



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

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

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**JUAN CARLOS MARTÍNEZ NERIA**

ASESORES:

**DR. ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES**

**MVZ. ESP. MARÍA GRISEL ANAYA SANTILLÁN**



MÉXICO D. F.

2012



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.

La Medicina cura al  
hombre, la Medicina  
Veterinaria cura la  
humanidad.

**Luis Pasteur**

## DEDICATORIA

### **A mis padres:**

Por darme la vida y permitirme ser guiado por su mano.

En cada momento en el que me canse y decidí declinar, ellos estuvieron para recordarme que la vida no es fácil y que nunca hay que ceder ante la adversidad.

### **A mis hermanos:**

Que fueron cómplices de cada una de mis travesuras y que con el tiempo fuimos, además de hermanos amigos inseparables, Hugo, Monse y el pequeño Haziél, que aunque no lo pude disfrutar tanto siempre quise ser un ejemplo para el.

### **A Carmen mi esposa:**

Esa mujer que cada día me impulsa a salir adelante en todos los sentidos y aunque no se si yo sea un gran hombre para ella, ella si es esa gran mujer para mi.

### **A ti Leonardo:**

Eres el mejor regalo que me ha dado la vida y que en tan poco tiempo junto con tu mami se han convertido en mi prioridad.

## AGRADECIMIENTOS

A mi Familia:

Por ser mi motor en la vida.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia:

Por permitirme ser parte de esta gran familia y de su historia.

A mis hermanos en la carrera y después de ella:

Antonio Roldan Roldan y Priscila García Lamoret que fueron parte de esta gran travesía.

A mis asesores:

Grisel Anaya Santillán y Roberto Arnulfo Cervantes Olivares, por obligarme a seguir con mi trabajo y brindarme parte de sus bastos conocimientos.

A la MVZ Esp. Myrna Vicencio Mayen.

A la Dra Conchita Toriello:

Por el apoyo que me otorgó durante el desarrollo de este trabajo.

A la Química Amelia Pérez:

Por su apoyo y su enseñanzas para la conclusión de esta tesis.

Al MVZ Raimundo Yañez Hernández de clínica mon amie en Hermosillo, Sonora.

A la MVZ Verónica Ramírez Martínez.

A mis compañeros del Laboratorio de Serología:

Cristy, Martín, Ester y José Luis.

## ABREVIATURAS

%	Porcentaje
1X	Sin concentrar
5X	Concentrada 5 veces
ABMX	Antígeno de Birmex
AFM	Antígeno de la Facultad de Medicina
AFMVZ	Antígeno de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Ag	Antígeno
C'	Complemento.
c/u	Cada uno
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
FAO	Food and Agriculture Organization
FC'	Fijación de complemento
FM-UNAM	Facultad de Medicina
FMVZ-UNAM	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
GR	Glóbulos rojos
HCl	Ácido clorhídrico
IDGA	Inmunodifusión doble en gel agar
IgG	Inmunoglobulina isotipo G
IgG1	Inmunoglobulina isotipo G 1
IgG2	Inmunoglobulina isotipo G 2
IgG3	Inmunoglobulina isotipo G 3
IgG4	Inmunoglobulina isotipo G 4
IgM	Inmunoglobulina isotipo M
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
Kg	Kilogramo
L	Litro
mg	Miligramo
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
NaCl	Cloruro de calcio
NaOH	Hidróxido de sodio
° C	Grados centígrados
pH	Potencial Hidrógeno
g	gravedades
SH	Sistema hemolítico
SSAT	Solución salina amortiguada con trietanolamina
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
µm	Micrómetro
Min	Minutos

**CONTENIDO**

	Página
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>CONTENIDO .....</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>38</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>43</b>

## RESUMEN

Juan Carlos Martínez Neria. 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. (Bajo la dirección de Dr. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares, MVZ. Esp. María Grisel Anaya Santillán).

La coccidioidomicosis es una enfermedad que puede afectar a los animales y a los humanos, es endémica del sureste de Estados Unidos y noreste de México, así como en algunas zonas de centro y Sudamérica. A pesar de no ser de reporte obligatorio, esta enfermedad está cobrando mayor importancia en la salud pública, debido a que se han presentado casos en humanos con mayor frecuencia que en años anteriores. En medicina veterinaria, la enfermedad en perros no es tomada en cuenta en el diagnóstico clínico por los médicos veterinarios. Las pruebas serológicas son una herramienta muy utilizada en el diagnóstico de la coccidioidomicosis en humanos y en especial la prueba de fijación de complemento. En el presente trabajo se estandarizó la prueba de fijación de complemento directa, utilizando la técnica de 100% de hemólisis, para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra los hongos del género *Coccidioides*, la eficiencia de esta prueba se comparó contra la prueba de inmunodifusión doble en gel agar. Para ambas pruebas se utilizó un antígeno elaborado en la Facultad de Medicina de la UNAM, las muestras problema usadas se obtuvieron de perros provenientes de estados considerados endémicos. Como grupo control negativo se emplearon muestras obtenidas de animales del Distrito Federal y como control

positivo se utilizó un suero hiperinmune elaborado en conejos. Para la estandarización de la prueba de fijación de complemento se titularon los elementos de la prueba, una vez estandarizados se realizaron ensayos con muestras problema, controles negativos y el control positivo; estos sueros también se trabajaron por la prueba de inmunodifusión doble en gel agar.

Con ambas pruebas se pudo determinar la presencia de anticuerpos en las muestras de suero, pero en la mayoría de los sueros sometidos a la prueba de fijación de complemento se observó también la presencia del fenómeno anticomplementario, el cual impidió poder dar un resultado positivo o negativo. Este fenómeno presente en el suero de ciertos animales no se pudo eliminar, motivo por el cual la prueba se vuelve ineficiente para su uso en la determinación de la presencia de anticuerpos específicos contra los hongos del género *Coccidioides*.

## INTRODUCCIÓN

Los perros, como todas las especies animales y el humano, están expuestos a adquirir enfermedades de diferentes entidades etiológicas, dentro de las cuales se encuentran las micóticas. En este grupo, la coccidioidomicosis ocupa un lugar muy importante. Su etiología son las especies del género *Coccidioides*, y se consideran dimórficos porque producen micelios durante su fase saprofítica en el medio ambiente y sufren un cambio a su fase parasítica cuando entran en contacto con el hospedero. Es importante mencionar que esta micosis es considerada como una zoonosis (1, 2, 3).

Los hongos del género *Coccidioides*, producen en su forma saprofítica colonias algodonosas de color blanco, su micelio está formado por hifas septadas de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro que conforman una cadena de artroconidias multinucleadas alternadas con células más pequeñas, frágiles no viables. Posteriormente, estas hifas se fragmentan liberando las artroconidias, las cuales son transportadas por el viento, teniendo la oportunidad de llegar a un lugar favorable para su reproducción y dar origen a un nuevo micelio; también pueden ser inhaladas por el hospedero donde atraviesan la barrera mucociliar y así llegan al pulmón, órgano en el cual la artroconidia adquiere su forma patógena llamada esférula (4, 5, 6, 7).

En el género *Coccidioides* únicamente se incluía a la especie *immitis*, pero se demostró a través de estudios moleculares de tipificación y descripción fenotípica de hongos aislados de personas infectadas, que esta especie tenía diferencias suficientes como para dividirla en dos, surgiendo de esta manera la especie *posadasii*. También se pudo determinar que la especie *immitis* se aislaba con

mayor frecuencia en casos de personas infectadas en el estado de California, que se encuentra al sureste de Estados Unidos de América, mientras que la especie *posadasii* se aislaba con mayor frecuencia en personas infectadas en otras zonas del Continente Americano excepto en el ya mencionado estado de California (8, 9).

Los hongos del género *Coccidioides* son considerados endémicos en América y las áreas en las cuales se localiza están bien determinadas (2, 10), teniendo a los estados del sureste de Estados Unidos de América y los estados del noreste de México como las principales zonas afectadas (11, 12).



Figura 1: Distribución geográfica de la Coccidioidomicosis (Tomado de Héctor RF, Laniado Laborin R, (2005) Coccidioidomycosis-A fungal disease of the Americas).

También se han localizado algunos focos de infección en el centro y sur de América, ubicándose el más reciente en Brasil (Figura 1) (2, 11, 12). Su hábitat se restringe a lugares con clima árido o semiárido y a alturas bajas sobre el nivel del mar, debido a que estos lugares favorecen su reproducción por los siguientes aspectos geoclimáticos: suelo con alto contenido de sales, pH alcalino, poca precipitación, temperaturas altas, viento; por otra parte también se ha observado que el polvo tiene importancia para su diseminación (12, 13).

Los estudios epidemiológicos realizados para determinar la presencia de *Coccidioides spp.*, en México, son antiguos y escasos en humanos, y en medicina veterinaria este tipo de estudios son casi nulos. También es importante resaltar que a pesar de ser una de las micosis endémicas más importantes en el norte de América, esta enfermedad no es de reporte obligatorio en México, dificultando obtener datos epidemiológicos confiables y actuales (1).

