como evidencia, así como también a la investigación de sus componentes antigénicos como posible herramienta para el diagnóstico. La evaluación de la respuesta inmunitaria durante la infección por *D.congolensis* puede proveer valiosas herramientas para el diagnóstico de la infección . El uso de técnicas de biología molecular y de anticuerpos monoclonales para estudiar los antígenos de *D. congolensis* así como la evaluación de la respuesta inmunológica puede ayudar a establecer un diagnóstico efectivo para aquellos animales que presentan dermatofilosis (Zaria, 1993; How, et. al; 1988).

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

Se ha reportado que las cepas de *D.congolensis* crecen bien aeróbicamente a 37°C en los medios selectivos mencionados anteriormente. Se ha observado también un crecimiento abundante empleando medio de Loeffler.

Las colonias observadas son irregulares de color grisáceo con una textura granular y presentan β hemólisis después de 24 horas a 37°C en agar sangre (Bailey and Scotts, 1990). Las colonias de aislamientos frescos comienzan a hacerse mucoides aproximadamente a las 72 horas (Lennette, 1987). Las pruebas bioquímicas como catalasa, ureasa, hidrólisis de caseína, entre otras representan una buena herramienta en el diagnóstico acertado de *D.congolensis* (Carter and Cole, 1990). Se ha propuesto también que el empleo de la técnica de

contrainmunolectroforesis resulta ser un método útil y efectivo en el diagnóstico de la infección por esta bacteria (Makinde and Majiyagbe, 1982).

1.7 TRATAMIENTO.

El tratamiento de la infección se realiza de forma individualizada, administrándose antibióticos por vía parenteral en dosis única, generalmente con resultados efectivos. Tetraciclina (5mg/Kg de peso) y tetraciclina de amplio espectro (20 mg/Kg de peso) ofrecen excelentes resultados en ganado vacuno y ovejas. La penicilina y la estreptomina en altas dosis (70 mg de estreptomina y penicilina procaínica G 70.000 unidades/Kg de peso) se ha recomendado con un 100% de eficacia en ovejas con infección generalizada (Scrivener and Vizar, 1995).

La ciclofosfamida administrada oralmente en dosis de 25 mg/Kg de peso solo representa un tratamiento efectivo en el 77% de los casos; cuando este tratamiento se combina con penicilina por vía parenteral y estreptomina el porcentaje de recuperación se incrementa hasta 93% (Radostits, 1985).

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

Los antígenos que provocan una respuesta inmunológica no han sido bien definidos, estos podrían participar como factores de patogenicidad o virulencia (Ambrusen, 1996).

1.6 DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico primario de dermatofilosis está basado en los signos clínicos de la enfermedad, principalmente en la aparición de lesiones características sobre el cuerpo de animales infectados. La demostración de la presencia del microorganismo en una observación directa al microscopio de una muestra de la lesión, teñida con Giemsa es importante para el diagnóstico presuntivo (Pijoan y Tortora, 1986). El diagnóstico confirmatorio de la enfermedad se puede hacer mediante el aislamiento del microorganismo por cultivo en medios bacteriológicos y su posterior identificación mediante un perfil de pruebas bioquímicas. La inoculación de material obtenido de animales infectados en animales de laboratorio como conejos, cobayos o ratas se realiza con el fin de provocar la infección experimentalmente; la evaluación del tipo de lesión característica de esta bacteria se emplea como una forma de diagnóstico. Se ha reportado también que *D.congolensis* puede propagarse en embriones de pollo, especialmente si la fuente de donde se obtiene no está muy contaminada por otros microorganismos, adicionalmente puede ser empleado en el diagnóstico de la enfermedad (Zaria, 1993).

II. OBJETIVO GENERAL.

Identificar mediante electroforesis e inmunotransferencia antígenos inmunodominantes en cepas de *Dermatophilus congolensis* aisladas a partir de muestras clínicas de ovinos.

