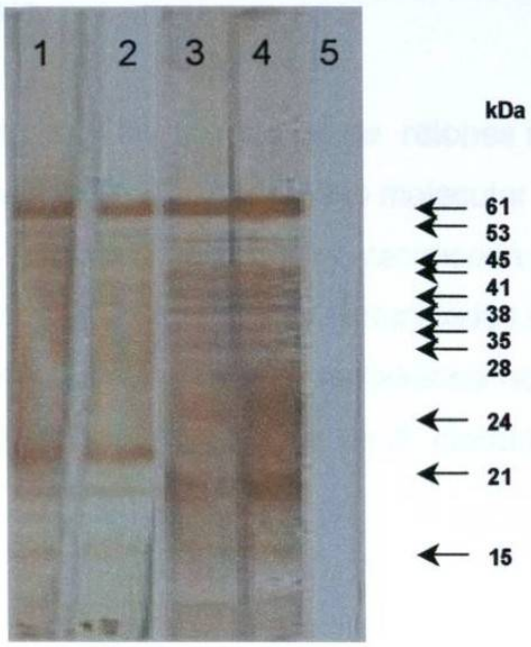


Fig.12 Western-blot de *N. brasiliensis* revelado con sueros de conejos Nueva Zelanda infectados con *N. brasiliensis* al día 60(1-2); y con sueros de animales inmunizados con *N. brasiliensis* al día 60(3-4; 5 control negativo).

6. Identificación de reacciones cruzadas entre los sueros anti- *A. madurae, S. somaliensis y N. brasiliensis.*

Se encontró que el 37.5% (tabla 5) de los sueros de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* reconocen una banda de 21kDa de peso molecular del extracto celular de *A. madurae*, mientras los ratones infectados no reconocen ningún antígeno de este extracto, ni las ratas y conejos infectados o inmunizados con *N. brasiliensis.* Los animales inmunizados o infectados con *S. somaliensis* no muestran ninguna reacción contra los antígenos del extracto celular de *A. madurae*(ver Fig. 13, 14 y 15).

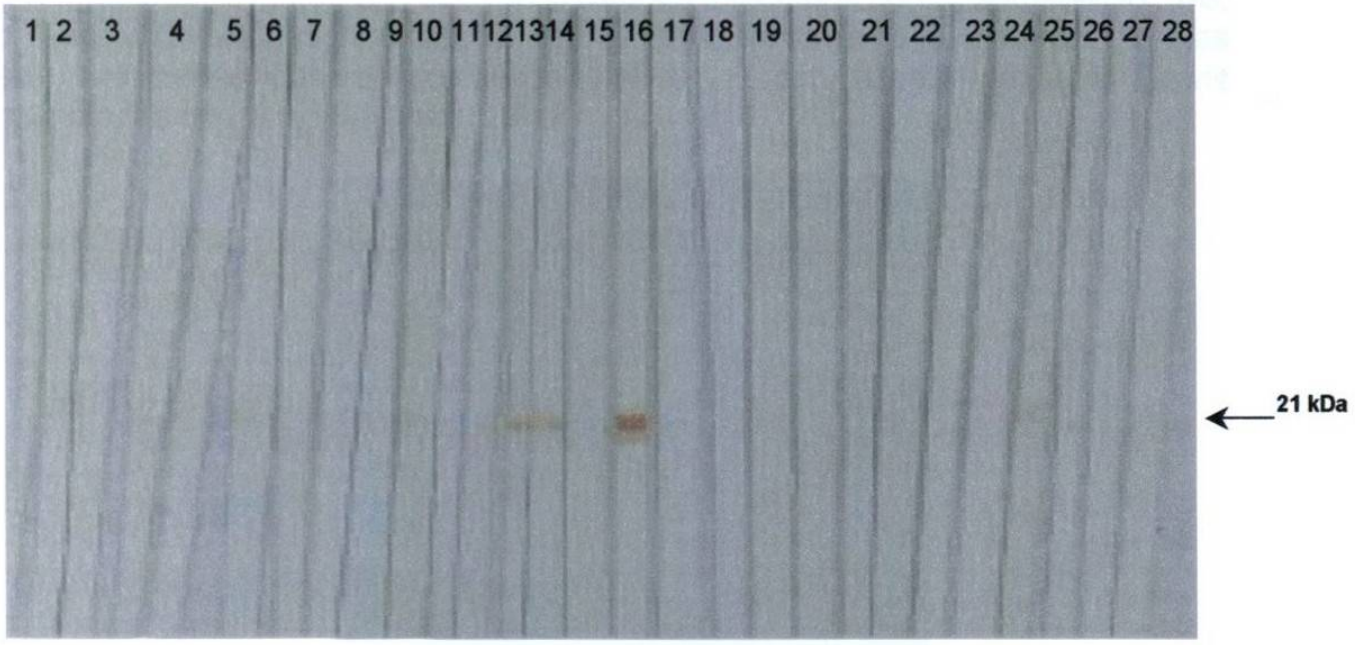


Fig13. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *A. madurae* revelado con sueros de ratones infectados con *N. brasiliensis* 1-8, con sueros de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* 9-16, con sueros de ratas Lewis infectadas con *N. brasiliensis* 17-22, y con sueros de ratas Lewis inmunizadas con *N. brasiliensis* 23-28.

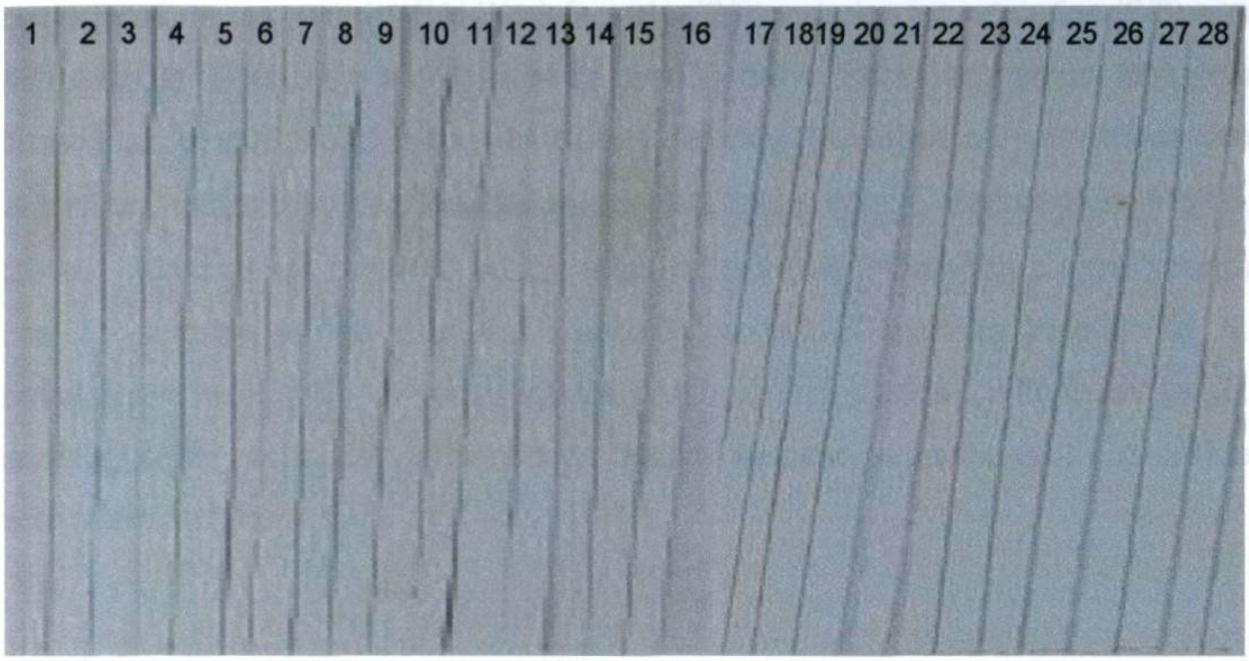


Fig14. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *A. madurae* revelado con sueros de ratones infectados con *S. somaliensis* 1-8, con sueros de ratones inmunizados con *S. somaliensis* 9-16, con sueros de ratas Lewis infectadas con *S. somaliensis* 17-22, y con sueros de ratas Lewis inmunizadas con *S. somaliensis* 23-28.