En los años 60, González Ochoa delimitó la región endémica de México, mediante la aplicación de la prueba de intradermoreacción en humanos, en un estudio denominado encuesta nacional. La primera zona considerada como endémica es la zona norte, que abarca los estados de Baja California Norte, Sonora, Chihuahua, Nuevo León y Tamaulipas; la segunda zona o zona del litoral del Pacífico la conforman los estados de Guerrero, Michoacán, Jalisco, Nayarit, Sinaloa y partes de Sonora; y la tercera zona es la zona central que comprende partes de Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas, San Luís Potosí, y partes de Tamaulipas y Guanajuato. En México la mayor cantidad de casos de coccidioidomicosis proviene de los estados del norte del país (1, 10).

La coccidioidomicosis es una enfermedad que puede ser controlada por el sistema inmune antes de que ocasione signos clínicos, en el 60 % de los casos (14, 15, 16).

Por otra parte, alrededor del 40 % de los casos la enfermedad se manifiesta por medio de signos clínicos que ordinariamente suelen relacionarse con los de bronquitis o neumonía. Estos signos no representan mayor problema, permanecen durante unos cuantos días para luego desaparecer, en la mayor parte de los casos. Sin embargo, en el 0.5 al 2 % de los enfermos los signos descritos con anterioridad no desaparecen y el hongo es diseminado a otros órganos por vía sanguínea, por lo tanto la enfermedad se establece de forma sistémica, ocasionando el surgimiento de nuevos signos (15, 17).

La infección ocurre cuando el hospedero inhala las artroconidias, los pulmones son los órganos donde se ubica el foco primario de infección y la severidad de la enfermedad depende en gran medida del estado inmunológico en el cual se encuentre el hospedero (3, 17).

Cuando las artroconidias llegan al pulmón, los macrófagos y neutrófilos son la primera línea de defensa contra la infección, pero inicialmente son incapaces de fagocitar efectivamente a una estructura tan grande como lo es la fase tisular de *Coccidioides spp* (3, 5).

La infección genera la aparición de una población de linfocitos TH1 específicamente sensibilizados para destruir a *Coccidioides spp.*, mediante la activación de las demás células involucradas en la respuesta inflamatoria, incluyendo a los macrófagos. Esta respuesta en individuos inmunocompetentes es capaz de suprimir el progreso de la infección (3, 5).

Por el contrario, en los individuos que presentan supresión de la inmunidad mediada por linfocitos T, como los animales jóvenes y viejos, los animales con enfermedades infecciosas previas a la coccidioidomicosis y hembras gestantes, las esférulas son ingeridas por los macrófagos alveolares, donde bloquean la fusión fago-lisosoma para evitar su destrucción, desarrollando posteriormente la enfermedad pulmonar severa y frecuentemente presentan diseminación (5).

Este hongo puede comprometer otros órganos, tales como: riñones, músculos, huesos, articulaciones, sistema nervioso central, bazo y piel (15, 17). Cabe mencionar que la enfermedad puede afectar a nódulos linfáticos hiliares, favoreciendo la formación de abscesos focales y ocasionalmente la aparición de granulomas. Al progresar estas lesiones, aparecen áreas de cavitación y de caseificación encontrando exudado purulento, se observan necrosis caseosa, calcificaciones, zonas de hemorragias y engrosamiento de la pleura, proporcionándole un color blanquecino (18, 19).

Microscópicamente, con la tinción de ácido peryodico de Schiff (PAS) pueden observarse macrófagos o células gigantes que contienen esférulas de 20 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro con dos paredes delgadas y en cuyo interior se observan endosporas. Es común observar granulomas que se caracterizan por un centro necrótico, no constante, rodeado por células epitelioides alternadas con células gigantes de tipo Langerhans, también se pueden observar linfocitos y puede estar rodeado por fibroblastos (18, 19)

Las manifestaciones clínicas con que se presenta esta enfermedad en los perros son tres: la coccidioidomicosis primaria o pulmonar, la coccidioidomicosis

La forma primaria de la enfermedad presenta signos tales como tos, fiebre, pérdida de peso y congestión en vías respiratorias, además se pueden observar las lesiones neumónicas, a través de radiografías (12).

Dichas neumonías presentan procesos de curso agudo con infiltrados pulmonares localizados, que tienen signos semejantes a los de una neumonía bacteriana como fiebre, dolor torácico, expectoración purulenta, hemoptisis y disnea (12, 18).

La coccidioidomicosis primaria no cuenta con signos específicos, porque todos los signos presentes pueden encontrarse en otras enfermedades, por lo que resulta difícil diagnosticarla sin el apoyo de técnicas de laboratorio.

La forma diseminada de esta micosis es más agresiva, debido a que en esta presentación las esférulas que hasta ese momento permanecían en el pulmón, son transportadas por vía sanguínea, teniendo la posibilidad de infectar cualquier órgano, disminuyendo de forma parcial o total la capacidad para realizar su función. Los signos presentes y la severidad de la enfermedad en esta fase dependen directamente del órgano infectado, llegando a poner en riesgo la vida del hospedero. Se han observado casos de animales con osteomielitis y meningitis provocadas por la coccidioidomicosis diseminada (12, 20). Un diagnóstico de laboratorio acertado de la forma diseminada de esta enfermedad juega un rol importante, ya que como se mencionó antes, los signos son tan inespecíficos que el médico veterinario puede confundirla fácilmente con otros problemas, que también suelen ser crónicos (2). El diagnóstico diferencial se realiza con tuberculosis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis, blastomicosis y distemper canino (18, 19).

La coccidioidomicosis puede diagnosticarse por diferentes métodos, de entre los cuales el aislamiento es el más seguro (15). Sin embargo, es importante mencionar que cuenta con diferentes desventajas, debido a que es la técnica que mayor tiempo requiere, por el lento crecimiento de los hongos, además de que las técnicas para obtener muestras y hacer el aislamiento son bastante invasivas. Otro punto en contra se presenta por la poca cantidad de esférulas que permanecen en la zona afectada (4, 15). Por último, debemos hacer notar que un aislamiento no es indicativo de que el principal problema en un paciente sea el provocado por el hongo, ya que este puede ser secundario y enmascarar el problema principal (21). Por otro lado, existen pruebas que pueden llegar a ser mucho más rápidas que el aislamiento, dentro de las cuales podemos mencionar: técnicas moleculares de laboratorio, intradermoreacción y pruebas serológicas.

Entre las principales técnicas moleculares para determinar la presencia de *Coccidioides spp.* en un paciente se encuentran: la hibridación tipo southern, esta es muy específica pero poco sensible y con un costo elevado para poder trabajar en el laboratorio de diagnóstico; y la reacción en cadena de la polimerasa, que es muy utilizada debido a que es muy sensible, pero presenta una baja especificidad, por lo que este tipo de pruebas no han podido desplazar al diagnóstico serológico. (2, 15, 22).

La intradermoreacción es la técnica que se ha trabajado por excelencia para realizar estudios epidemiológicos, en los cuales se determina la prevalencia de la enfermedad en zonas endémicas y no endémicas. La reacción inmunológica de esta prueba puede permanecer por años, sin que esto sea un indicativo de que un animal este enfermo. En sujetos con coccidioidomicosis pulmonar progresiva

crónica, la reactividad a la intradermoreacción de *Coccidioides spp.*, quizá nunca surja o se desvanezca, además que hay supresión inespecífica de la reactividad a las intradermoreacciones repetidas (5).

Las pruebas serológicas son efectuadas para determinar la presencia de anticuerpos contra *Coccidioides spp.*, y su uso ha sido de gran ayuda en el diagnóstico debido a que son muy rápidas y de bajo costo. Entre estas pruebas podemos mencionar: precipitación en tubo capilar, inmunodifusión doble en gel agar y fijación de complemento (2, 15).

Históricamente, la serología ha sido la herramienta más utilizada para llegar al diagnóstico de esta enfermedad y posteriormente a un tratamiento adecuado. Para determinar la presencia de anticuerpos, debemos considerar la etapa en que se encuentre la enfermedad, el tipo de prueba diagnóstica y del tipo de inmunoglobulina que deseamos detectar, puesto que los anticuerpos aparecen a las dos o tres semanas de iniciada la infección, pero pueden permanecer durante meses y hasta por algunos años (23). Por otro lado, también hay que tomar en cuenta la presencia de reacciones cruzadas que puede haber con otros microorganismos, por ejemplo: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces spp.*, y *Aspergillus spp.*, que son los microorganismos que presentan con mayor frecuencia esta reacción (6). Estas raramente se presentan en la prueba de fijación de complemento cuando se enfrenta un suero positivo a histoplasmosis contra el antígeno de coccidioidomicosis y cuando se llega a encontrar una reacción cruzada, los títulos son muy bajos. Por otra parte, la reacción es más común cuando esta se da entre un paciente positivo a coccidioidomicosis y se enfrenta contra un antígeno de *Histoplasma capsulatum* o *Blastomyces spp* (23).