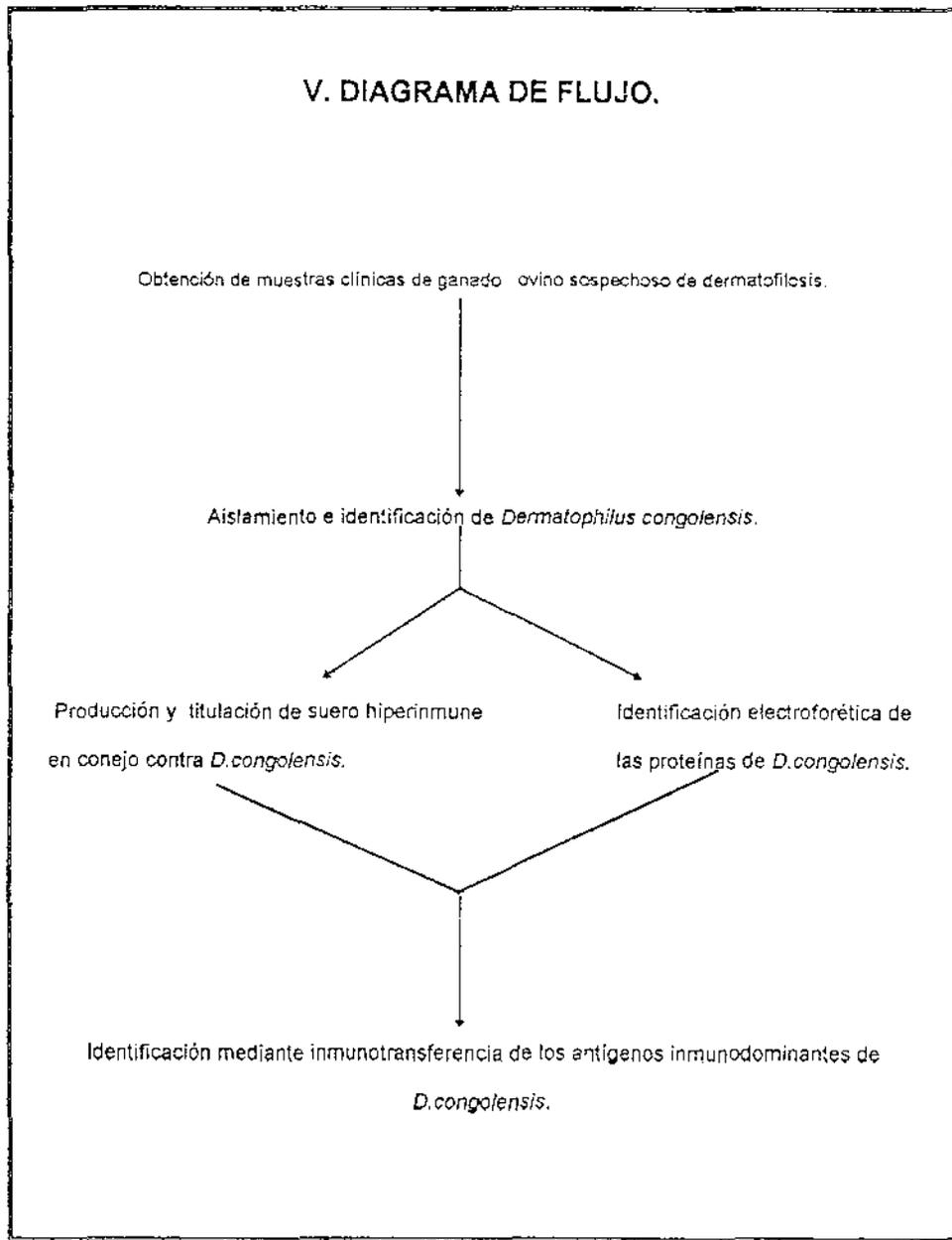
III. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Aislar e identificar a *D.congolensis* a partir de muestras clínicas de ovinos.
2. Realizar la separación e identificación mediante corrimiento electroforético de proteínas de *D.congolensis*.
3. Producir suero hiperimmune en conejo contra las zoosporas de *D.congolensis*.
4. Titular el suero hiperimmune producido mediante la técnica de ELISA de tipo indirecta.
5. Identificar mediante inmunotransferencia los antígenos inmunodominantes de *D.congolensis*.

