



DESARROLLO EN MEXICO DE LA PRUEBA DE ELISA TWEEN 20 PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA NEUMONIA ENZOOTICA.

Cruz Sánchez, T.A** Ilerández German. F., Aguilera Cerón E, Lara Puente. J.H., Mendoza Elvira, S., Ciprián Carrasco A.

Coordinación General de Estudios de Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Primero de Mayo s/n, Colonia Atlanta, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, C.P. 54700, Apartado Postal 222, Telefono y FAX 873 08 34. México.

Proyecto apoyado por PADEP: 100302 U.N.A.M..

Cátedra: Microbiología de las Enfermedades respiratorias del Cerdo.

INTRODUCCION

En la producción porcina mundial, los problemas neumónicos ocasionan importantes pérdidas económicas, siendo la Neumonía Enzoótica una afección de gran relevancia en este renglón. la Neumonía Enzoótica es una enfermedad crónica respiratoria producida por *Mycoplasma hyopneumoniae* y en México se ha encontrado una incidencia del 20 al 80% determinada por patología de las lesiones neumónicas. Se ha demostrado la presencia de A~ *hyopneumoniae* por medio de la prueba de Inmunofluorescencia indirecta, encontrándose en un 23 % de fluorescencia en pulmones de abasto². Asi mismo, se ha logrado el aislamiento e identificación de *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* y *M. hyorhinis* en casos típicos tanto de rastro como de campo de Neumonía Enzoótica. Se ha demostrado que A~ *hyopneumoniae* es el agente primario que propicia la entrada de bacterias oportunistas y su interacción con ellas como es el caso de las pasterelas³. Recientemente han sido elaborados un conjugado fluorescente y otro de Inmunoperoxidasa para la detección del micoplasma en tejido pulmonar por el método directo, los cuales han mostrado su efectividad en casos de campo, de tal manera que en dos estados del país (Yucatán y Michoacán) han introducido en forma rutinaria el diagnóstico de inmunofluorescencia. Sin embargo, la importación de reactivos y kits comerciales para el diagnóstico inmunológico es difícil, debido a las restricciones sanitarias que existen y la natural salida de caras divisas. Por ello el objetivo del presente trabajo fue la obtención de un antígeno específico de A~ *hyopneumoniae* para el desarrollo de la prueba de ELISA Tween 20 y su aplicación en el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica, mediante el metodo indirecto.

MATERIAL Y METODOS.

Cepas de Micoplasmas: Para la preparación del antígeno Tween 20 (Hiix) fue utilizada una cepa de *M. hyopneumoniae* aislada de un pulmón con Neumonía Enzoótica, la cual fue identificada por prueba de Inhibición de crecimiento por los los autores de este trabajo. La cepa Ms42 de *M. flocculare* (proporcionada por el Dr. Pijoan, Universidad de Minnesota, U.S.A.) fue utilizada para la preparación de antígeno de suero hiperinmune porcino.

Cultivo de los micoplasmas: tanto la cepa de A~ *hyopneumoniae* y la cepa Ms42 de *M. flocculare* fueron inoculados en 2 litros de medio de Friis (1971), los cuales se incubaron a 37 ° C en agitación a 70 rpm y las celulas fueron cosechadas en la fase exponencial del cultivo (pH 6.8) Despues fueron centrifugados a 20,000 g por 20 minutos a 4° C y lavadas tres veces con 0.25 M de NaCl. Las celulas fileron resuspendidas a 1/200 del volumen original en 0.25 M NaCl y conservadas a -20° C.

Preparación del Antígeno Tween 20 modificado de 1~ *hyopneumoniae* (Hiix): Del cultivo de *M. hyopneumoniae* conteniendo 3 mg de proteína fue resuspendido en 3ml. de Buffer de fosfatos (0.0125 M., pH 7.1) conteniendo 1% (v/v) de tween 20 e incubado a 37° C por 90 minutos en agitación. Después el cultivo fue centrifugado a 48,000 xg durante 60 mins. a 4° C y el sobrenadante obtenido fue filtrado en membrana Millipore de 0.22 ~lm y conservado a -20° C. Esta preparación fue designada como antígeno Tween 20 (Nicolet, 1980).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE): Tanto la cepa como el antígeno tween 20 fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (PAGE) al 13%. Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie.