Para determinar la presencia de anticuerpos contra *Coccidioides spp.*, en suero de perro, en el presente trabajo se propuso la prueba de fijación de complemento utilizando la técnica del 100% de hemólisis descrita por Cunningham *et al.*, (24) y alternamente se trabajó la prueba de inmunodifusión doble en gel agar, como referencia para corroborar la veracidad de los resultados obtenidos en la prueba de fijación de complemento. La razón por la que se decidió utilizar a la prueba de fijación de complemento, para determinar la presencia de anticuerpos en el suero de perro, es que al ser una prueba cualitativa y cuantitativa puede ser usada en trabajos posteriores para el diagnóstico de la coccidioidomicosis, así como para el monitoreo del curso de la enfermedad en pacientes sometidos a algún tratamiento contra esta enfermedad. La prueba fijación de complemento es sensible contra IgG, este grupo de inmunoglobulinas es muy importante para el diagnóstico, ya que su presencia es un indicativo de que un individuo ha estado en contacto frecuente con antígenos del hongo, causado por infección crónica en individuos que estuvieron en contacto con el hongo sin desarrollar la enfermedad. Otras pruebas son capaces de detectar inmunoglobulinas de tipo IgG e IgM, siendo este último un isotipo de inmunoglobulinas que sólo se secreta en gran cantidad durante las primeras dos a tres semanas de la enfermedad disminuyendo conforme se hace el cambio a IgG (7). Cabe mencionar que los anticuerpos de tipo IgG se subdividen en cuatro clases, estos son: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y cada uno tiene diferente actividad fijadora del complemento siendo dentro de este grupo las más importantes las IgG3, posteriormente le siguen las inmunoglobulinas IgG1 e IgG2 y por último la subclase IgG4 que es la única que no presenta esta actividad (25). Esto, cobra mayor importancia en la prueba de

fijación de complemento, por que dependiendo del individuo, la raza y la especie podría ser que se secretara en mayor cantidad, llegando a interferir en el resultado de la prueba, de tal manera que nos pudiera proporcionar un resultado falso negativo(7).

### **JUSTIFICACIÓN**

La prueba de fijación de complemento es útil en el diagnóstico de diferentes enfermedades, motivo por el cual se propone, su uso para determinar la presencia de anticuerpos contra coccidioides en sueros de perros, provenientes de zonas endémicas. Y posteriormente, ser utilizada en el diagnóstico de la enfermedad.

## **HIPÓTESIS.**

La prueba de fijación de complemento al 100 % de hemólisis, es una herramienta útil para determinar la presencia de anticuerpos contra *Coccidioides* spp., en perros de las zonas endémicas de México.

### **OBJETIVO GENERAL.**

Determinar la presencia de anticuerpos contra *Coccidioides* spp., en el suero de perros de zonas endémicas de México, mediante el análisis de muestras en pruebas pareadas y demostrar el funcionamiento de la prueba fijación de complemento.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Evaluar 3 antígenos diferentes mediante la prueba de inmunodifusión doble en gel agar, para utilizar uno, en la elaboración del suero control positivo y en la prueba de fijación de complemento.
- Elaborar antisueros control positivo en conejo, para la estandarización de la prueba de fijación de complemento.
- Obtener y titular complemento para la prueba de fijación de complemento.
- Elaborar y titular hemolisina para la prueba de fijación de complemento.
- Estandarizar la prueba de fijación de complemento para determinar si existen anticuerpos en sueros problema provenientes de perros sospechosos y de animales clínicamente sanos, contra *Coccidioides* spp.
- Realizar la prueba de inmunodifusión doble en gel agar para comparar los resultados obtenidos en ésta con los de la prueba de fijación de complemento.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

Para el desarrollo de las pruebas, se obtuvieron y estandarizaron los siguientes elementos: antígeno del hongo *Coccidioides* spp., suero control positivo, suero control negativo, solución salina amortiguadora con trietanolamina, hemolisina, glóbulos rojos de ovino, complemento y las muestras problema (Apéndice 1-5).

### **Antígenos.**

En este trabajo se utilizaron tres antígenos, uno elaborado en el laboratorio de Diagnóstico Micológico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, identificado como AFMVZ, para el cual se siguió la metodología que se describe a continuación:

En una botella Roux con medio infusión cerebro-corazón adicionado con 10 % de glucosa se inoculó el hongo, este medio fue incubado durante 15 días a 25° C. Al término de la incubación el cultivo se inactivó con tolueno y se separó el medio de cultivo del micelio del hongo; el medio se filtró a través de una membrana de 0.22 µm y posteriormente fue purificado mediante un proceso de diálisis utilizando una membrana con tamaño de poro 10,000 mM; por último el antígeno se concentró a 5.0 mg/ml, la concentración se evaluó, mediante la técnica de Bradford (23).

El segundo antígeno utilizado, fue uno comercial elaborado por el Laboratorio Birmex, identificado como ABMX.

El tercer antígeno se elaboró en el Laboratorio de Micología Básica, del Departamento de Micología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, según el método descrito por Toriello et al. (1991) (26), éste fue

identificado como AFM. Para su uso, se midió la concentración de proteína y se ajustó a 5.0 mg/ml con ayuda de la técnica de Lowry. Los tres antígenos utilizados, provenían del sobrenadante de cultivos miceliales de *Coccidioides* spp.

Para determinar que antígeno se usaría en la elaboración del antisuero y durante la prueba de fijación de complemento, los tres antígenos se sometieron a la prueba de inmunodifusión doble en gel agar, donde se enfrentaron a un suero positivo, para poder observar una reacción antígeno anticuerpo, este suero se elaboró en conejo y fue proporcionado por el Laboratorio de Micología Básica del Departamento de Micología y Parasitología de la FM-UNAM. Después de correr las pruebas, se utilizó el antígeno que demostró ser capaz de proporcionar una respuesta positiva.

La inmunodifusión doble en gel agar, se trabajó en portaobjetos cubiertos con agar, adicionado con 7.5 % de glicerina utilizando el diagrama descrito para la prueba de Outchterloney (27).

En los pozos periféricos 2, 3, 5 y 6 se agregaron los antígenos, en el pozo 1 se depositó solución salina y en el 4 se colocó el suero negativo; 30 minutos después de haber depositado los antígenos, se colocó el suero positivo en el pozo central, la laminilla se incubó durante 24 - 48 horas en una cámara húmeda en refrigeración; al cumplirse el tiempo de incubación la laminilla se lavó en dos tiempos, el primer lavado se realizó con solución de citrato de sodio al 5 % pH 7.0 durante 48 horas y el segundo con solución salina fisiológica pH 7.0 por 30 minutos. Realizando la lectura de los portaobjetos después de secarse (26, 28).

## **Sueros Control Positivo.**

Para la elaboración del antisuero se inoculó un antígeno de *Coccidioides spp.*, de manera sistémica en animales de laboratorio para desencadenar una respuesta inmune humoral.

Este antisuero se produjo en 4 conejos Nueva Zelanda, hembras, no gestantes, de 2.0 Kg de peso, clínicamente sanas a las cuales se les realizó un sangrado basal para confirmar que no tuvieran anticuerpos contra *Coccidioides spp.*, y posteriormente se monitoreó la seroconversión, mediante la prueba de inmunodifusión doble en gel agar (26).

Para la producción se utilizaron dos protocolos de inmunización, el primero descrito por Tully *et. al.* (1983) (29) y el segundo utilizado en el laboratorio de Micología básica de la FM-UNAM (26).

En el primer protocolo para la obtención del antisuero, se inoculó el antígeno elaborado en la FM-UNAM en dos conejas, llevando a cabo el siguiente calendario de inmunización:

El inóculo se preparó mezclando en un homogeneizador, 4.0 ml la suspensión del antígeno y 4.0 ml adyuvante completo de Freund<sup>1</sup>, agitando con la ayuda de un homogeneizador para obtener una emulsión (29). Las inmunizaciones se realizaron en cada coneja el día cero, por tres vías diferentes: subcutánea en los cojinetes de los miembros torácicos y pélvicos, el volumen utilizado fue de 0.2 ml en cada cojinete, 0.5 ml del antígeno intramuscularmente en los miembros

---

<sup>1</sup> Adyuvante completo de Freund, Sigma-Aldrich®

torácicos y pélvicos y por último 0.1 ml en ocho puntos del dorso de manera intradérmica.

A los 21 días se inocularon nuevamente ambos animales por vía intramuscular en los miembros torácicos y pélvicos. El día 22 se realizó el sangrado en blanco por punción cardíaca, de las conejas previamente anestesiadas, para después separar y obtener la mayor cantidad de suero (Cuadro 1).

Cuadro 1: Calendario de inmunización de conejas con antígeno de *Coccidioides* spp. Tully *et. al.* 1983

Día	Sitio de inoculación	Volumen Inoculado	Indicaciones
0			Sangrado basal
0	Cojinete plantar y palmar	0.2 ml c/u	Se inocula en el centro de los cojinetes plantares y palmares
0	Intramuscular	0.5 ml c/u	En miembros torácicos y pélvicos derecho e izquierdo.
0	Intradérmico	0.1 ml c/u	En ocho sitios en el dorso
21	Intramuscular	0.5 ml c/u	Muestreo. Inoculación en miembros torácicos y pélvicos derecho e izquierdo.
22			Sangrado en blanco

En el segundo protocolo también se aplicó el antígeno elaborado en la FM-UNAM en dos conejas, este se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se mezclaron 0.5 ml de antígeno con 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund formando una emulsión de la manera que se menciona en el primer protocolo de inmunización, con un volumen final de 1.0 ml para cada inoculación.

El esquema de inmunización seguido fue el siguiente: se realizó un sangrado basal y la primer inoculación fue el día cero por vía subcutánea, posteriormente se inoculó de igual forma, en los días 3, 7, 10, 14, 17. El volumen de antígeno aplicado en cada una es de 1.0 ml (Cuadro 2).