IV. JUSTIFICACIÓN.

La infección causada por *Dermatophilus congolensis* (dermatofilia) es una enfermedad que afecta principalmente a ovinos, bovinos y equinos. Esta infección es de gran importancia económica en regiones húmedas tropicales donde produce severos daños económicos afectando principalmente la producción de leche y carne. Actualmente el diagnóstico es de tipo clínico basándose en la observación de las lesiones; sin embargo, este diagnóstico no es confiable; es por ello que surge la necesidad de evaluar nuevos métodos que permitan establecer un diagnóstico rápido y certero. La evaluación de antígenos específicos asociados con la infección puede ser una buena alternativa debido a que la información publicada a cerca de la caracterización antigénica de *Dermatophilus congolensis* es mínima. El presente trabajo pretende definir los principales antígenos inmunodominantes de esta importante bacteria en Veterinaria.

V. DIAGRAMA DE FLUJO.



VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Obtención de muestras clínicas de ovinos con probable dermatofilosis.

Se realizará la toma de muestra de ovinos que sean sospechosos a dermatofilosis en los sitios de lesión donde existan costras o bien tomando lana del mismo sitio.

6.2 Aislamiento e identificación de cepas de *Dermatophilus congolensis* a partir de muestras clínicas.

6.2.1 Aislamiento.

Se tomarán fragmentos pequeños de costras y escamas y se colocarán en frascos o tubos pequeños, se agregarán 1 ml de agua destilada estéril y se mantendrá durante 3 ½ horas a temperatura ambiente, se inocularán placas de agar sangre del sobrenadante y las placas serán colocadas en una campana de desecación a la cual se le reducirá la tensión de oxígeno por medio de una vela encendida, se incubará a 37° C por 24/48 horas esperando la aparición de las colonias después del periodo de incubación. Las zoosporas serán resembradas en agar infusión cerebro corazón (BHI) a 37° C durante 18 horas, posteriormente serán agitados suavemente a 25° C con aireación y se filtrará a través de un filtro Whatman No 1 para remover restos filamentosos. El filtrado será lavado tres veces en buffer salino de fosfatos pH 7.2 (PBS) (Gogolewiski, et. al; 1992).

6.2.2 Identificación.

Las pruebas que se utilizarán en el laboratorio para la identificación de *D.congolensis* se presentan en la tabla 1.

TABLA 1.

Tinciones y reacciones bioquímicas de *D.congolensis* utilizadas para su identificación.

TÉCNICAS	REACCIÓN
Tinción de Gram	+
Tinción ácido-resistente	-
Catalasa (H ₂ O ₂)	+
Ureasa	+
Aamilasa	+
Hidrólisis de caseína	+
Coagulación de suero Loeffler's	+ (raramente -)
Peptonización de leche	+
Producción de ácido:	
Glucosa	+
Lactosa	-
Maltosa	+
Sucrosa	-
Xilosa	-
Fructosa	+
Galactosa	+/variable

(Carter and Cole, 1990).

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

Se realizará la electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) con concentraciones de 7.5-12.5% para el gel de separación y de 3 al 4% para el gel de concentración por el método descrito por Lammlí (Lammlí, 1970) como se describe a continuación:

Se armará el molde del gel de electroforesis.

Se preparará la solución del gel separador deseado sin incluir el persulfato de amonio ni el TEMED, añadir estos reactivos, agitar y verter la solución en el molde hasta un nivel aproximado de 3-4 cm del borde superior de la ranura.

Con mucho cuidado y lentamente pipetear alcohol isopropílico hasta formar una fina capa sobre la superficie del gel. Dejar polimerizar por 30 - 40 min.

Decantar el agua o butanol y absorber el remanente con un papel filtro sin dañar la superficie del gel.

Repetir los mismos pasos para la preparación del gel de concentración.

Colocar el peine de teflón y dejar polimerizar aproximadamente 5 minutos. Los geles se puede usar inmediatamente o guardar hasta el día siguiente a 4°C.

Se vierte agua en los pozos de aplicación de la muestra y se saca el peine con mucho cuidado.

Añadir el buffer de corrimiento para la electroforesis a las cubetas superior e inferior de la cámara de electroforesis y hacer un precorrimento del gel durante 10-15 minutos a 100-125 V.