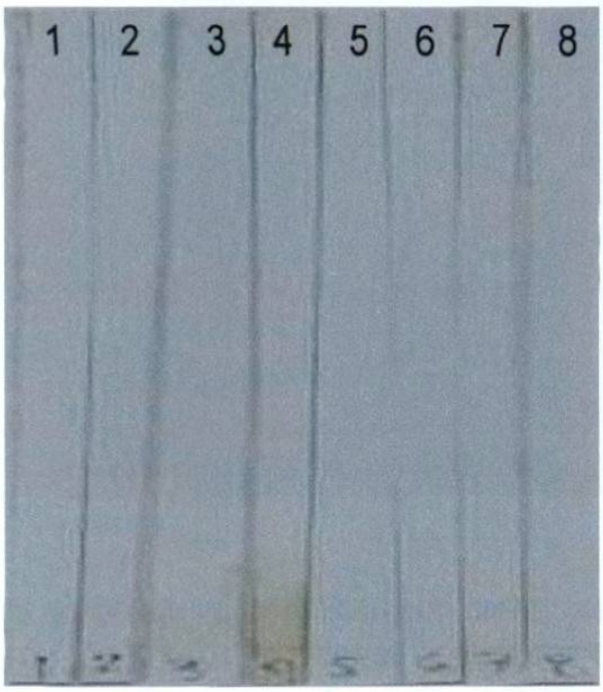


Fig15. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *A. madurae* revelado con sueros de conejos infectados con *N. brasiliensis* 1-2, con sueros de conejos inmunizados con *N. brasiliensis* 3-4, con sueros de conejos infectados con *S. somaliensis* 5-6, con sueros de conejos inmunizados con *S. somaliensis* 7-8.

Los sueros de los ratones BALB/c infectados(2/8) y de los inmunizados (6/8) con *A. madurae* reconocen una banda de 24kDa del extracto celular de *Nocardia brasiliensis* al igual que los conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con la misma, no así las ratas infectadas o inmunizadas con *A. madurae*(ver Fig.16, tabla6). Mientras los ratones BALB/c y las ratas Lewis infectadas o inmunizadas con *S. somaliensis* no muestran reacción contra el extracto celular de *N. brasiliensis* (ver Fig.17), sin embrago los conejos inmunizados o infectados con *S. somaliensis* si reconocen la banda de 24kDa de peso molecular(ver Fig. 18)de este mismo extracto.

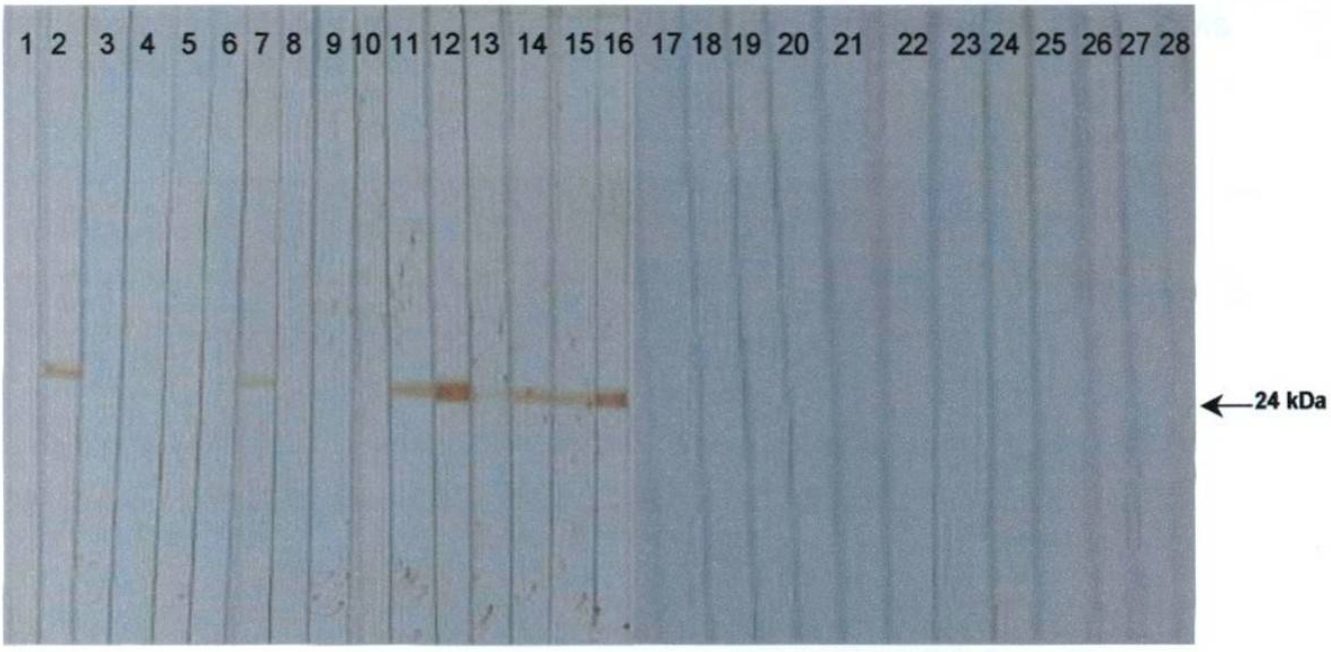


Fig16. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *N. brasiliensis* revelado con sueros de ratones infectados con *A. madurae* 1-8, con sueros de ratones inmunizados con *A. madurae* 9-16, con sueros de ratas Lewis infectadas con *A. madurae* 17-22, con sueros de ratas Lewis inmunizadas con *A. madurae* 23-28.

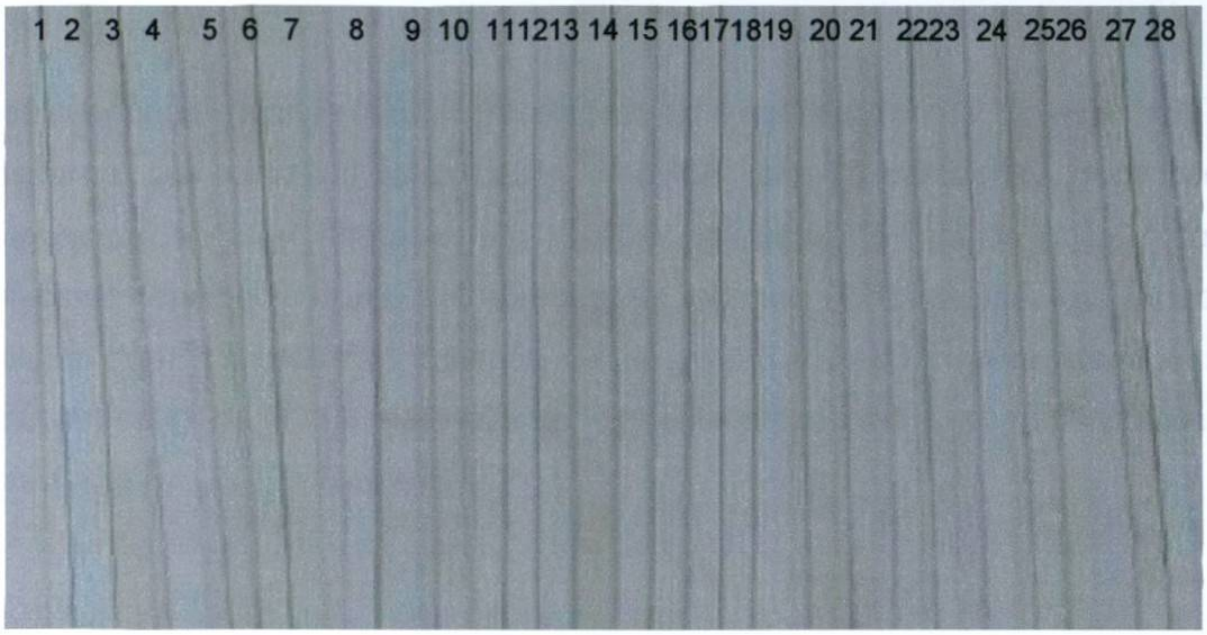


Fig17. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *N. brasiliensis* revelado con sueros de ratones infectados con *S. somaliensis* 1-8, con sueros de ratones inmunizados con *S. somaliensis* 9-16, con sueros de ratas Lewis infectadas con *S. somaliensis* 17-22, con sueros de ratas Lewis inmunizadas con *S. somaliensis* 23-28.

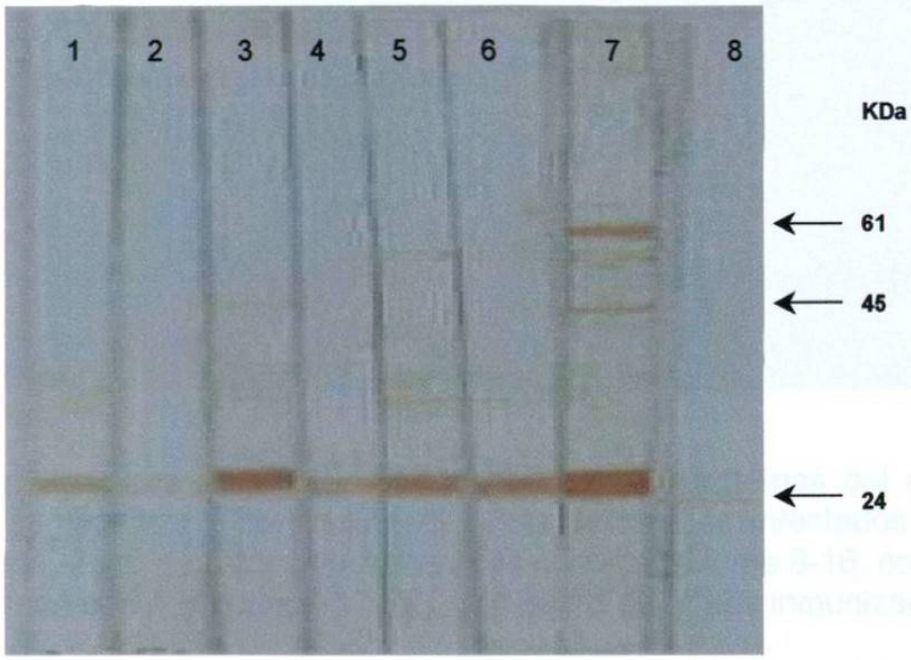


Fig18. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *N. brasiliensis* revelado con sueros de conejos infectados con *S. somaliensis* 1-2, con sueros de conejos inmunizados con *S. somaliensis* 3-4, con sueros de conejos infectados con *A. madurae* 5-6, con sueros de conejos inmunizados con *A.madurae* 7-8.