Cuadro 2: Calendario de inmunización de conejas con antígeno de *Coccidioides* spp. FM, UNAM

Inmunización	Semana	Día	Vía de inoculación	Volumen de antígeno
1	1	0	Subcutánea	1.0 ml
2	1	3	Subcutánea	1.0 ml
3	2	7	Subcutánea	1.0 ml
4	2	10	Subcutánea	1.0 ml
5	3	14	Subcutánea	1.0 ml
6	3	17	Subcutánea	1.0 ml

El monitoreo se realizó a los 7 días después de haber realizado la sexta inoculación.

Este esquema se repitió una vez más en las mismas conejas teniendo un intervalo de descanso de 15 días entre cada ciclo de inmunizaciones. La obtención del suero hiperinmune fue a través de sangrado en blanco por punción intracardiaca, previa anestesia. Se realizaron alícuotas de 1.0 ml de este suero, las cuales se identificaron y se mantuvieron en congelación a  $-20^{\circ}$  C hasta su uso en las pruebas (26).

### **Sueros Control Negativo.**

El suero control negativo se obtuvo de conejos serológicamente negativos a *Coccidioides* spp, en las pruebas de FC' e IDGA; Este se obtuvo por punción cardiaca, previa anestesia. Éste se envasó en tubos estériles con capacidad para 1.5 ml, los tubos se identificaron y se conservaron en congelación a  $-20^{\circ}$  C hasta la realización de las pruebas.

## Hemolisina.

La hemolisina se elaboró según el esquema descrito por la FAO, (1984) (30), con glóbulos rojos obtenidos de diez borregos y procesados de la siguiente forma: se obtuvieron 300 ml de sangre con anticoagulante Alsevers (Apendice 2), a una dilución 1:2, mediante punción de la vena yugular.

Los 300 ml de sangre se hemolizaron agregando el mismo volumen de agua destilada en un matraz y agitando constantemente la mezcla.

Posteriormente se centrifugó a 10,000 g durante 10 minutos, al termino del ciclo se eliminó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en agua destilada nuevamente. Este procedimiento se repitió hasta que el sobrenadante se observó transparente, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se mezcló con 200 ml de solución salina fisiológica con pH 7.2 a 7.4 (30).

Ésta suspensión fue inoculada en 2 conejos Nueva Zelanda, hembras, no gestantes, de 2 Kg de peso, clínicamente sanos, llevando a cabo el calendario de inmunización descrito en el cuadro 3.

Cuadro 3. Inoculación y sangrado de los conejos para la elaboración de hemolisina.

<b>Día.</b>	<b>Inoculación.</b>	<b>Vía(s) de inoc.</b>	<b>Dosis.</b>	<b>Monitoreo.</b>
0	1	IV.	1 ml.	Sangrado basal
2	2	IV, IM.	1 ml, 1 ml.	
4	3	IV, IM.	2 ml, 2 ml.	Monitoreo.
6	4	IV, IM.	2 ml, 2 ml.	Monitoreo.
8	5	IV, IM.	2 ml, 3 ml.	Monitoreo.
10	6	IV, IM.	2 ml, 4 ml.	Monitoreo.
12	7	IV, IM.	2 ml, 4 ml.	Monitoreo.

Las muestras obtenidas en los monitoreos se titularon para determinar en que momento se realizaría el sangrado en blanco (30).

Después de la sangría de los conejos, se separó el suero y se inactivó a una temperatura de 56° C a 60° C durante 30 min; ya inactivado, el suero se diluyó en glicerol 1:2

La hemolisina obtenida se conservó en frascos con un volumen de 5 ml cada uno, resguardados a temperatura de congelación a -20° C (30).

### **Complemento.**

Para la obtención del complemento se utilizaron 5 cobayos, los cuales previa anestesia fueron sangrados en blanco por punción cardiaca; una vez obtenida la sangre, se depositó en cajas de Petri para que se formara el coágulo y se separara el suero; ya separado el suero, este se colectó y se centrifugó durante 5 min a 1500 g para posteriormente envasarlo en viales con 0.5 ml, los que se conservaron en congelación a -20° C (30).

Cabe mencionar que todos los procedimientos realizados en este trabajo, en donde se utilizaron animales de laboratorio fueron con base en la Norma Oficial Mexicana "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" NOM-062-ZOO-1999 (31).

### **Titulación del complemento y la hemolisina.**

Durante la prueba de fijación de complemento la actividad biológica del complemento está directamente relacionada con la de la hemolisina, por lo que

para este trabajo las titulaciones de ambos elementos se realizaron al mismo tiempo, para esto se utilizó el método descrito por Cunningham (1971) modificado por Corona (2008) (24, 32).

De una solución madre de hemolisina 1:100 se realizaron en once tubos de ensaye 13 X 100, diluciones dobles seriadas y en pasos en SSAT para obtener las siguientes concentraciones:

1/1,000; 1/2,000; 1/3,000; 1/4,000; 1/5,000; 1/6,000; 1/8,000; 1/10,000; 1/12,000; 1/16,000 y 1/20,000.

A todos los tubos se les agregó 0.4 ml de SSAT, 0.2 ml complemento de cobayo previamente diluido 1/20 y 0.2 ml de GR ovino al 2 % (Apéndice 3).

En otra serie de 10 tubos se agregó C' diluido 1/20 en las siguientes cantidades por tubo:

0.02 ml; 0.04 ml; 0.06 ml; 0.08 ml; 0.10 ml; 0.12 ml; 0.14 ml; 0.16 ml; 0.18 ml y 0.20 ml.

Después se le agregó a cada tubo el volumen de SSAT necesario para obtener un volumen 0.6 ml, posteriormente se incubó toda la gradilla en baño María a 37° C por 60 min, realizando la lectura de la hemolisina a los 30 min, esto para obtener el título, el cual es la última dilución en la que se observa el 100% de hemólisis y por lo tanto, se puede decir que también se encuentra una unidad de hemolisina.

Posteriormente, se preparó el sistema hemolítico tomando en cuenta el título de la hemolisina para poder proporcionar dos unidades hemolíticas, se incubó por 30 min en baño María a 37 °C junto con los tubos de complemento. Al término de la incubación se agregaron 0.4 ml de sistema hemolítico a los tubos de complemento y se incubaron por 30 min más.

La lectura de la titulación del complemento se realizó buscando el tubo con menor cantidad de complemento en el que se pudo observar un 100 % de hemólisis, que indica que en esa dilución se encuentra una unidad de complemento (Apéndice 4).

### **Glóbulos rojos de ovino.**

Esta es una suspensión de eritrocitos de ovino concentrados al 2 % (Apéndice 3) y estandarizados mediante el uso de espectrofotometría para medir la densidad óptica, utilizando luz visible con una longitud de onda de 540 nm (33).

### **Titulación del antígeno**

Para la titulación del antígeno se realizaron diluciones desde 1/100 hasta 1/1200, cada dilución se enfrentó suero control positivo y el negativo. La prueba incluyó controles anticomplementarios para cada suero y los correspondientes a los otros elementos incluidos en la prueba como se muestra a continuación:

A las diluciones de suero positivo y negativo, Ag-C' y C' se les agregó 0.2 ml de Ag; a los controles anticomplementarios se les agregó 0.2 ml de SSAT. Posteriormente se agregaron 0.2 ml con 2 U de complemento excepto a las columnas de los controles de Ag y SH. Los tubos se incubaron en baño María a 37° C por 60 minutos junto con el SH. Después se agregó 0.4 ml del sistema hemolítico a todos los tubos de la gradilla y se incubó por 30 minutos más. La dilución del Ag que se seleccionó fue aquella en la cual se observó una clara diferencia entre una reacción positiva y una negativa, así como la reacción esperada en cada uno de los controles (Apéndice 5).

## **Procesamiento de las muestras.**

Para la prueba de fijación de complemento, se obtuvieron muestras de suero de perro, a partir de sangre periférica extraída de la vena radial de cada uno de los animales muestreados.

Las muestras se obtuvieron con tubos vacutainer sin anticoagulante, se conservaron a temperatura ambiente por 20 min y después fueron refrigeradas hasta llegar al laboratorio, donde se centrifugaron a 1500 g durante cinco minutos. Al término de este tiempo se extrajo el suero y se resguardó en viales, en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de la prueba.

## **Prueba de Fijación de Complemento.**

Las muestras se descongelaron y a todos los sueros se les dio un tratamiento anticomplementario previo a la prueba el cual consistió en lo siguiente:

Se realizó una dilución 1:2 en SSAT con 7 % de complemento; se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora; al término de la hora se sometieron a otro proceso de incubación de  $56^{\circ}\text{C}$  a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.

Una vez inactivado el complemento de los sueros, se procedió a trabajar las pruebas de fijación de complemento. Estas se realizaron en microplacas de 96 pozos, de donde se utilizaron seis pozos en fila, cuatro para realizar las diluciones de prueba que correspondieron a las siguientes: pozo 1: 1/2, pozo 2: 1/4, pozo 3: 1/8 y pozo 4: 1/16 y los pozos 5 y 6 para controles anticomplementarios. En cada placa se colocaron los siguientes controles de prueba: control de complemento,

control de antígeno, control de antígeno-complemento y control del sistema hemolítico, asignado para cada uno, dos pozos.