Preparado el gel, se adicionan las muestras previamente preparadas como se describe a continuación:

Las zoosporas se resuspenderán en 0.5 ml de PBS a una concentración de 6×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC). Estas serán digeridas en buffer muestra (Tris-HCl 0.5M, pH 6.8; Glicerol 10%, SDS 0.346M; 2 β -mercaptoetanol 0.05%; azul de bromofenol 0.05%) por ebullición durante 5 minutos (Gogolewiski, et. al; 1992).

Aplicar 20 μ l de cada muestra y los patrones de peso molecular en los carriles seleccionados, utilizando para ello una jeringa Hamilton. Correr la electroforesis a 100-120 V (20-30 mA) hasta que el colorante alcance el final del gel.

Sacar con cuidado el gel de entre los cristales y colocarlo en una solución de azul brillante de Coomassie R-250 al 1% durante 45 minutos para visualizar las bandas de las proteínas. Posteriormente se decolorarán con la solución desteñidora 1 la cual es una mezcla de metanol, ácido acético y agua (5:1:1.25) durante 1-3 horas. Para eliminar el exceso de colorante, el gel se colocará posteriormente en una solución desteñidora 2 la cual esta formada por metanol, ácido acético y agua (1:1.4:17.6).

6.3.1 Determinación del peso molecular de las proteínas.

El peso molecular de las proteínas observadas en el gel será calculado mediante una curva estándar de proteínas con peso molecular conocido. Esta curva estándar de proteínas se realizará trazando el coeficiente de movilidad relativa (Rf) de cada proteína estándar contra el Log_{10} de su peso molecular en Kd. El antilogaritmo de ese número será el peso molecular de la proteína.

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

$$\text{Coeficiente de movilidad relativa (Rf)} = D_p/D_m.$$

D_p = Distancia recorrida por las proteínas.

D_m = Distancia total recorrida por la muestra.

6.4 Inmunotransferencia.

6.4.1 Identificación de las proteínas antigénicas mediante inmunotransferencia.

Montaje y condiciones de la transferencia. Se cortará un trozo de membrana de nitrocelulosa y dos de papel filtro al tamaño del gel obtenido en la electroforesis, se humedecerá la membrana y el papel en buffer de transferencia. Se ensamblará el gel electroforético, la membrana de nitrocelulosa y el papel filtro como se indica en la figura 2. Se colocarán las partes anteriores en la cámara de

transferencia cuidando que la membrana de nitrocelulosa quedará del lado del electrodo positivo.

La transferencia se correrá a 18 volts durante 24 horas con flujo de agua constante para evitar un posible calentamiento. Una vez terminada la transferencia, se marcará la membrana para tener la orientación del gel.

6.4.2. Detección de las proteínas transferidas.

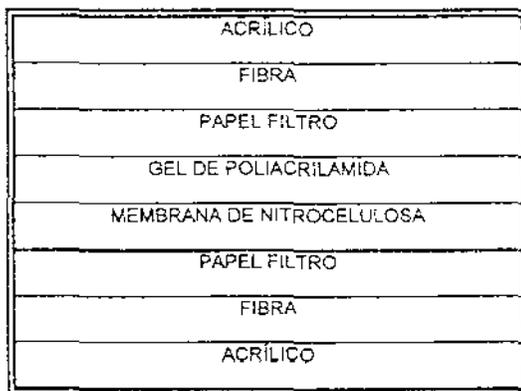
Después de la electroforesis SDS-PAGE, el gel será equilibrado durante 10 minutos en buffer de transferencia (0.025M Tris base; 0.192M glicina; 20% propanol) y las proteínas serán electrotransferidas hacia papel de nitrocelulosa como lo describe Towbin et. al, 1979. Las tiras resultantes serán lavadas durante 10 minutos en TBS-Tween (0.02M Tris-HCl; 0.5M NaCl; 0.05% v/v Tween 20 pH 7.5), el bloqueo posterior se realizará durante 90 minutos con leche descremada (5% p/v en TBS-Tween) y se incubará durante 90 minutos con los sueros hiperinmunes contra *D.congolensis* previamente titulados mediante la técnica de ELISA de tipo indirecto, se propone realizar diluciones dobles del suero hiperinmune obtenido de conejos; se deben emplear sueros de conejo como un control positivo y un control negativo.