Los sueros de ratones BALB/c infectados o inmunizados con *N. brasiliensis* y *A. madurae*, así como las ratas Lewis infectadas con *N. brasiliensis*, reconocen bandas de 20, 21 y 23kDa(ver Fig.19 y 20), mientras los conejos inmunizado o infectados con *A. madurae* o *N. brasiliensis* reconocen más bandas del extracto celular de *S. somaliensis* además de la de 20 y 21kDa, entre las que se encuentran la de 9, 10 y 12 kDa en diferente proporción entre inmunizados o infectados(ver Fig.21, Tabla 4)

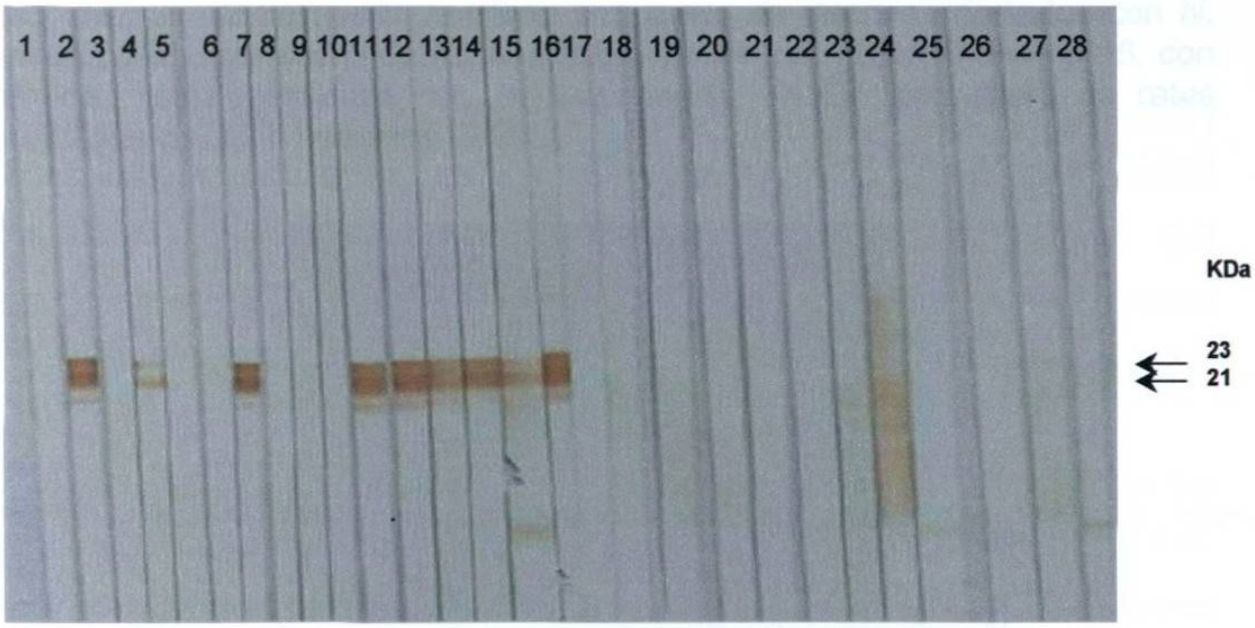


Fig19. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *S. somaliensis* revelado con suero de ratones infectados con *A. madurae* 1-8, con suero de ratones inmunizados con *A. madurae* 9-16, con suero de ratas infectadas con *A.madurae* 17-22, con suero de ratas inmunizadas con *A. madurae* 23-28.

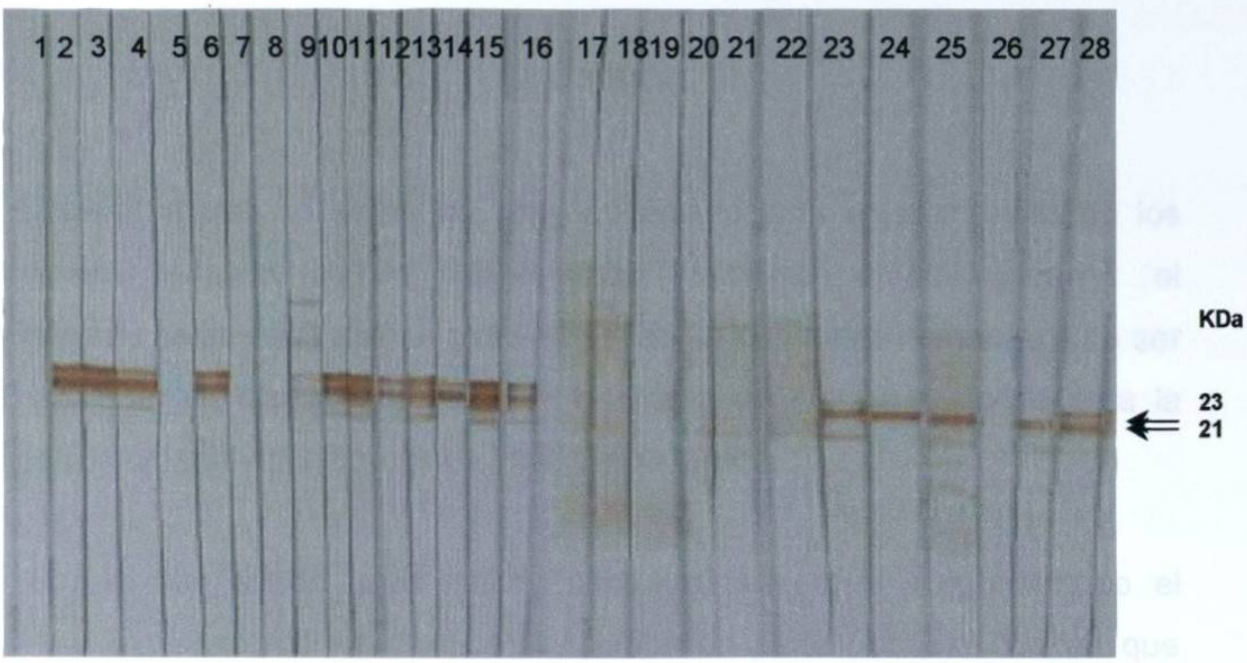


Fig20. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *S. somaliensis* revelado con suero de ratones infectados con *N. brasilienis* 1-8, con suero de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* 9-16, con suero de ratas infectadas con *N. brasiliensis* 17-22, con suero de ratas inmunizadas con *N. brasiliensis* 23-28.

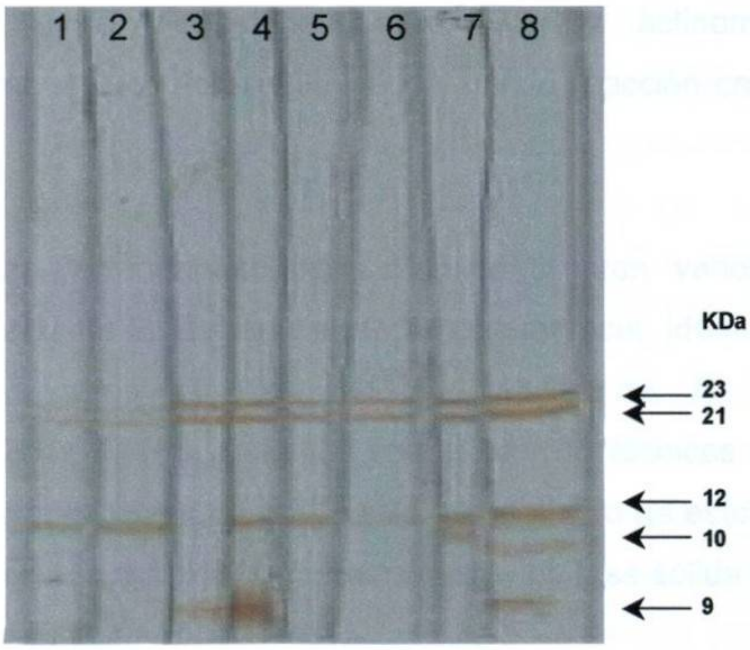


Fig21. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *S. somaliensis* revelado con suero de conejos infectados con *N. brasiliensis* 1-2, con suero de conejos inmunizados con *N. brasiliensis* 3-4, con suero de conejos infectados con *A. madurae* 5-6, con suero de conejos inmunizados con *A. madurae* 7-8.