Para las diluciones de los sueros, se agregaron 0.025 ml de SSAT en los pozos 2, 3 y 4, también el pozo 6 así como en el control de prueba antígeno; en los controles de prueba de antígeno y complemento, se depositaron 0.050 ml de SSAT y en el control de sistema hemolítico se depositaron 0.075 ml de SSAT.

En el pozo 1 y en el pozo 5, se depositaron 0.05 ml suero; se tomaron 0.025 ml de suero del pozo 1 y se depositaron en el pozo 2; se homogenizó; el paso anterior se repitió tomando 0.025 ml de dilución del pozo receptor y depositándolo en el pozo siguiente de la fila repitiendo este paso hasta el pozo 4 de fila de trabajo, de donde se tomaron 0.025 ml y se eliminaron. Se obtuvo un volumen final de 0.025 ml, en los cuatro pozos; posteriormente se tomaron 0.025 ml de suero del pozo 5 y se depositaron en el pozo 6 de la misma fila; se homogenizó; se agregaron 0.025 ml de SSAT a los pozos 5 y 6.

Ya realizadas las diluciones de los sueros, se agregaron 0.025 ml de antígeno a cada pozo y a los pozos de controles de antígeno y antígeno complemento.

Inmediatamente después se agregaron 0.025 ml de complemento, a todos los pozos excepto a los pozos de control de antígeno y de sistema hemolítico.

Las placas se incubaron durante 60 minutos a 37° C, en el transcurso de este tiempo se preparó el sistema hemolítico y se incubó junto con las placas, hasta que se terminó el tiempo de incubación de éstas. El tiempo de incubación del SH fue de 30 minutos y se homogenizó suavemente cada 15 minutos.

Al terminar el tiempo de incubación se retiró el sistema hemolítico del baño María, se homogeneizó y se agregaron 0.05 ml a todos los pozos de las placas, éstas se

homogeneizaron con golpecillos suaves en los lados y se incubaron 30 minutos a 37° C en baño María.

La lectura de la prueba se realizó a partir de los primeros 5 minutos después de haber iniciado el ciclo de incubación y cada cinco minutos después hasta que los controles trabajaron o hasta que se completaron los 30 minutos.

### **Tratamiento Anticomplementario.**

Además del tratamiento anticomplementario que inicialmente se les realizó a los sueros, a aquellos que mostraron actividad anticomplementaria, se les dio un tratamiento anticomplementario alterno, el cual consistió en diluir los sueros volumen a volumen, en cloroformo e incubarlos durante 20 minutos. Al término del tiempo de incubación, los sueros fueron centrifugados durante 5 min a 1500 g, se recuperó el sobrenadante con cuidado de no coleccionar el sedimento ni el cloroformo, el sobrenadante se diluyó 1/2 en SSTA al 5% de albúmina sérica bovina y 20% de complemento de cobayo. Después se incubó en baño María a 37° C durante una hora y a 56° C – 60° C durante 30 minutos, al terminar este tiempo se procedió a trabajar la prueba de FC' (34).

### **Prueba de Inmunodifusión Doble en Gel Agar.**

Para esta prueba se utilizó el AFM y el control positivo elaborado en la FMVZ-UNAM para la prueba de FC'. Esta prueba se trabajó de la misma manera como se describe en la sección "Antígenos", cambiando únicamente la disposición de estos como se describe a continuación:

En los pozos periféricos 2, 3, 5 y 6 se agregaron muestras; en el pozo 1 se colocó el suero positivo y en el 4 se colocó el suero negativo (26, 28).

## Muestras

Los sueros evaluados en este trabajo se obtuvieron de dos estados de la República (Sonora y Chihuahua) y el Distrito Federal. Las muestras de cada estado se dividieron en dos grupos: las obtenidas de animales llevados a clínicas veterinarias y las obtenidas de animales remitidos a centros antirrábicos. El tamaño de muestra tomado fue de 106 de centros antirrábicos y 78 de perros de clínicas.

Las muestras obtenidas de los estados de Sonora y Chihuahua, considerados como endémicos, fueron las problema y las obtenidas en el Distrito Federal, considerado como no endémico o libre y se utilizaron como controles negativos.

Las muestras se distribuyeron como se indica en el cuadro 4.

Cuadro 4: Sueros de perros de clínicas y de centros antirrábicos.

<b>ESTADO</b>	<b>CLÍNICA</b>	<b>ANTIRRÁBICO</b>	<b>TOTAL</b>
Chihuahua y Sonora	30	46	76
Distrito Federal	48	60	108

## RESULTADOS

### Antígenos

Los antígenos, utilizados en la prueba de inmunodifusión doble en gel agar, nos dieron los siguientes resultados (Cuadro 5):

Cuadro 5: Resultados de obtenidos en las pruebas de inmunodifusión doble en gel agar para elección del antígeno.

Antígeno	Inmunodifusión doble en gel agar
FMVZ	Negativo
ABMX	Negativo
AFM	Positivo

El antígeno de *Coccidioides* spp producido en el laboratorio de micología básica del departamento de micología y parasitología de la FM-UNAM, fue el único que reaccionó con el suero positivo durante la prueba (Cuadro 5), utilizándolo para la elaboración del suero control positivo, así como para las pruebas de fijación de complemento e inmunodifusión doble en gel agar.

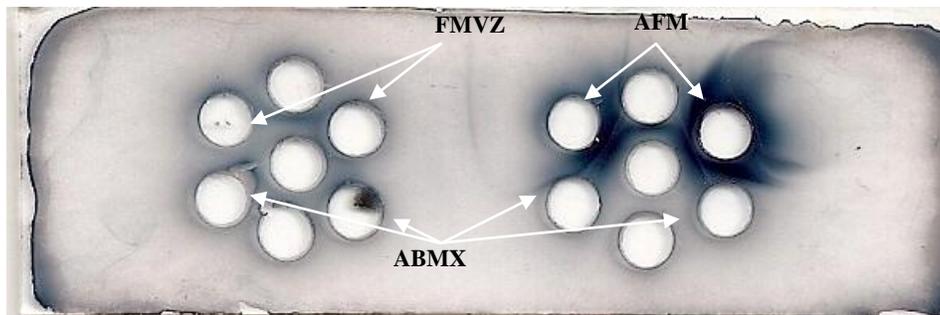


Figura 2: Prueba de inmunodifusión doble en gel agar, donde se observa una reacción Positiva en los pozos del antígeno AFM

## Suero Control Positivo

El antisuero producido para la realización del trabajo fue usado como suero control positivo y se evaluó mediante las pruebas de fijación de complemento e inmunodifusión doble en gel agar para comprobar la seroconversión, lo cual se representa en el cuadro 6.

Cuadro 6: Seroconversión en los diferentes calendarios de inmunización.

Calendario de inmunización	Fijación de complemento	Inmunodifusión doble en gel agar
Tulli <i>Et all.</i>	1/16 ( + )	Positivo
FM	1/32 ( + )	Positivo

El antisuero obtenido mediante el protocolo recomendado por el Laboratorio de Micología Básica del Departamento de Micología y Parasitología de la FM-UNAM, fue el que se eligió para la prueba ya que fue el que tuvo mejor seroconversión.

## Hemolisina

La hemolisina producida nos dio un título de 1/10,000. Esto quiere decir que podemos diluir nuestra hemolisina 10,000 veces y en el volumen final obtendremos una unidad de hemolisina (cantidad suficiente para sensibilizar al 100 % de una suspensión de glóbulos rojos de borrego preparada al 2 %). Para la prueba se requieren dos unidades de hemolisina por lo que se utilizó la dilución 1/5,000.

## **Complemento**

El complemento utilizado para este trabajo tuvo un 100 % de hemólisis hasta el tubo donde se agregaron 100 µl de complemento, lo que quiere decir que en este tubo hay una unidad de complemento. Al igual que en la hemolisina, de complemento se necesitan 2 unidades de complemento.

## **Titulación del Antígeno**

Para la titulación del antígeno se utilizaron suero control positivo y suero control negativo. La dilución seleccionada del antígeno fue aquella en la que se observó sedimentación en las diluciones del suero positivo y hemólisis en las diluciones de los controles anticomplementarios del mismo; y hemólisis tanto en las diluciones del suero negativo como en sus controles anticomplementarios, y en los controles utilizados para la titulación los siguientes resultados:

- Control de complemento: hemólisis
- Control de sistema hemolítico: sedimentación
- Control de antígeno: sedimentación
- Controles de antígeno-complemento: hemólisis.

El antígeno AFM tuvo un título de 1/600, por lo que fue utilizada esta dilución para la prueba de fijación de complemento.

## Resultados de las Muestras.

### Prueba de Fijación de Complemento

La lectura de la prueba de fijación de complemento se realizó de igual manera que la titulación del antígeno, cabe mencionar que para realizar la lectura de las muestras fue necesario revisar primero los controles; se procedió a realizar la lectura ya que los resultados fueron los esperados, considerando satisfactoria la prueba. Los resultados obtenidos se describen en el cuadro 7.

Cuadro 7: Resultados de la prueba de Fijación de Complemento de sueros de perros muestreados, de zonas endémicas, y de una zona no endémica de México.