Posteriormente, se lavarán las tiras por lo menos tres veces (15 minutos cada lavado) y serán enfrentadas con proteína A peroxidada ; después del lavado las bandas de identidad serán reveladas mediante la adición de una

solución que contiene peróxido de hidrógeno y α -cloronaftol . Los marcadores de peso molecular serán detectados con negro de amido al 0.1% (Towbin, 1979).

FIGURA No 2.

Esquema de ensamble del gel / nitrocelulosa para Inmunotransferencia.



6.5 Producción de suero hiperinmune contra las zoosporas de *D.congolensis* en conejo.

Se inoculará un conejo de raza Nueva Zelanda de aproximadamente 2.5 Kg de peso con una preparación de zoosporas de *D.congolensis* a una concentración de 6×10^8 UFC en 0.5 ml de PBS previamente emulsificadas con 0.5 ml de Adyuvante Completo de Freund (ACF) con el siguiente protocolo de inmunización:

Día cero: Toma de muestra sanguínea venosa que será el control negativo.

Inoculación por vía I.M de 6×10^8 UFC en 0.5 ml de PBS + 0.5 ml de ACF.

Día siete: Toma de muestra sanguínea venosa para titular el suero mediante la técnica de ELISA de tipo indirecto.

Segunda inoculación con 6×10^8 UFC en 0.5 ml de PBS + 0.5 ml de Adyuvante Incompleto de Freund.

Día catorce: Toma de muestra sanguínea venosa para titular por ELISA.

Inoculación de células completas.

Día veintiuno: Toma de muestra sanguínea venosa para titular por ELISA.

Sangrar por punción cardiaca.

6.6 Prueba de ELISA de tipo indirecto para la titulación de los sueros hiperinmunes.

6.6.1. Preparación de un extracto soluble de antígenos a partir de una cepa de *D.congolensis*.

La preparación de un extracto de antígenos sonicados se realizará por el método descrito por Martínez, et al; en resumen: 50 ml de un cultivo de 7 días de *D.congolensis* en medio de BHI serán lavados tres veces en agua destilada estéril por centrifugación a 1500 g durante 15 minutos. Las células serán suspendidas en 15 ml de buffer de fosfatos (PBS 0.1 M, pH 7.2) y sonicadas en 15 ciclos de 1 minuto con intervalos de un minuto entre cada ciclo en un baño de etanol-hielo seco. La suspensión será clarificada por centrifugación a 2500 g

durante 15 minutos obteniendo así el antígeno crudo. Una suspensión enriquecida de pared celular se obtendrá por centrifugación de 15 ml de antígeno crudo a 20 000 g por 15 minutos y dispersando la pastilla en PBS. La centrifugación del sobrenadante remanente a 30 000 g por una hora producirá una pastilla enriquecida en membrana citoplasmática bacterial. El último sobrenadante después de todas las centrifugaciones constituye la fracción de antígenos solubles de *D.congolensis*. La determinación de proteínas se realizará por el método de Bradford.

6.6.2. Método de ELISA de tipo indirecto.

La titulación del suero de conejo se realizará empleando la técnica de ELISA de tipo indirecto empleando el método descrito por Martínez.

- El antígeno se preparará a una concentración de 10 µg/ml utilizando buffer de carbonato/bicarbonato 0.1M, pH 9.5.
- Se sensibilizarán los pozos de poliestireno con un volumen de 100 µl de la solución de antígeno.
- La placa se incubará durante 2 horas a 37°C ó toda la noche a 4°C.
- Se eliminará la solución vertiendo el contenido de los pozos y se seca el exceso sobre una gasa.
- La placa se lava 3 veces con 200 µl por pozo con la solución de PBS-tween 20 durante 5 minutos en cada lavado. Entre cada lavado se sigue como se indica en el paso anterior.