DISCUSIÓN.

Debido a que no existe un método óptimo para el aislamiento de los actinomicetos aerobios de los especimenes altamente contaminantes y el crecimiento de estas bacterias es lento, tardando de dos a tres semanas para ser identificadas en muestras biológicas, se requieren de nuevos métodos para la identificación de actinomicetomas de importancia clínica.

Por lo que desde hace mucho años varios autores han intentado el diagnóstico inmunológico sin buenos resultados en parte por las técnicas que utilizaron eran de baja sensibilidad y en parte porque sus preparaciones antigénicas eran mezclas complejas de antígenos proteicos, polisacáridos no definidos ni caracterizados con los cuales las reacciones cruzadas fueron un problema común. Entre los estudios realizados con el fin de encontrar antígenos inmunodominante esta el de Magaldi y Mackenzie quienes en 1990 realizaron un estudio comparativo entre los antígenos de diversos actinomicetos por inmunodifusión e inmnunoelectroforesis(35), encontrando reacción cruzada entre estos.

En 1992, Salinas Carmona y colaboradores identificaron varios antígenos inmunodominantes mediante la técnica de electrotransferencia, identificando tres proteínas inmunodominantes de un extracto celular de *N. brasiliensis* denominadas P61, P26 y P24(5). Después con el uso de técnicas simples, se logró el aislamiento y purificación de P61 y P24 y con el uso de estos antígenos purificados se desarrollo un método inmunoenzimático en fase sólida (30) que ha demostrado su utilidad clínica.

Basándonos en las investigaciones antes realizadas sobre *N. brasiliensis*, y el desarrollo del micetoma en el ratón BALB/c , en este trabajo se identificaron los antígenos inmunodominantes específicos de *S. somaliensis y A. madurae* para el posterior desarrollo de una prueba serológica, y se comparó la respuesta inmune

humoral en ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda inmunizados o infectados con *S. somaliensis y A. madurae.*

Aunque Palma y col. han reportado el desarrollo del modelo experimental en ratones BALB/c de la infección por *A. madurae* con la utilización de adyuvante incompleto de Freud(54), al aplicar *A. madurae* más adyuvante incompleto de Freud solo se observó una infección pasajera, pero no el desarrollo del actinomicetoma típico presentado en ratones BALB/c infectados con *N. brasiliensis*, quizás debido a la falta de virulencia de la bacteria, lo cual también se observó en los animales infectados con *S. somaliensis* o probablemente la infección se mantuvo activa sin desarrollar el micetoma, concordando con lo reportado por Palma y col, en cuyo experimento se encontró la presencia de la bacteria en el tejido muscular del cojinete plantar, sin embargo, no se presentó respuesta inflamatoria lo que sugiere la posibilidad de que esta bacteria induzca temporalmente algún mecanismo de tipo anérgico en el huésped infectado.

Por otra parte la respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos contra antígenos de *S. somaliensis* en el suero de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados reconocieron más de 14 antígenos presentes en el extracto celular crudo.

Encontramos diferencias entre los animales infectados e inmunizados ya que los ratones y ratas infectados con *S. somaliensis* reconocen una banda de 53kDa no encontrada en los inmunizados. Mientras que entre los conejos inmunizados o infectados no se observó ninguna diferencia en cuanto al patrón reconocidos por los sueros de los animales, aunque no se puede aseverar nada debido al número reducido de animales utilizados, y los antígenos que reconocieron fueron más de los que reconocieron las otras dos especies animales. Sin embargo, varios de los antígenos reconocidos por los animales infectados o inmunizados con *S. somaliensis* también reaccionaron con los sueros de animales infectados o inmunizados con *A. madurae y N. brasiliensis*, como las

proteínas de 9, 10, 12, 21 y 23kDa de peso molecular lo cual explica las reacciones cruzadas ya antes reportadas entre estas especies bacterianas.

Los antígenos inmunodominantes de *S. somaliensis* reconocidos 100% por todos los animales tanto infectados como inmunizados además de no dar reacción cruzada con los animales infectados o inmunizados con *N. brasiliensis y A. madurae* son los de 28, 32 y 53kDa de peso molecular.

Por otra parte los ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectadas o inmunizadas con *A. madurae* reconocieron más de 10 antígenos del extracto celular crudo.

Los sueros hiperinmunes de ratones y ratas infectadas con *A. madurae* reconocieron una banda de 38kDa, esta banda no es reconocida por los animales inmunizados, constituyendo esto una diferencia entre animales infectados contra inmunizados. En cambio los conejos tanto inmunizados como infectados reconocen esta misma banda no encontrando diferencia entre el patrón de proteínas reconocido por animales infectados contra inmunizados.

Los antígenos inmunodominantes de *A. madurae* para las tres especies animales son los de 28 y 35kDa de peso molecular, los cuales no dan reacción cruzada con los sueros de animales infectados o inmunizados con *N. brasiliensis o S. somaliensis* y el antígeno de 38kDa reconocido solo por animales infectados y el cual tampoco da reacción cruzada constituye el antígeno con potencial para el serodiagnóstico.

Sin embargo 3 de 8 de los animales inmunizados con *N. brasiliensis* reconocen una banda de 21kDa del extracto celular de *A. madurae,* reacción cruzada insignificante comparada con la reacción cruzada presentada entre el extracto de *S. somaliensis* y los sueros hiperinmunes anti-*A. madurae* y anti- *N. brasiliensis.*

En este trabajo se estudió también la respuesta inmune humoral desarrollada en animales infectados o inmunizados con *N. brasiliensis*, encontrando que los ratones inmunizados o infectados al igual que las ratas infectadas o inmunizadas reconocen 6 antígenos del extracto celular crudo de 21, 24, 35, 45, 53 y 61 kDa de peso molecular, mientras que los conejos reconocen muchos más antígenos debido al repertorio de anticuerpos presentes en el animal y principalmente al fondo genético, y no existe diferencia entre los inmunizados e infectados.

Los antígenos inmunodominantes para las tres especies animales fueron los antígenos de 24 y 61kDa, ya antes reportados.

Encontramos reacción cruzada entre el extracto celular de *N. brasiliensis* y los sueros de los animales infectados o inmunizados con *A. madurae*, ya que el 25% de los ratones infectados, el 75 % de los ratones inmunizados con *A. madurae,* y el 100% de los conejos tanto infectados como inmunizados por *A. madurae* y *S. somaliensis* reconocen el antígeno de 24kDa de peso molecular del extracto celular, mismo que se utiliza para el diagnóstico serológico por ELISA de pacientes con micetoma, prueba que como ya se sabe no es 100% específica.

Como se describió antes sí se presentan diferencias entre el patrón antigénico reconocido por los ratones y ratas infectados contra el de los inmunizados por las diferentes especies bacterianas, pero al estudiar la respuesta desarrollada en conejos se ve que ocurre todo lo contrario que en las especies de roedores estudiadas no observando diferencias aunque como ya se menciona anteriormente no puede ser determinante debido al reducido número de conejos utilizados y además de que los conejos reconoce un mayor número de antígenos, por lo que la respuesta montada en estos animales es más amplia.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la comparación de patrones de proteínas reconocidas entre ratones infectados versus inmunizados y en ratas infectadas versus inmunizadas, el antígeno inmunodominante candidatos para el desarrollo de una prueba serológica para *A. madurae* es la proteína de 38kDa de peso molecular y para *S. somaliensis* la de 53kDa de peso molecular las cuales además no dan reacción cruzada y son solo reconocidos por los animales infectados, más sin embargo no se pueden descartar los demás antígenos determinados como inmunodominantes en las tres especies animales hasta evaluar la respuesta de anticuerpos de humanos infectados con estas bacterias frente a las proteínas propuestas como inmunodominantes en este trabajo.

Además es importante mencionar la importancia de la posible implicación de estos dos antígenos p53 y p38 de los extractos celulares de *S. somaliensis* y *A. madurae* respectivamente reconocidos solo por animales infectados, en la patogenicidad de estas bacterias para lo cual es necesario realizar más estudios.

CONCLUSIONES.

Los antígenos inmunodominantes de *S. somaliensis* en ratones BALB/c son los de 28, 32,40 y 53 kDa de peso molecular y en ratas son los de 28, 32 y 53 kDa de peso molecular. En cambio en el conejo fueron los de 12, 20, 21, 23, 28, 29, 30, 32, 35, 40 y 53 kDa de peso molecular.

Los antígenos inmunodominantes de *A. madurae* en ratones BALB/c son los de 28, 32, 35 y 38kDa de peso molecular, en ratas son los de 28, 35, 38 y 40kDa de peso molecular y en conejos los de 10, 12, 15, 17, 21, 28, 32, 35 y 38kDa de peso molecular.

Existe diferencia entre el patrón de proteínas reconocido por los sueros de ratones BALB/c, y ratas Lewis **infectadas** contra el de los **inmunizados** con *S. somaliensis* o *A. madurae.*

El antígeno inmunodominante candidato para el desarrollo de una prueba diagnóstica serológica para *S. somaliensis* es la proteína de 53kDa de peso molecular, reconocido solo por los ratones BALB/c y ratas Lewis infectadas.