<b>Prueba de Fijación del Complemento</b>			
Sueros de perros muestreados en clínicas			
Resultados			
Procedencia	Positivos	Negativos	Anticomplementarios
Chihuahua y Sonora	1/30 (3.3 %)	21/30 (70.0 %)	8/30 (26.6 %)
Distrito Federal	0/48 (0 %)	11/48 (22.9%)	37/48 (77.0%)
Sueros de perros muestreados en centros antirrábicos			
Resultados			
Procedencia	Positivo	Negativo	Anticomplementarios
Chihuahua y Sonora	2/46 (4.3 %)	11/46 (23.9 %)	33/46 (71.7 %)
Distrito Federal	4/60 (6.6 %)	51/60 (85.0%)	5/60 (8.3%)

### Inmunodifusión Doble en Gel Agar

La interpretación de la prueba de IDGA es de manera cualitativa, es decir sólo se obtiene resultado positivo o negativo.

Se considera positivo si se presentan líneas de precipitación en el agar entre el pozo central y el o los de la periferia, lo que indica que hubo reacción antígeno-anticuerpo, confirmándose así la presencia de anticuerpos contra *Coccidioides* spp. Por otro lado, la reacción negativa es la ausencia de líneas de precipitación (Cuadro 8).

Cuadro 8: Concentrado de resultados de la prueba de Inmunodifusión Doble en Gel Agar en sueros de perros de zonas endémicas, y de una zona no endémica de México.

<b>Prueba de Inmunodifusión Doble en Gel Agar</b>		
Sueros de perros muestreados en clínicas		
Resultados		
Estados	Positivo	Negativo
Chihuahua y Sonora	2/30 (6.6 %)	28/30 (93.3%)
Distrito Federal	1/48 (2.0 %)	47/48 (97.9 %)
Sueros de perros muestreados en centros antirrábicos		
Resultados		
Estados	Positivo	Negativo
Chihuahua y Sonora	6/46 (13.0%)	40/46(86.9 %)
Distrito Federal	4/60(6.6 %)	56/60(93.3 %)

En resumen, se obtuvieron 7 animales positivos, 94 animales negativos y 83 anticomplementarios para la prueba de Fijación del Complemento, mientras que en la prueba de inmunodifusión doble en gel agar se observaron 13 animales positivos y 171 animales negativos.

## DISCUSIÓN

El antígeno utilizado en la prueba fue el AFM, debido a que con este se obtuvieron reacciones positivas en las pruebas realizadas. El antígeno ABMX no fue utilizado ya que no presentó reacción al ser enfrentado contra el suero control positivo, (7) el antígeno AFMVZ no presentó reacción en ninguna de las dos pruebas a las que se sometió, lo que se contrapone a lo reportado por Pappagianis *et al* (1990), (23). En 1997, Toriello *et al*, mencionan que los antígenos crudos actúan mejor en pruebas de coccidioidina e inmunodifusión doble en gel agar, mientras que los antígenos purificados sirven mejor en las pruebas de intradermoreacción. Los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto al uso del antígeno AFM están respaldados por el estudio de Hernández (2009), (4) en el cual menciona que los antígenos de *Coccidioides* spp. denominados crudos, contienen una cantidad de mezcla antigénica de proteína y carbohidratos que varía entre cada lote de antígeno, por lo que se estandarizó la cantidad de proteína y de carbohidratos presentes en éste, para poder obtener una coccidioidina que produzca una mayor actividad biológica.

AFM es un antígeno crudo preparado de un filtrado micelial de *Coccidioides* spp., probado constantemente durante el análisis de intradermoreacción y en la prueba de inmunodifusión doble en gel agar, en esta última enfrentándolo contra anticuerpos específicos contra esta especie de hongos, (4) este antígeno presentó un efecto anticomplementario durante su titulación, hasta la dilución 1/10, este efecto es reportado en antígenos crudos obtenidos de micelios, pero para el

presente trabajo este efecto se eliminó al disminuir su concentración, obteniendo una dilución de trabajo de 1/600.

La prueba de fijación de complemento es la prueba que más se ha utilizado para el diagnóstico de la coccidioomicosis en humanos, debido a que con ella se puede determinar la presencia de inmunoglobulinas de tipo IgG. Éstas aparecen a partir de la segunda semana después del inicio de la infección, permaneciendo por meses en pacientes con la enfermedad en sus diferentes manifestaciones clínicas y no solo durante las tres primeras semanas posteriores al primer contacto con el hongo. Como ocurre con las inmunoglobulinas de tipo IgM, también se sabe que el título de los anticuerpos IgG está directamente relacionado con el grado de infección por lo que la prueba de fijación del complemento es una herramienta adecuada para dar seguimiento de la enfermedad en pacientes durante la administración de tratamientos (3). En el presente trabajo, se observó que a pesar de ser una prueba con bastantes bondades para el diagnóstico de la coccidioomicosis en humanos, la prueba de fijación de complemento no es de utilidad para el diagnóstico en perros. El principal problema es la presencia del fenómeno anticomplementario, el cual no permite observar un resultado satisfactorio debido a que de manera inespecífica inhibe la fijación del complemento por la vía clásica, al estar expuesto a un complejo antígeno-anticuerpo tanto en la fase visible como en la invisible de dicha prueba, arrojándonos a la lectura una sedimentación que se confunde fácilmente con un resultado positivo en cada dilución de la prueba. A pesar de que se han realizado trabajos en los cuales se sometieron sueros de perro a esta misma prueba con resultados adecuados (ausencia de efecto anticomplementario) (23), Shubitz

(2007) reporta que la prueba no se puede trabajar en sueros de perro por la presencia de este efecto (12), En el presente trabajo se realizó la prueba obteniendo títulos de anticuerpos en algunos sueros, aunque también se encontraron resultados negativos en el total de sueros trabajados, encontramos un alto porcentaje de efecto anticomplementario. Por otra parte, los tratamientos anticomplementarios mencionados para el diagnóstico de enfermedades por la Oficina Panamericana de la Salud (11), utilizados para eliminar el fenómeno anticomplementario de los sueros no fueron efectivos, ya que a pesar de poder eliminar en algunos sueros este fenómeno, el resultado no se pudo observar en más del cincuenta por ciento de los sueros tratados de esta manera.

La cantidad de sueros en los cuales se pudo determinar la presencia de anticuerpos contra *Coccidioides* spp., no es despreciable en cuanto al tamaño de muestra, pues si tomamos en cuenta las incidencias reportadas en algunos estudios epidemiológicos de la enfermedad en otras especies, encontraremos que varía mucho, entre un 9 a 80% (35). Por otra parte, es importante saber si en caso de que alguno de los animales muestreados, tuvo contacto con el agente etiológico de la enfermedad, en que etapa de la infección se encuentra, debido a que la presencia de inmunoglobulinas de tipo IgG, aparece varias semanas después de que se da el primer contacto y perduran por meses (5). Mientras que las inmunoglobulinas IgM, aparecen desde la primo infección.

De los resultados positivos obtenidos en el Distrito Federal es necesario determinar si existen reacciones cruzadas con alguna enfermedad de las mencionadas por Papagianis, (1990) (23) y Levine et al. (1975) (6) enfrentando los sueros positivos contra los antígenos mencionados por estos autores, lo cual

no fue posible realizar por falta de antígenos y sueros control. Por ello, no se puede descartar la presencia de estas reacciones en la prueba, a pesar de que también mencionan que la reacción cruzada se presenta cuando se enfrenta un suero positivo a histoplasmosis contra el antígeno de coccidioomicosis y cuando hay una reacción cruzada los títulos son muy bajos. Por otra parte, la reacción es más intensa cuando ésta se da entre un paciente positivo a coccidioomicosis y se enfrenta contra un antígeno de *Histoplasma capsulatum* o *Blastomyces dermatitidis* (23).

## CONCLUSIONES

- El antígeno AFM utilizado durante la estandarización de fue capaz de unirse a anticuerpos contra antígenos de *Coccidioides* spp. en la prueba de fijación de complemento.
- Usando la prueba de fijación de complemento se pudo determinar la presencia de anticuerpos en el suero de perro, pero también se obtuvieron un gran número de resultados anticomplementarios por lo que no podemos decir que esta prueba es una herramienta útil para la determinación de anticuerpos específicos contra *Coccidioides* spp.
- La prueba de inmunodifusión doble en gel agar, puede determinar la presencia de anticuerpos contra *Coccidioides* spp, por ello se sugiere su uso como alternativa para el diagnóstico de coccidioidomicosis en perros.

## REFERENCIAS

1. Castañón OLR, Aroch CA, Bazán ME, Córdoba ME. Coccidioidomicosis y su escaso conocimiento en nuestro país. Rev Fac Med. UNAM 2004; 47(4):145-148.
2. Pier AC, Cabañes FJ, Chermette R, Ferreiro L, Guillot J, Jensen HE, Santurio JM. Prominent animal mycoses from various regions of the world. Medical Mycology. 2000;38 Suppl 1:47-58.
3. Moroyoqui NLA, Figueroa SSR. Coccidioidomicosis. Med Int Mex. 2008;24(2):125-145.
4. Higgins JC, Pusterla N, Pappagianis D. Comparison of *Coccidioides immitis* serological antibody titres between forms of clinical coccidioidomycosis in horses. The Veterinary Journal. 2005:1-6.
5. Laniado-Laborin R. Coccidioidomicosis. Más que una enfermedad regional. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2006;19(4):301-308.
6. Levine DHB, Restrepo MA, Ten ED, Estevens DA. Esferulina y coccidioidina: Reacciones cruzadas con la histoplasmina y la paracoccidioidina en pruebas de sensibilidad cutánea. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 1975:518-524.
7. Mondragón-González R, Méndez-Tovar LJ, Bernal-Vázquez E, Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Ríos-Rosas C, Contreras-Pérez C, Anides-Fonseca AE. Detección de infección por *Coccidioides immitis* en zonas del estado de Coahuila, México. Rev Argent Microbiol. 2005;37:135-138.