- Se incubará la placa a 37°C durante 30 minutos con 200 µl por pozo de una solución de leche descremada al 1% en PBS-tween 20.
- Repetir los lavados
- Se realizarán diluciones dobles del suero de conejo con PBS-tween 20 adicionando un volumen de 100 µl a cada pozo incubándose durante 1 hora a 37°C.
- Repetir los lavados.
- En cada pozo se depositarán 100 µl de un anticuerpo anti-gamma globulina total de conejo conjugado con peroxidasa, incubándose a 37°C durante 2 horas.
- repetir los lavados
- Se colocarán 100 µl de la solución reveladora (H_2O_2 - α -cloronaftol) durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente.
- La reacción enzimática será detenida adicionando 100 µl de ácido sulfúrico 2N en cada pozo. Se leerá la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Albrecht, R.; Horowitz, E.; Gilbert, R.; Hong, R. and Connor, D.H. (1974). *Dermatophilus congolensis* Chronic nodular disease in man. *Pediatrics*. **53**:907-912.
2. Ambrusen, N.C. (1996). The pathogenesis of Dermatophilosis. *Tropical Vet. Med.* **28**: 295-375.
3. Austwick, P.K. (1985). Cutaneous Streptothricosis, Micotic Dermatitis and Strawberry Foot-Rot and genus *Dermatophilus*. *Van. Sac. Det. Rev. Annot.* **4**:33-48.
4. Bailey and Scott's. (1990). *Diagnostic Microbiology*. Ed. 8th edit. Mosby Company. 574-575. USA.
5. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

6. Carter, G.R.(1986). *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. Ed. 3rd edit. Lea and Febiger. Philadelphia. 196-197. USA.
7. Carter, G.R. and Cole, J.R.Jr. (1990). *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. Ed. 5th. Edit. Academic press, INC. p.280-283. USA.
8. Ellis, T.M.; Masters, A.M.; Sutherland, S.S.; Carson, L.M. and Gregory, A.R. (1993). Variation in cultural, morphological, biochemical properties and infectivity of Australian isolates of *Dermatophilus congolensis*. *Vet. Microbiol.* 38:81-102.
9. Gillum, R.L.; Qadri, S.M. ; Ai-Ahdal, M.N.; Connor, D.H. and Strano, A.J. (1988). Pitted Keratolysis: a manifestation of human dermatophilosis. *Dermatologica.*177:305-308.
10. Gogolewiski, R.P.; Mackintosh, J.A.; Wilson, C.S. and Chin, C.J. (1992). Immunodominant antigens of zoospores from ovine aislotes of *Dermatophilus congolensis*. *Veterinary Microbiol.* 33:305-318.
11. Hanel, H.; Kalish, J.; Keil, M.; Maisch, W.C. and Buslau, M. (1991). Quantification of keratinolytic activity from *Dermatophilus congolensis*. *Med. Microbiol. Immunol.* 180:45-51.

ESTA TESIS NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA

12. Hermoso de Mendoza, J.; Arenas, A.; Rey, J.; Alonso, J.M.; Gil, N.C.; Naranjo, G. and Hermoso de Mendoza, M. (1994). *In vitro* studies of *Dermatophilus congolensis* antimicrobial susceptibility by determining minimal inhibitory and bacteriocidal concentrations. *Br. Vet. J.* **150**:189-197.
13. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sheath, P.H.A.; Steley, J.T. and Williams, S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed. 9th Edit. William and Wilkins. Baltimore, USA.
14. How, S.J.; Lloyd, C.M. and Walker, A.R. (1988). Use of a monoclonal antibody in the diagnosis of infection by *Dermatophilus congolensis*. *Res. Vet. Sci.* **45**:416-417.
15. Jenkinson, D.M.; Menzies, J.D.; Pow, I.A.; Inglis, L.; Lloyd, D.H. and Mackie, A. (1989). Actions of bovine skin washings and sera on the motile zoospores of *Dermatophilus congolensis*. *Res. Vet. Sci.* **47**:241-246.
16. Jubb, K.U.F.; Kennedy, C. and Palmer, N. (1985). *Pathology of domestic animals*. Ed. 3rd. edit. Academic Press. Vol 1. 475-538. USA.