El antígeno inmunodominante candidato para el desarrollo de una prueba diagnóstica serológica para *A. madurae* es la proteína de 38kDa de peso molecular, reconocido solo por los ratones BALB/c y ratas Lewis infectadas.

REFERENCIAS.

1. Sandoval-Trujillo H. 1993. Actinomicetos, Microorganismos de la luz. UNAM, Xochimilco, México

2. Beaman BL. 1993 Nocardial Infections, in fungal Infections and Immune Responses, editado por Murphy J.W., Friedman H., Bendimelli M. Plenum Publishing Corporation, NY.

3. Beaman B.L., Beaman L. 1994. Nocardia Species: Host-Parasite Relationships. Clinical Microbiology Reviews 7(2):213-264.

4. McNeil M.M., Brown J.M. 1994. The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. Clinical Microbiology Reviews 7(3): 357-417.

5. Vera-Cabrera L., Salinas-Carmona M.C., Welsh O.., Rodríguez M.A. 1992. Isolation and Purification of two Inmunodominant Antigens from *N. brasiliensis* . J. Clin Microbiol 30(5):1183-1188.

6. Pier A.C, Thurston J.R, Larsen A.B. 1968. A Diagnostic Antigen for Nocardiosis: Comparative Test in Cattle with Nocardiosis and Mycobacteriosis. Am J Vet res 29(2):397-403.

7. Beaman B.L., Saubolle M.A., Wallace R.J. 1995. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Oerskovia* and Other Aerobic Actinomycetes of Medical Importance, en Manual of Clinical Microbiology, editado por P.R Murray, ACM Press.

8. Elmer W.,Stephen D., William M. 1997. Atlas and Texbook of Diagnostic Microbiology. Fith Edition., Editor Lippincott Williams and Wilkins., Lippincontt-Roven Publishers. Washington.

9. Welsh, O. 1991. Mycetoma. Current concepts in treatment. International Journal of Dermatology. 30(6): 387-398.

10. González-Ochoa, A., H. Shibayama, D. Felix, and M. Anaya. 1962. Inmunologycal aspects of Actinomycotic Mycetoma and Nocardiosis. Excerpta Mad. Int. Congr. Ser. 55:542-551

11. Serrano, J.A y Sandoval T.H. 1992. Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetos Patógenos. Universidad de los Andes. Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico. Consejo de Publicaciones. Mérida, Venezuela.

12. Laemmli V.K. 1970. Cleavage of structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227:680-685

13. Carter, G.R. 1985. Bacteriología y micología Veterinarias. Aspectos Especiales. 1ª Edición Editorial El Manual Moderno. México, D.F.

14. Zlotnik, H., and Buckley, H.R.1980. Experimental Production of Actinomycetoma in BALB/c Mice. Infect. Immun. 29(3): 1141-1145.

15. Krick, J.A and Remington, J.S. 1975. Resistance to Infection with *Nocardia asteroides*. J. Infect. Dis. 132(6): 665-672.

16. Kobayashi, C. S. 1987. Bacterias Parecidas a Hongos. Actinomicetos. Tomado de :Tratado de Microbiología de Davis. 2da. Edición. Salvat. Barcelona, España.

17. Kaufman, S.H.E. 1993. Immunity to Intracellular Bacteria. Annu. Rev. Inmunol. 11: 129-163.

18. Conde, C., I. Melendro, E., Fresan, m., and Ortiz. L. 1982. *Nocardia brasiliensis* : Mycetoma Induction and Grow Cycle. Infect. Inmun. 38(3): 1291/11295.

19. Folb, P., Jaffe, R. And Altman, G. 1977. *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* Infection on Mice. Infect. Inmun. 13: 1490/1496.

20. Torres, I.E. 1994. Estudio de la respuesta inmune humoral en el establecimiento y resolución del micetoma experimental por *Nocardia brasiliensis*. U.A.N.L. Facultad de Medicina. Tesis de Maestría.

21. González Ochoa A., Mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* with a note on the isolation of the causative organism from the soil, Lab. Invest. 11(1962) 118-123.

22. Macotela-Ruíz E., Mariat T.F., Sur la production de mycetomes experinentaux par *Nocardia brasiliensis* et *Nocardia asteroides*, Bull. So. Pathol. Exot. 56(1963)46-54.

23. Rodríguez M.C., Torres . J.A., Zlotnik H. Investigation of the temporal humoral immune response in a murine model of actinomycetoma, PRHSJ 14(1996) 91-95.

24. Boiron P., Locci R., Goodfellow M. 1998. *Nocardia*, Nocardiosis and Mycetoma. Medical Mycology. 36(1):26-37.

25. Trujillo M.E., Goodfellow M. 1997. Poliphasic Taxonomic Study of Clinicalli Significant Actinomadurae Including the Description of *Actinomadura*. Hyg. Alot.1 Orig. 285:212-233.

26. Rippon. J.W., and Peek. G.L., 1967. Experimental Infection with *Streptomyces madurae* as a Funtion of Collagenasa. J. Invest. Dermatol., 49:371-378.

27. Gumaa, S.A., Abu Samra M.T. 1981. Experimental Mycetoma Infection in the Goat. J. Comp. Pathol. 91:341-346.

28. Conde C., Mancilla R., Fresan M., Ortiz-Ortiz L. 1983. Inmunoglobulin and Complement in Tissues of Mice Infected with *Nocardia brasiliensis.* Infect Immunity. 40(3):1218-1222.

29. Salinas-Carmona M.C., Vera L., Welsh O., Rodriguez M. 1992. Antibody Response to *Nocardia brasiliensis* Antigens in Man. Zbl Backt 276:390-397

30. Salinas-Carmona M.C., Welsh O., Casillas S.M. 1993. Enzyme linked Inmunoabsorben Assay for Seological Diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and Clinical Correlation with Mycetoma Infections. J Clin Microbiol. 31(11):2901-2906

31. Hay, R.J; Mahgoub E,S., Leon, G. Al-Sogair S., y Welsh O. 1992. Mycetoma. J. Med. Vet. Mycol. 30:41-49.

32. Salinas-Carmona M.C., Torres-Lopez E., Ramos A.I., Lincon Trujillo González Spencer D., Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice, Infect. Immun. 67(1999) 2428-2432.

33. Murray, P,R., JoBaron E., Pfaller M, A., Tenover F,C., Yolken R,H.1999. Washington D.C, Manual of Clinical Microbiology, 7th Edition American Society for Microbiology.

34. Bojalil, L.F., Zamora A. 1963. Precipitin and Skin test in the diagnosis of mycetoma due to *Nocardia brasiliensis*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 713:40-43

35. De Magaldi SW., Mackenzie DW. 1990. Comparision of antigen from agents of actinomycetoma by immunondiffudion and electrophoresis procedures. J. Med Vet Mycol. 28(5): 363-371.

36. Seeley H.W., VanDemark K.P. 1962. Microbes in Action,, A laboratory Manual of Microbiology. W.H Freeman and co., San Fco, Segunda Edition.

37. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitition of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. Anal Biochem. 72 : 248-254

38. González Ochoa, A y F. Baranda. 1953. Una prueba cutánea para el diagnóstico de micetoma actinomicósico por *Nocardia brasiliensis*. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop (Mex). 13(189-197).

39. González-Ochoa A, Shields J, Vásquez P. 1952. Acción de la 4,4-diamidinodifenil-sulfona frente a *Nocardia brasiliensis*, estudios in vitro, en la infección experimental y en la clínica. Gac. Med. Mex. 82:345-353.

40. González-Ochoa A.1969. Producción experimental del micetoma por *Nocardia brasiliensis* en el ratón. Gac.Med.Mex. 99:773-781

41. Mahgoub E,L.1978. Experimental infections of athymic nude New Zealand mice, nu/nu strain with mycetoma agents. Sabourodia.16:211-216.

42. Angeles, A.M, and Sugar. A.M. 1987. Rapid diagnosis of Nocardiosis with an enzyme immunoassay. J. Infect. Dis.Vol. 155(2): 292-296

43. González-Ochoa A. 1975. Geografía de las micosis profundas. Res. Inv. Salud. Pública. 35: 85-96

44. Bout G, Lavalle P, Mariat F, Súchel P. 1987. Epidemiologic study of mycetomas in Mexico. Apropos of 502 cases. Bull Soc Pathol Exort Filiales. 80(3):329-339

45. Ortiz-Ortiz L, Parks D.E, López J.S, Weigle W.O. 1979. B-Lymphocytes Activation with an extract of *Nocardia brasiliensis*. Infect. Immunity. 25(2):627-634.

46. Gordon M.A, Mahgoub E.S. 1980. Immune Response to Aerobic Pathogenic Actinomycetaceae, en Manual of Clinical Immnology, editado por Rose N.R. friedman H. American Society for Microbiology.