8. Fisher MG, 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.
9. Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K, Uehara Y. Novel Approach to Designing Primers for Identification and Distinction of the Human Pathogenic Fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR Amplification. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1859–1862.
10. Restrepo A. *Coccidioides immitis* (Rixford et Gilchrist, 1895), y *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore, 1912) Almeida 1930: Dos hongos patógenos restringidos al continente americano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc* 2006;30(116):367-386.
11. Hector RF, Laniado-Laborin R. Coccidioimycosis-A fungal Disease of the Americas. *Plos Med*. 2005;2(5):15-18.
12. Shubitz LF. Comparative Aspects of Coccidioidomycosis in Animals and Humans. *Rev Iberoam Micol*. 2007;24(4):249-258.
13. Comrie AC. Climate Factors Influencing Coccidioidomycosis Seasonality and Outbreaks. *Environ Health Perspect*. 2005;113(6):688-692
14. McGavin MD, Carlton WW, Zachary JF. *Special Veterinary Pathology 3<sup>a</sup> ed* USA Mosby Elsevier. 2001:165-166,185.
15. Rezusta A, Gil J, Rubio MC, Revillo MJ. Micosis importadas. En: Sociedad Española de *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. Tomado el 23 de Marzo, 2008 desde: [http://www.seimc.org/control/revi\\_Mico/Micoimpor.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Mico/Micoimpor.htm).

16. Tizard IR. Inmunología Veterinaria. 5<sup>a</sup> ed. México D.F. (México):McGraw-Hill Interamericana, 1998:320-321.
17. Converse JL, Reed RE. Experimental Epidemiology of Coccidioidomycosis. Bacteriol Rev. 1996;30(3):678-694.
18. Jones TC, Hunt RD, King NW. Veterinary pathology 6th ed. Williams & Wilki United States of America 1997:510-512.
19. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Patología estructural y funcional 7<sup>a</sup> ed España: Saunders Elsevier. 2006:758-759.
20. Centers for Diseases Control and Prevention Georgia USA Tomado el 16 enero 2010 de:  
<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/coccidioidomycosis/>
21. Pérez J, Carrasco L, Diagnostico histopatológico de micosis en patología veterinaria. Revista Iberoamericana de Micología. 2000;17:18-22.
22. Pontón J. Diagnostico microbiológico de las micosis. Rev Iberoam Micol. 2002;19:25-29.
23. Pappagianis D, Zimmerman BL. Serology of coccidioidomycosis. Clin Microbiol Rev. 1990;3(3):247-268.
24. Cunningham CH. Virología práctica. 6<sup>a</sup> ed. España: Acribia, 1971.
25. Rojas MW. Inmunología. 8<sup>a</sup> ed. Colombia: Corporación para Investigaciones Biologicas, 1978:309.
26. Toriello C, Arjona-Rosado LC, Díaz-Gómez ML, Taylor ML. Efficiency of crude and purified fungal antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic from other respiratory diseases. Mycoses. 1991;34:133-140.

27. Baptista-Rosas RC, Riquelme-Pérez M, Muñiz-Salazar R, Becuar-González C, Arredondo-Ozuna CA, Fernández Garza DA *et al.* Seroprevalencia de anticuerpos contra *Coccidioides* spp. En pacientes con diagnóstico clínico inicial de tuberculosis en Ensenada, Baja California, México. *Bioquímica* [en línea] 2009;34(1)100 [citado 2011-03-08] Disponible en internet: <http://redylac.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?jCve=57613001091.ISSN0185-5751>
28. Hernández NJA, Caracterización del antígeno coccidiodina para la intradermoreacción. (Tesis de licenciatura). D. F. (Ciudad de México) México: FMVZ-UNAM, 2009.
29. Tully JG, Senterfit C, *Mycoplasma Techniques course: Preparation of Mycoplasma antisera.* Bordeaux: International Organization for Mycoplasmaology (IOM). 1983
30. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico, Laboratorios de Investigación y Diagnóstico Veterinario. Chile (Santiago):FAO, 1984:2-3.
31. NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. (Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día Miércoles 22 de Agosto de 2001).
32. Corona VJL. Estandarización de las pruebas de fijación de complemento y aglutinación indirecta para el diagnóstico de micoplasmosis caprinas asociadas a problemas respiratorios en México (Tesis de licenciatura). D. F. (Ciudad de México) México: FM-UNAM, 2008.

33. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B, et. al. Diagnóstico de Brucelosis Animal. 1ª ed. México: SAGARPA, 2001:56-79.
34. Goyenechea HA, González MG. X Adenovirus. Oficina Panamericana de la Salud. Tomado el 15 de noviembre 2009 de:  
[http://www.ops-oms.org/Spanish/AD/THS/EV/labs\\_ipk\\_2.pdf](http://www.ops-oms.org/Spanish/AD/THS/EV/labs_ipk_2.pdf)
35. Baptista RRC, Riquelme M. Epidemiología de la coccidioidomicosis en México  
Rev Iberoam Micol. 2007; 24:100-104.

## APÉNDICES

### Apéndice 1: Solución salina amortiguadora con trietanolamina (solución 5X)

- En un matraz de 1.0 L, disolver 37.5 g de cloruro de sodio (NaCl) en 600 ml de agua destilada.
- Agregar 88.5 ml de ácido clorhídrico (HCl) 1 N y agitar.
- Agregar 14.0 ml de trietanolamina.
- Agregar 0.6 ml de  $MgCl_2$  4.16 M y 0.6 ml de  $CaCl_2$  1.25 M.
- Aforar a 1000 ml con agua destilada.
- La solución 5X se puede conservar en refrigeración por varios meses.

### Solución 1X

- Realizar una dilución 1/5 de la solución 5x con agua destilada.
- Ajustar el pH entre 7.3 – 7.4 con NaOH 7 N o HCl reactivo analítico.

### Apéndice 2: Anticoagulante Alsever

- En un matraz de 1.0 L, disolver 20.5 g de Dextrosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) en 600 ml de agua destilada.
- Agregar 8.0 g de citrato de sodio ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ).
- Agregar 0.55 g de ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ).
- Agregar 4.20 g de cloruro de sodio (NaCl).
- Aforar a 1000 ml con agua destilada.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C/10 lb/10 minutos.

- Guardar en refrigeración.

La proporción de anticoagulante y sangre debe ser de 1:1.

### **Apéndice 3: Suspensión de glóbulos rojos al 2 %**

De una suspensión de glóbulos rojos de ovino, mantenidos en Alsever a temperatura de refrigeración:

1. Tomar 4 ml del paquete celular y colocarlos en un tubo de ensaye (13X100).
2. Centrifugar el tubo a 1500 g durante 5 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante.
4. Agregar un volumen de SSAT igual al eliminado.
5. Homogeneizar suavemente hasta que se encuentren bien mezclados.
6. Repetir los puntos 2 al 5 tres veces más.
7. Al finalizar la última centrifugación eliminar el sobrenadante y obtener el paquete celular.
8. Diluir 1 ml del paquete celular en 49 ml de SSAT.

### **Apéndice 4: Titulación de Hemolisina y Complemento**

Preparar una dilución 1/100 de hemolisina, agregando 0.1 ml de solución madre de hemolisina, en solución salina amortiguada con trietanolamina (SSAT).

Después realizar diluciones seriadas de la hemolisina de la siguiente forma:

- Colocar 3 series de tubos en una gradilla, la serie 1 con 5 tubos, identificar con números consecutivos del 1 al 5, las series 2 y 3, con 3 tubos; en la serie 2 los

tubos se identificar con números consecutivos del 6 al 8 y en la serie 3 con los números 9, 10 y 11

- Depositar en el tubo 1, 0.9 ml de SSAT y en los tubos 6 y 9, 0.4 ml de SSAT.
- Agregar a los tubos restantes de todas las series, 0.2 ml de SSAT.
- tomar 0.1 ml de la dilución 1/100 de hemolisina y depositar en el tubo 1 con 0.9 ml de SSAT, homogeneizar subiendo y bajando 7 veces el volumen del tubo.
- Tomar del tubo 1, 0.2 ml y pasar al tubo 6 homogeneizar
- Tomar del tubo 1, 0.1 ml y pasar al tubo 9, homogeneizar
- Posteriormente tomar 0.2 ml del tubo 1 y depositar en el tubo 2, homogeneizar.
- Tomar 0.2 ml del tubo 2 y depositar en el tubo 3, homogeneizar.
- Tomar 0.2 ml del tubo 3 y depositarlos en el tubo 4, homogeneizar.
- Tomar 0.2 ml del tubo 4 y depositarlos en el tubo 5, homogeneizar.
- Desechar 0.2 ml del tubo 5.
- Tomar 0.2 ml del tubo 6 y depositar en el tubo 7, homogeneizar.
- Tomar 0.2 ml del tubo 7 y depositar en el tubo 8, homogeneizar.
- Desechar 0.2 ml del tubo 8.
- Tomar 0.2 ml del tubo 9 y depositar en el tubo 10, homogeneizar.
- Tomar 0.2 ml del tubo 10 y depositar en el tubo 11, homogeneizar.
- Desechar 0.2 ml del tubo 11.
- Por último eliminar, del tubo 9, 0.2 ml de dilución, del tubo 6, 0.2 ml y del tubo 1, 0.3 ml de dilución obteniendo como resultado el mismo volumen en cada tubo,