17. Kingali, J.M.; Heron, I.D. and Morrow, A.N. (1990). Inhibition of *Dermatophilus congolensis* by substances produced by bacteria found on the skin. *Vet. Microbiol.* **22**:237-240.
18. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:93-102.
19. Lennette, H.E. (1987). *Manual de Microbiología Clínica.* Ed.4^ª. Edit. Médica Panamericana. 330-335. México.
20. Masters, A-M.; Ellis, T.M. and Grein, S.B. (1997). *Dermatophilus congolensis*: strain difference in expression of phospholipasa activities. *Vet. Microbiol.* **57**:199-213.
21. Makinde, A.A. and Majiyagbe, K.A. (1982). Serodiagnosis of *Dermatophilus congolensis* infection by counterimmunoelectrophoresis. *Rest. Vet. Sci.* **33**:265-269.
22. Martínez, D.; Mari, B.; Aumont, G. and Vidalenc, T. (1993). Development of a single dilution ELISA to detect antibody to *Dermatophilus congolensis* in goats and cattle sera. *Vet. Microbiol.* **34**:47-62.

23. Momotani, E.; Inui, S.; Ishikawa, Y. and Azurra, R. (1984). Granulomatous sub-dermal lesion in sheep inoculated with *Dermatophilus congolensis*. *J. Com. Path.* **94**: 33-43.
24. Nicolet, J. (1985) *Compendio de Bacteriología Médica y Veterinaria*. Edit. Acribia. 202-205. España.
25. Noble, W.C.; Lloyd, D.H. and Appiah, S.N. (1980). Inhibition of *Dermatophilus congolensis* infection in mouse model by antibiotic producing Staphylococci. *Br.J. exp. Path.* **61**: 644-647.
26. Pijoan, P. y Tortora, J. (1986). *Principales enfermedades de los ovinos y caprinos*. Coordinación general de estudios de posgrado Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.
27. Pospisil, L.; Skalka, B.; Bucek, J. and Moster, M. (1992). The first isolation of *Dermatophilus congolensis* Van Sacegham 1913 in Czechoslovakia. *Cesk. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **41**:258-267.
28. Radostits, O.M.; Blood, D.C. and Goy, C.C. (1994). *Veterinary Medicine*. 8th de. edit. Bailliere Tindal, 857-861. USA.

29. Samui, K.L. and Hugh-Jones, M.E. (1990). The financial and production impacts of bovine Dermatophilosis in Zambia. *Vet. Res. Comm.* **14**:357-365.
30. Sanders, A.B.; How, S.J.; Lloyd, D.H. and Hill, R. (1990). The effect of energy malnutrition in Ruminants on Experimental infection with *Dermatophilus congolensis*. *J.Com.Path.* **103**:361-369.
31. Sanders, A.B.; How, S.J.; Lloyd, D.H. and Hill, R. (1991). The effect of malnutrition on vaccinated against *Dermatophilus congolensis* infection in ruminants. *J. Comp. Path.* **105**:37-48.
32. Sakalka B. and Pospisil L. (1993). Antigenicity of *Dermatophilus congolensis* haemolysin. *Zentralbl. Veterinar Med.* **40**:215-221.
33. Sasiak, A.B.; Sebestery, A.; Hrivnak, G. and Lloyd, D.M. (1993). Experimental dermatophilosis in murine models of immunodeficiency. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* **46**: 263-269.
34. Scrivener, C.J. and Vizard, A.L. (1995). Efficacy of a single dose of erythromycin or penicillin/streptomycin for the treatment of ovine dermatophilosis. *Aust. Vet. J.* **72**:475-476

35. Towbin, H. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamida gels to nitrocellulose sheet. Procedure and some applications. *Pro Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4354.
36. Tortora, P.J.; Cervantes, O.R.A. and Cruz, A. (1991). Simultaneous infection in sheep with contagious ecthyma virus and *Dermatophilus congolensis*. *Rev. Med. Vet. Mycol.* **26**:923.
37. Wekhe, S.N. (1989). New media for the isolation of *Dermatophilus congolensis*. *Tropical Animal Health and Production.* **21**:231-232.
38. Wilkinson, F.C. (1979). Dermatophilosis of sheep association with dipping an effects un production. *Aust. Vet. J.* **55**:74-76.
39. Zaria, L.T. (1993). *Dermatophilus congolensis* infection (Dermatophilosis) in animals and man. An Update. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **16**: 17-222.