47. Bona C., Chedid L., Demais C. Et al. 1975. Blast transformation of Rabbit B-Derived Lymphocytes by a Mitogen Extracted from *Nocardia*. J. Immunol. 114(1):348-353

48. Bona C., Broder S., Bimitriu A., Waldmann Th. A. 1979. Policlonal Activation of human B Lymphocytes by Nocardia Water Soluble Mitogen (NWSM) Immunological Rev. 45:69-92.

49. Towbin, H., T. Staeblin; J. Gordon; 1979. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(9): 4350-4354

50. Diezel, W., Kopperschlager, G., and Hofmann, F.1972. An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. Anal. Bichem. 48, 617-620.

51. Sammons, D. W., Adams, L. D., and Nishizawa, E.E. 1981. Ultrasensitive silver-based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels. Electrophoresis 2, 135-140.

52. Hassan AM, Fahal AH, Ahmed AO, et al., 2001. The inmunopathology of actinomycetoma lesions caused by *Streptomyces somaliensis*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 95(1):89-92

53. McNeil MM, Brown JM, Scalise G and Piersimoni C. 1992. Nonmycetomic *Actinomadura madurae* infection in a patient wirh AIDS. Journal of Clinical Microbiology 1992; 30(4):1008-1010.

54. Palma RA, Castrillón RLE, Elija SJJ, Padilla DC, Heuze IJY. 2000 Infección experimental por *Actinomadura madurae* en ratón *Rev Cent Dermatol Pascua*; 9(2): 96-101.

ABREVIATURAS

BHI	Infusión cerebro corazón
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Grados centígrados
%C	Porciento de agente entrecruzante (Bis-acrilamida)
cm	Centímetro
g	Gramo
h	Hora
IET	Inmunoelectrotransferencia
kDa	Kilodaltons
l	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
mM	Milimolar
M	Molar
N	Normal
nm	Nanómetro
PBS	Solución salina-fosfato
Rf	Factor de retardamiento(Movilidad Relativa)
SDS	Lauril sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
s.s.e	Solución salina estéril
seg	segundo
%T	Porciento de acrilamida total
TEMED	N, N, N`,N`,tetrametiletilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V	voltios
VP	vaciado en placa

APÉNDICE

1. **Reactivo de Bradford.** 6.0mg de azul de Coomassie G-250 (LKB/Bromma) se disolvieron en 100ml de ácido perclórico(Merck) al 3% v/v, en agua. Se filtró y se guardó en frasco ámbar.

2. **PBS 0.10M, pH7.2-7.4.** NaCl 8g, Na_2HPO_4 1.22g, KH_2PO_4 0.2g, KCl 0.2g(reactivos Merck), se disolvieron, se ajustó el pH y se aforó a un litro de agua.

3. **Reactivos para electroforesis.**

3.1. Amortiguador para Preparar Gel de Empaquetamiento o Concentrador.
Tris-HCl 1.2M, pH 6.8

3.2. Amortiguador para Preparar Gel de Corrimiento o Separación.
Trs-HCl 3.02M, pH 8.8

3.3. Amortiguador de Corrimiento, con SDS
Glicina 192mM, Trizma base 25mM, SDS 0.1% p/v, pH 8.3

3.4. Amortiguador de Muestra 4x, con SDS
En 17.5ml de Tris-OH 49mM, pH 6.75-6.80 se disolvieron 1g de SDS y 5mg de azul de bromo-fenol, el producto se mezcló con 5ml de glicerol y se aforó a 50ml con agua. Al momento de usarse se agregó 5% v/v de 2-mercaptoetanol.

3.5. Acrilamida/bisacrilamida 30%(acrilamida 30%T, 2.7%C)
29.2g de acrilamida y 0.8g de metilén-bis-acrilamida fueron mezclados con 70ml de agua en matraz Erlenmeyer (cubierto con papel aluminio) y sometidos a agitación suave por 12 horas a 4°C. Una vez a temperatura

ambiente se aforó a 100ml con agua, se filtró con papel Whatman y se mezcló con Amberlita XAD7(mesh 20-60) en proporción 4:1 v/v dejándose en agitación suave durante 1hora a 4°C. Se filtró, recuperándose en frasco cubierto con papel aluminio, y se almacenó a 4°C.

Miniprotean:

3.6. Gel de Empaquetamiento o Concentrador (5%T, 2.7%C), con SDS.

Acrilamida bis-acrilamida 30% (30%T, 2.7%C)	499µl
Amortiguador Tris-HCl ph 6.8	375
Agua bidestilada	1980
SDS 10% p/v	30
Persulfato de Amonio 10% p/v	10.5
TEMED	3

3.7. Gel de Corrimiento o Separación, en Gradiente 8.75 –18%, 2.7%C

	8%	18%
Acrilamida bis-acrilamida 30% (30%T, 2.7%C)	0.832ml	1.461
Amortiguador Tris-HCl 6.8	0.457	0.458
Agua bidestilada	1.100	0.224
Glicerol 50% v/v	0.166	0.257
SDS 10% p/v	30µl	30µl
Persulfato de Amonio 10% p/v	8	8
TEMED	1.25	1.25

Protean:

3.6. Gel de Empaquetamiento o Concentrador (5%T, 2.7%C), con SDS.

Acrilamida bis-acrilamida 30% (30%T, 2.7%C)	1.99ml
Amortiguador Tris-HCl	1.5

ph 6.8

Agua bidestilada.....7.92

SDS 10% p/v.....0.12

Persulfato de Amonio 10% p/v.....0.042

TEMED.....0.012

3.7. Gel de Corrimiento o Separación, en Gradiente 8.75 –18%, 2.7%C

	8%	18%
Acrilamida bis-acrilamida 30% (30%T, 2.7%C).....	2.04ml	4.197
Amortiguador Tris-HCl..... 6.8	1.32	1.32
Agua bidestilada.....	3.060	0.645
Glicerol 50% v/v.....	0.480	0.740
SDS 10% p/v.....	69µl	69µl
Persulfato de Amonio 10% p/v.....	25	25
TEMED.....	3	3

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma.

4.Reactivos para la determinación de Anticuerpos anti-proteínas intracelulares de *S. somaliensis, A. madurae y N. brasiliensis* mediante inmunoelectrotransferecia.

4.1 Buffer de Transferencia Tris-HCl 195mM, Glicina 192mM

se disolvieron 14.41 g de Glicina y 4. g de Trizma-HCl en 400ml de agua más 400ml de metanol, y se aforó a 1L.

4.2 PBS-Tween. PBS 0.1M pH 7.4 se mezcló en proporción 1, 000 :1 v/v con Tween 20 (BIO RAD).

4.3. Solución bloqueadora al 3% p/v. Se disolvieron 3g de lecho descremada(Svelty, Nestlé) en PBS-Tween y se aforaron a 100ml con el mismo PBS-Tween.

4.4. Antisueros conjugados a Peroxidasa.

Ig anti-inmunoglobulinaG de ratón, conjugado a peroxidasa (Sigma), diluido 1:6000 v/v en solución bloqueadora al 1%.

Ig anti-inmunoglobulinaG de rata, conjugado a peroxidasa (Sigma), diluido 1:12000 v/v en solución bloqueadora al 1%.

Ig anti-inmunoglobulinaG de conejo, conjugado a peroxidasa(sigma), diluido 1:14000 v/v en solución bloqueadora al 1%.

4.5.Solución de sustrato/cromógeno. Se disolvieron 10mg de tetraclorhidrato de 3,3-diaminobencidina en 20ml de PBS y se añadieron 40µl de peróxido de hidrógeno.

TABLAS

Tabla. 1 Antígenos de *S. somaliensis* identificados por suero de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con la misma.

Antígenos proteicos de *S. somaliensis* (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados	Ratones BALB/c Inmunizados	Ratas Lewis Infectadas	Ratas Lewis Inmunizadas	Conejos Nueva Zelanda Infectados	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados
10	0/8	5/8	0/6	0/6	0/2	2/2
12	0/8	6/8	0/6	6/6	2/2	2/2
20	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
21	3/8	8/8	2/6	6/6	2/2	2/2
23	1/8	6/8	2/6	6/6	2/2	2/2
28	8/8	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2
29	0/8	3/8	4/6	1/6	2/2	2/2
30	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
32	7/8	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2
40	5/8	5/8	6/6	0/6	2/2	2/2
42	1/8	1/8	3/6	0/6	1/2	1/2
44	0/8	0/8	1/6	5/6	1/2	2/2
49	0/8	0/8	0/6	3/6	0/2	2/2
53	8/8	0/8	6/6	0/6	2/2	2/2

Ratones n=8; ratas n=6 y conejos n=2

Tabla. 2 Antígenos de *A. madurae* identificados por suero de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con la misma.