- Al final se obtienen las siguientes diluciones: Tubo 1: 1/1000, Tubo 2: 1/2000, Tubo 3: 1/4000, Tubo 4: 1/8000 y Tubo 5: 1/16000, Tubo 6: 1/3000, Tubo 7: 1/6000, Tubo 8: 1/12000, Tubo 9: 1/5000, Tubo 10: 1/10000 y Tubo 11: 1/20000.
- Preparar una dilución 1:20 de complemento en SSAT.
- Agregar 0.2 ml de la solución 1:20 de complemento a los 11 tubos de hemolisina.
- Agregar a los 11 tubos 0.4 ml de SSAT.
- Preparar una suspensión de glóbulos rojos de ovino al 2 % en SSAT (Apéndice 2).
- Depositar 0.2 ml de la suspensión de glóbulos rojos de ovino al 2 %, a los 11 tubos de la hemolisina.
- Incubar durante una hora en baño maría a 37° C.

La titulación del complemento se realizó al mismo tiempo que la titulación de la hemolisina, como se describe a continuación:

- En una gradilla colocar 10 tubos de ensaye e identificar del 1 al 10.
- Preparar una dilución 1/20 de complemento en SSAT.
- Depositar las siguientes cantidades de la dilución 1:20 complemento a cada tubo: Tubo 1: 0.02 ml, tubo 2: 0.04 ml, tubo 3: 0.06 ml, tubo 4: 0.08 ml, tubo 5: 0.10 ml, tubo 6: 0.12 ml, tubo 7: 0.14 ml, tubo 8: 0.16 ml, tubo 9: 0.18 ml y tubo 10: 0.20 ml.
- Posteriormente agregar a los tubos de complemento las siguientes cantidades de SSAT: al tubo 1: 0.58 ml de SSAT, al tubo 2: 0.56 ml de SSAT, al tubo 3:

0.54 ml de SSAT, al tubo 4: 0.52 ml, al tubo 5: 0.5 ml de SSAT, al tubo 6: 0.48 ml de SSAT al tubo 7: 0.46 ml de SSAT, al tubo 8: 0.44 ml de SSAT, al tubo 9: 0.42 ml de SSAT y en el tubo 10: 0.4 ml de SSAT y a todos los tubos de hemolisina 0.4 ml de SSAT;

- Al terminar de colocar la solución SSAT, meter a incubar en baño maría, durante 30 minutos a 37° C, este procedimiento se hace simultáneamente al de los tubos de la hemolisina.
- Al pasar los primeros 30 minutos del tiempo de incubación, retirar del baño maría, los tubos de la hemolisina, y realizar la lectura para determinar en donde se encuentra el titulo de la hemolisina.

El titulo de la hemolisina se toma como la última dilución de hemolisina en donde se pudo observar el 100 % de hemólisis.

Para saber en que dilución se encuentra el titulo, los tubos se acomodaron iniciando con la dilución 1/1000 y terminando en la dilución 1/20000. Para realizar la prueba del 100 % de hemólisis se requieren dos unidades de hemolisina, las cuales se encuentran en la dilución inmediata anterior a la dilución en la que se observó el 100 % de hemólisis.

- Una vez determinado el titulo de la hemolisina realizar los cálculos necesarios para preparar el sistema hemolítico, utilizando dos unidades de hemolisina.
- Poner a incubar el sistema hemolítico en baño maría a 37° C por el tiempo que le resta al complemento.
- Al terminar el tiempo de incubación agregar 0.4 ml de sistema hemolítico a cada tubo.

- Incubar nuevamente la gradilla durante 30 minutos en baño maria a 37° C.
- Al finalizar el tiempo de incubación, realizar la lectura de la prueba.

La lectura se hace buscando el último tubo con 100 % de hemólisis lo que nos indicó en que dilución de complemento se obtuvo una unidad de complemento (24, 33)

#### **Apéndice 5: Titulación del Antígeno.**

La titulación del antígeno se realiza de la siguiente manera:

- Preparar el sistema hemolítico con 2 unidades de hemolisina.
- Diluir los sueros control positivo y negativo 1/2 en volumen final de 5.0 ml con SSAT con 7 % de complemento.
- Inactivar los sueros a 60° C durante 30 minutos y dar tratamiento anticomplementario a 37° C por 60 minutos.

Colocar en una gradilla 90 tubos, realizar diluciones seriadas de los sueros control positivo y negativo, así como a sus controles anticomplementarios siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

- Colocar 1.2 ml de SSAT a los tubos A, de las columnas 2, 3 y 4.
- Agregar a todos los tubos de la columna 1, 0.2 ml del suero diluido 1/2 e inactivado.
- Colocar al tubo A de la columna 2, 1.2 ml del suero diluido 1/2 e inactivado. Homogeneizar pipeteando 7 veces para obtener una dilución 1/4 y pasar 1.2 ml al tubo A de la columna 3.
- Pasar de la dilución 1:4, 0.2 ml a cada uno de los tubos de la columna 2.

- Homogeneizar el tubo A de la columna 3 pipeteando 7 veces para obtener una dilución 1/8 y pasar 1.2 ml al tubo A de la columna 4.
- Pasar de la dilución 1/8, 0.2 ml a cada uno de los tubos de la columna 3.
- Homogeneizar el tubo A de la columna 4 pipeteando 7 veces para obtener una dilución 1/16 y pasar 0.2 ml a cada tubo de la columna 4.
- Desechar 1.2 ml del tubo A de la columna 4, obteniendo al finalizar en cada tubo, 0.2 ml de la dilución correspondiente.

Para las diluciones del control anticomplementario del suero control positivo, llevar a cabo el siguiente procedimiento:

- Colocar 0.2 ml de suero positivo diluido e inactivado, a todos los tubos de la columna 5 1.2 ml al tubo A de la columna 6.
- Colocar 1.2 ml de suero positivo diluido e inactivado, al tubo A de la columna 6.
- Agregar 1.2 ml de SSAT al tubo A de la columna 6 homogeneizar pipeteando 7 veces, para obtener una dilución 1:4.
- Pasar 0.2 ml del tubo A de la columna 6 a todos los tubos de esta y se elimina 1.2 ml del tubo A, quedando en todos los tubos un volumen de 0.2 ml.
- El suero control negativo se diluye de la siguiente forma:
- Colocar 1.2 ml de SSAT en el tubo A de la columna 8.
- Colocar en cada tubo de la columna 7, 0.2 ml de suero negativo previamente diluido 1/2 e inactivado.
- Agregar en el tubo A de la columna 8, 1.2 ml de suero negativo previamente diluido 1/2 e inactivado.

- Homogeneizar pipeteando 7 veces, para obtener una dilución 1/4 del suero negativo.
- Pasar del tubo A de la columna 8, 0.2 ml a cada tubo de la misma y eliminar al final 1.2 ml del tubo A de la columna 8 para obtener en todos los tubos 0.2 ml.
- Los controles anticomplementarios del suero control negativo se trabajan igual que los controles del suero positivo, dichos controles se colocan en las columnas 9 y 10 de la gradilla.

También se utilizaron controles para la prueba de titulación los cuales fueron:

- Control de antígeno (Ag).
- Control de antígeno complemento (Ag-C').
- Complemento (C').
- Sistema hemolítico (SH).

Dichos controles se trabajan de la siguiente manera:

- Agregar 0.2 ml de SSAT a todos los tubos de la columna 11, 0.4 ml de SSAT a todos los tubos de las columnas 12 y 13 y por ultimo 0.6 ml de SSAT a todos los tubos de la columna 14
- Al terminar de realizar las diluciones de los sueros controles con SSAT, la gradilla quedó con los siguientes volúmenes.
- Después de haber realizado las diluciones de los sueros, en una gradilla aparte realizar diluciones del antígeno desde 1/100 hasta 1/600 y de cada dilución agregar 0.2 ml a cada hilera de tubos de las diluciones de control positivo, control negativo y los controles Ag y Ag-C' únicamente. Posteriormente se agregó 0.2 ml. de SSAT a los controles

anticomplementarios de suero positivo y negativo (como volumen compensatorio).

- Después agregar 0.2 ml de complemento a todos los tubos, a excepción de los tubos de las columnas 13 y 14.
- Incubar la gradilla, a 37° C durante 60 minutos en baño maría, agitando cada 15 minutos; a los 30 minutos de incubación, meter a incubar el sistema hemolítico y al finalizar el tiempo de incubación agregar 0.4 ml de sistema hemolítico a todos los tubos, incluyendo controles anticomplementarios y controles de la prueba, la gradilla se incubó nuevamente la gradilla durante 30 minutos a 37° C.
- Al finalizar el tiempo de incubación se procedió a hacer la lectura (24,33).