Sueros. El control positivo fue un suero hiperinmune del~*hyopneumoniap* fue obtenido de un cerdo SPF inoculado de acuerdo a un esquema modificado sugerido por Young y Ross (1987). elaborado por los autores.

El control negativo fueron sueros dos cerdos SPF. Para la determinación de las recciones cruzadas fueron obtenidos sueros contra A~ *hyorhinis* proporcionado por la Universidad de Iowa. Asi mismo fue elaborado en un cerdo libre de enfermedades respiratorias el antisuero contra *M. flocculare* de la misma manera que se realizó con *M. h yopneumoniae*. Para la determinación de los límites negativos fueron utilizados 41 sueros negativos de campo y 27 sueros positivos donados amablemente por el Q.B.A. Abraham Massa (Laboratorio de Patología Animal, SARH, la Piedad Michoacan, México.) y el Dr. Antonio Morilla (INIFAP-SARH, Centro Experimental, Irapuato, Gto. México) los cuales fueron evaluados previamente con un kit comercial de origen europeo.

Prueba de ELISA: Para el desarrollo de la prueba fueron utilizados los reactivos y metodo indirecto sugeridos en el Kit comercial Microwell ELISAmate for Peroxidase Conjugate (KPL Cat. no. 5462-00).

Para la determinación de los valores los resultados fueron sometidos al análisis estadísticos por medio de la prueba de Tukey con intervalo de confianza del 95%.



RESULTADOS

Gel de poli(acrilamida):

Después de realizar la electroforesis en gel de poli(acrilamida) fueron visibles 9 bandas, que fluctuaron de los 10 kD a los 66 kD. Para la prueba solo se consideraron aquellas bandas mayores a 30 kD, lo que corresponde a las proteínas del *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Reacción cruzada con otras especies de *Mycoplasma*: La reacción cruzada del antígeno con otras especies de *Mycoplasma*, tales como *M. hyorhinis* y *M. flocculare* no fue detectada, como se observa en el Cuadro 1.

DISCUSION

El uso de la prueba de ELISA (Hiix) es importante para el estudio epizootológico de la Neumonía Enzoótica y se constituye como una estrategia de control y erradicación de la enfermedad. La prueba de ELISA Tween 20 (Hiix) se considera altamente específica, ya que no cruza serológicamente con *Mycoplasma hyorhinis* ni con *Mycoplasma flocculare* aun en condiciones experimentales como las sucitadas en el presente trabajo. El uso de sueros de campo para la valoración de la prueba nos permitió tener datos mas apegados a la realidad nacional, tomando en cuenta que los kits de diagnóstico utilizados en el país son importados y estos utilizan como anígeno al *Mycoplasma hyopneumoniae* completo, lo cual nos puede dar reacciones falsas positivas.

Aunado a las condiciones económicas del país y de las dificultades para poder importar material biológico de origen porcino, se considera que esta prueba puede ser una alternativa viable para el diagnóstico, control, prevención y posible erradicación de la Neumonía Enzoótica en las granjas porcinas del país

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cruz, S.T., Mendoza, E.S., Colmenares, V.G., Ilernández, B.E., Ciprián C.A (1994) Desarrollo de las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en tejido pulmonar. En Memorias del ~V Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias Acapulco, México. Octubre. p.145.
- 2.- Ciprián, C.A. Cruz T. and Pijoan (1982) Specific fluorescence against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pneumonic lungs of pig in México. Proceedings of the International Pig veterinary Con~ress: México, City. P. 90.
- 3.- Ciprián, A., Pijoan C. Cruz T. Camacho J, Tórtora J., Colmenares G, López-Revilla R, De la Garza M.(1988) *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the suceptibility of pigs to experimental *Pasteurellamultocida* pneumonia. Can. J.Vet. Res. 52:434.
- 4.- Kazama S., Yaghihashi T. and Seto K. (1989) Preparation of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen for the enzyme-linked immnosorbent assay. Can. J. Vet. Res.53: 176-181.
- 5.- Nicolet, J. and Paroz P. (1980): Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. Res. Vet. Scie. 29: 305-309.
- 6.- Ponce H.C., Cruz S.T., Torres A.O. y Ciprián A. (1986): Cultivo, aislamiento y caracterización de *Mycoplasma hyopneumoniae* de pulmones de cerdo. memorias del X~ Congreso Nacional de la Asociación mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos . México. p. 172.
- 7.- Young, F.T. and Ross, F.R (1987) Assesmente of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. Am. J.Vet. 48:651-656.