Antígenos proteicos de *A. madurae* (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados	Ratones BALB/c Inmunizados	Ratas Lewis Infectadas	Ratas Lewis Inmunizadas	Conejos Nueva Zelanda Infectados	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados
10	2/8	8/8	2/6	4/6	2/2	2/2
12	3/8	6/8	0/6	3/6	2/2	2/2
15	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	1/2
17	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
21	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
28	8/8	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2
32	8/8	8/8	0/6	0/6	2/2	2/2
35	8/8	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2
38	8/8	0/8	6/6	0/6	1/2	2/2
40	2/8	3/8	6/6	5/6	0/2	0/2
44	3/8	2/8	1/6	4/6	1/2	1/2
47	0/8	6/8	0/6	0/6	0/2	0/2
54	0/8	6/8	0/6	0/6	0/2	0/2
76	1/8	0/8	1/6	4/6	0/2	0/2

Ratones n=8; ratas n=6 y conejos n=2

Tabla. 3 Antígenos de *N. brasiliensis* identificados por suero de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con la misma.

Antígenos proteicos de *N. brasiliensis*(PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados	Ratones BALB/c Inmunizados	Ratas Lewis Infectadas	Ratas Lewis Inmunizadas	Conejos Nueva Zelanda Infectados	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados
15	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
21	0/8	2/8	6/6	0/6	2/2	2/2
24	5/8	7/8	3/6	6/6	2/2	2/2
28	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
35	5/8	8/8	3/6	0/6	2/2	2/2
38	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
41	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
45	0/8	0/8	5/6	0/6	2/2	2/2
53	0/8	8/8	0/6	0/6	2/2	2/2
61	8/8	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2

Ratones n=8; ratas n=6 y conejos n=2

Tabla. 4 Antígenos de *S. somaliensis* identificados por sueros de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con *A. madurae* o con *N. brasiliensis*.

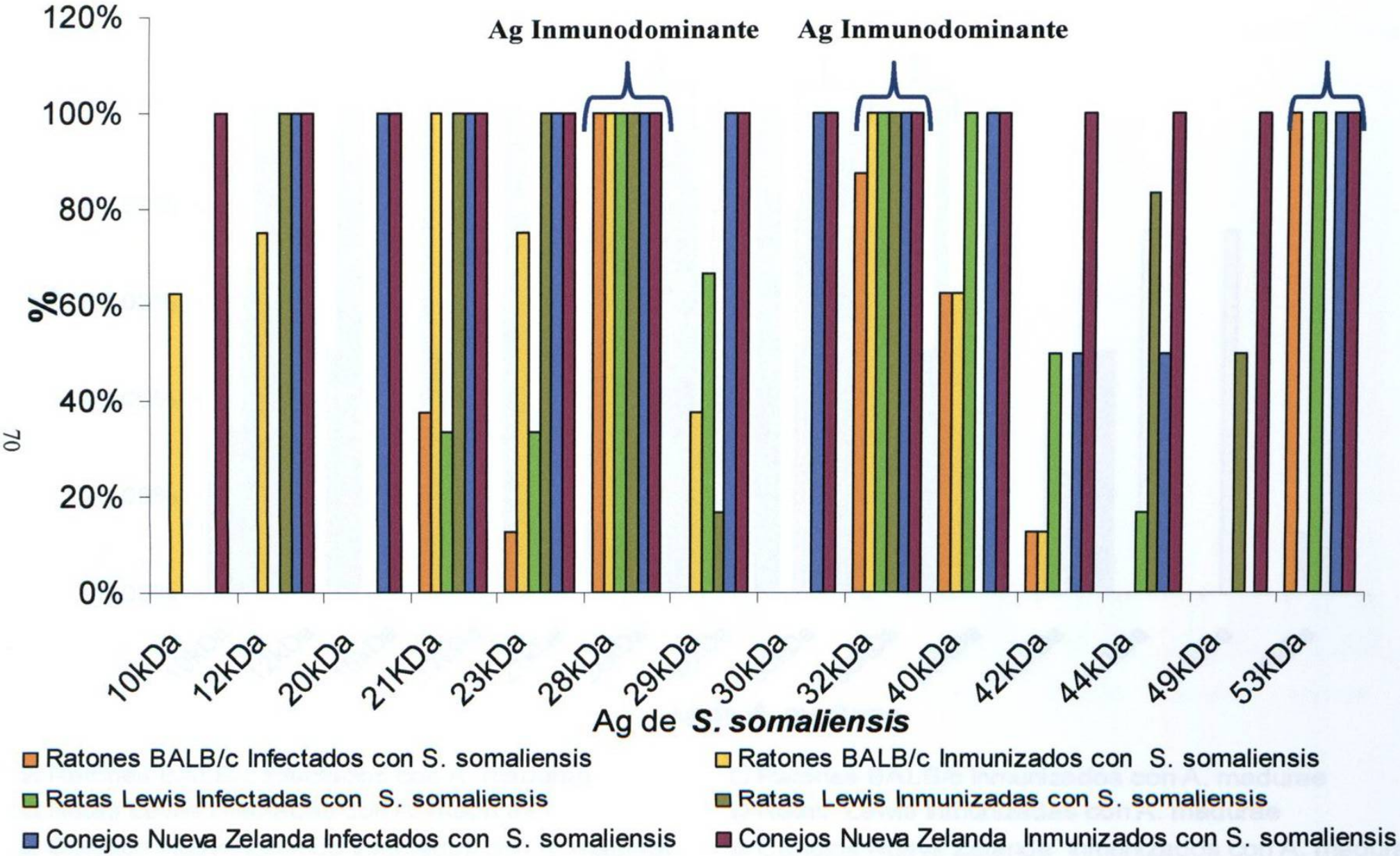
Antígenos proteicos de *S. somaliensis* (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados con *A. madurae.*	Ratones BALB/c Inmunizados con *A. madurae*	Ratas Lewis Infectadas con *A. madurae*	Ratas Lewis Inmunizadas con *A. madurae*	Conejos Nueva Zelanda Infectados con *A. madurae*	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con *A. madurae*
10	0/8	0/8	0/6	0/6	0/2	2/2
12	0/8	1/8	0/6	0/6	1/2	2/2
20	3/8	6/8	0/6	0/6	0/2	½
21	3/8	6/8	0/6	0/6	2/2	2/2
23	3/8	6/8	0/6	0/6	2/2	2/2
Antígenos proteicos de *S. somaliensis* (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados con *N. brasiliensis*	Ratones BALB/c Inmunizados con *N. brasiliensis*	Ratas Lewis Infectadas con *N. brasiliensis*	Ratas Lewis Inmunizadas con *N. brasiliensis*	Conejos Nueva Zelanda Infectados con *N. brasiliensis*	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con *N. brasiliensis*
10	0/8	0/8	0/6	0/6	0/2	2/2
12	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	½
20	4/8	7/8	0/6	2/6	0/2	0/2
21	4/8	7/8	0/6	5/6	2/2	2/2
23	3/8	1/8	0/6	1/6	2/2	2/2

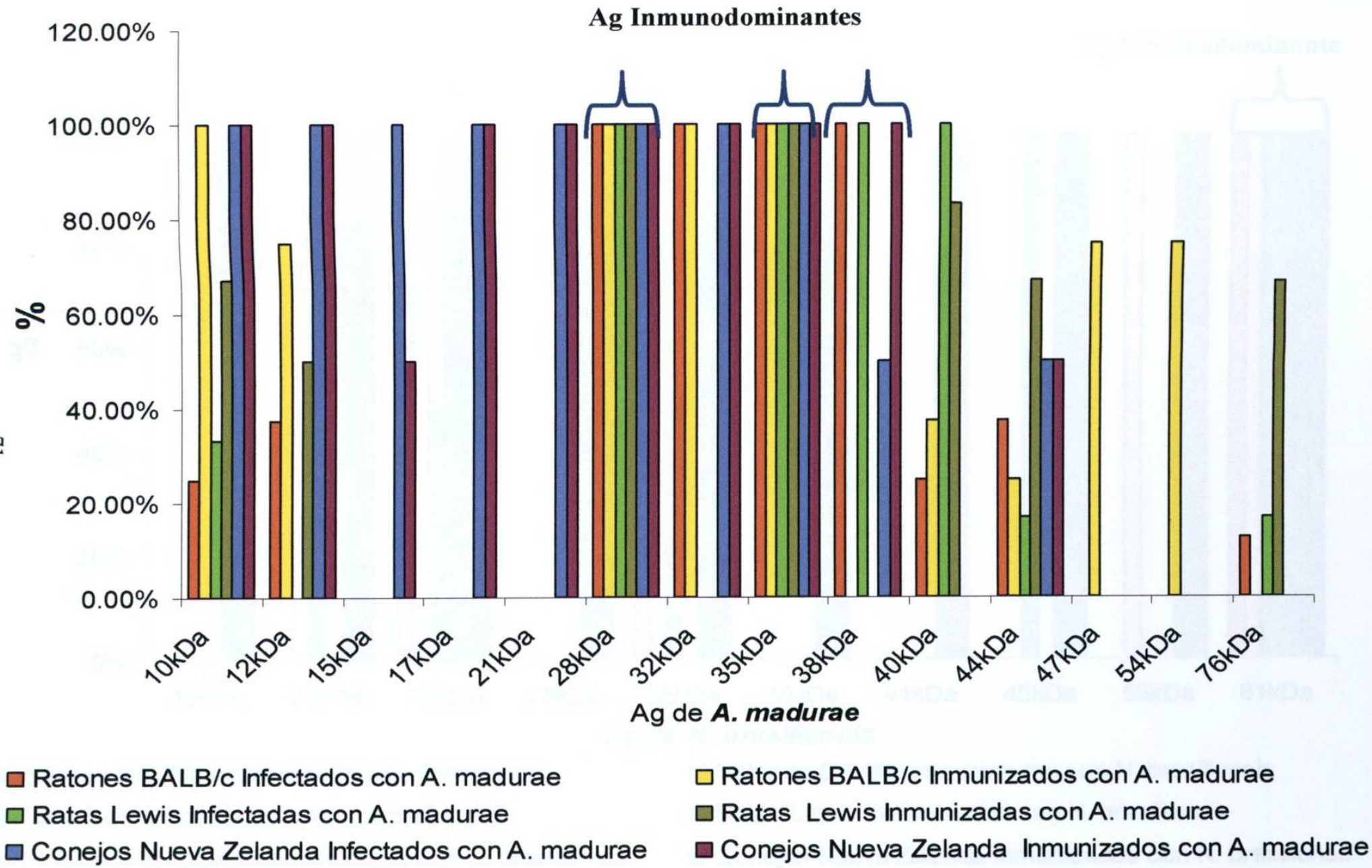
Tabla. 5 Antígenos de *A. madurae* identificados por sueros de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con *N. brasiliensis* o con *S. somaliensis.*

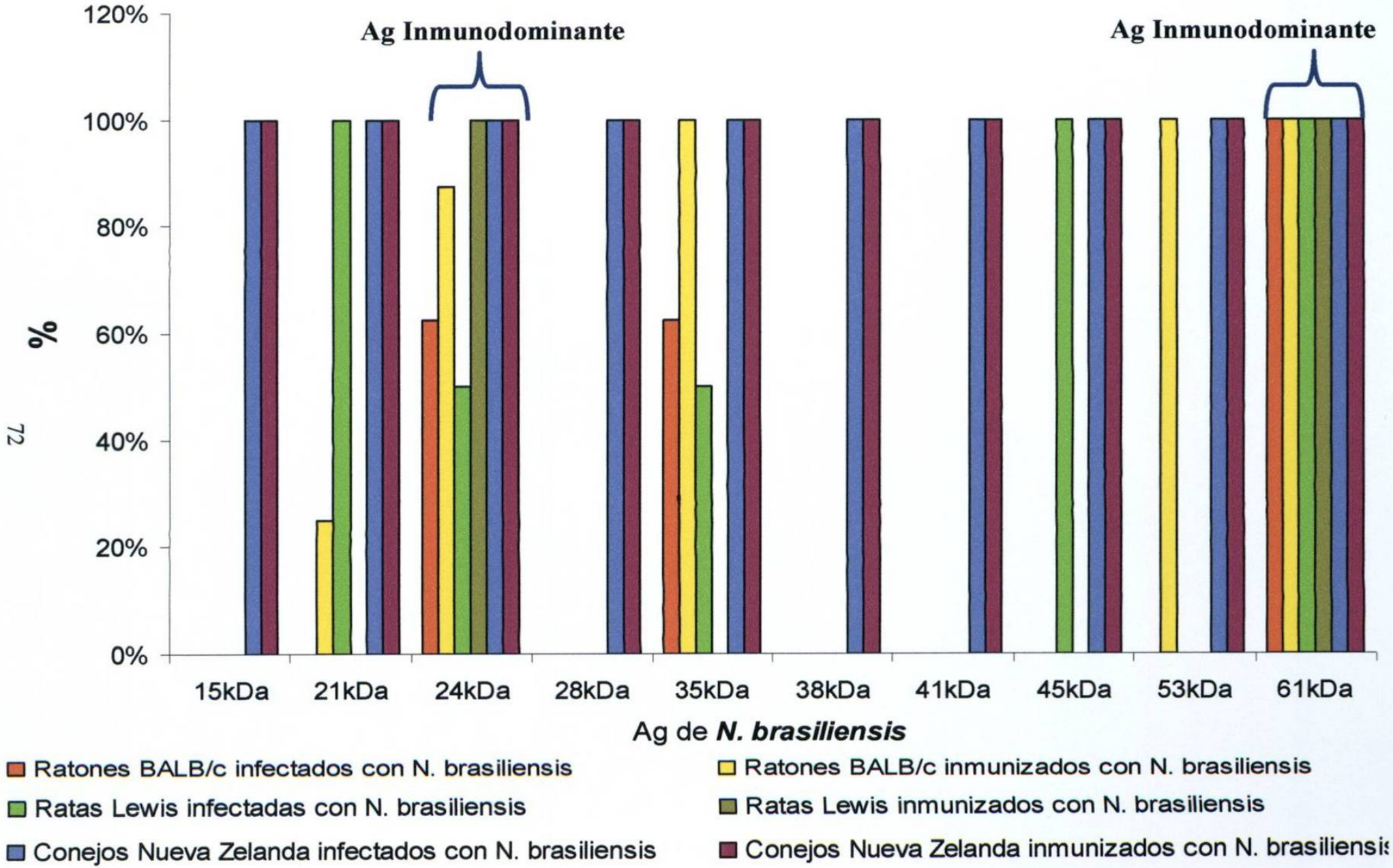
Antígenos proteicos de *A. madurae* (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados con *N. brasiliensis*	Ratones BALB/c Inmunizados con *N. brasiliensis*	Ratas Lewis Infectadas con *N. brasiliensis*	Ratas Lewis Inmunizadas con *N. brasiliensis*	Conejos Nueva Zelanda Infectados con *N. brasiliensis*	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con *N. brasiliensis*
21	0/8	3/8	0/6	0/6	0/2	0/2
Antígenos proteicos de *A. madurae* (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados con *S. somaliensis*	Ratones BALB/c Inmunizados con *S. somaliensis*	Ratas Lewis Infectadas con *S. somaliensis*	Ratas Lewis Inmunizadas con *S. somaliensis*	Conejos Nueva Zelanda Infectados con *S. somaliensis*	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con *S. somaliensis*
21	0/8	0/8	0/6	0/6	0/2	0/2

Tabla. 6 Antígenos de *N. brasiliensis* identificados por sueros de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con *A. madurae* o con *S. somaliensis.*

Antígenos proteicos de *N. brasiliensis* (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados con *A. madurae.*	Ratones BALB/c Inmunizados con *A. madurae*	Ratas Lewis Infectadas con *A. madurae*	Ratas Lewis Inmunizadas con *A. madurae*	Conejos Nueva Zelanda Infectados con *A. madurae*	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con *A. madurae*
24	2/8	6/8	0/6	0/6	2/2	2/2
61	0/8	0/8	0/6	0/6	0/2	1/2
Antígenos proteicos de *N. brasiliensis* (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados con *S. somaliensis*	Ratones BALB/c Inmunizados con *S. somaliensis*	Ratas Lewis Infectadas con *S. somaliensis*	Ratas Lewis Inmunizadas con *S. somaliensis*	Conejos Nueva Zelanda Infectados con *S. somaliensis*	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con *S. somaliensis*
24	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2


Ag Inmunodominante
Ag Inmunodominante
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
%
10kDa
12kDa
20kDa
21KDa
23kDa
28kDa
29kDa
30kDa
32kDa
40kDa
42kDa
44kDa
49kDa
53kDa
Ag de S. somaliensis
Ratones BALB/c Infectados con S. somaliensis
Ratones BALB/c Inmunizados con S. somaliensis
Ratas Lewis Infectadas con S. somaliensis
Ratas Lewis Inmunizadas con S. somaliensis
Conejos Nueva Zelanda Infectados con S. somaliensis
Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con S. somaliensis


Ag Inmunodominantes
120.00%
100.00%
80.00%
60.00%
40.00%
20.00%
0.00%
%
10kDa
12kDa
15kDa
17kDa
21kDa
28kDa
32kDa
35kDa
38kDa
40kDa
44kDa
47kDa
54kDa
76kDa
Ag de *A. madurae*
Ratones BALB/c Infectados con A. madurae
Ratones BALB/c Inmunizados con A. madurae
Ratas Lewis Infectadas con A. madurae
Ratas Lewis Inmunizadas con A. madurae
Conejos Nueva Zelanda Infectados con A. madurae
Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con A. madurae


Ag Inmunodominante
Ag Inmunodominante
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
%
15kDa
21kDa
24kDa
28kDa
35kDa
38kDa
41kDa
45kDa
53kDa
61kDa
Ag de N. brasiliensis
Ratones BALB/c infectados con N. brasiliensis
Ratones BALB/c inmunizados con N. brasiliensis
Ratas Lewis infectadas con N. brasiliensis
Ratas Lewis inmunizados con N. brasiliensis
Conejos Nueva Zelanda infectados con N. brasiliensis
Conejos Nueva Zelanda inmunizados con N. brasiliensis

TIPO DE ADQUISICION
DONATIVO