



# VALIDACION DE LA PRUEBA DE ELISA TWEEN 20 (HIXX) PRODUCIDA EN LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN PARA EL DIAGNOSTICO DE LA NEUMONIA ENZOOTICA

Hernández German, F\*, Cruz Sánchez, T., Aguilera Cerón, E., Laru 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.

Cuatitlán Izcalli. edo. de México. C.P. 54700, Apartado Postal 222, Teléfono y FAX 8730834. México.

Proyecto apoyado por PADEP: 10032 UNAM

Cátedra: Microbiología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo.

## INTRODUCCION

Los problemas neumónicos causan enormes pérdidas económicas a la porcicultura nacional, 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 (Ciprián y cols 1982, 1988).. Es pese al enorme impacto económico la Neumonía Enzoótica es una entidad patológica poco estudiada en nuestro país, donde el diagnóstico sólo se realiza mediante la evaluación de los signos clínicos y las lesiones posmortem, ya que no se dispone de pruebas de diagnóstico ya sea por su costo o porque no han sido desarrolladas en nuestro país. Desde hace tiempo tanto en Europa como en Estados Unidos se viene trabajando la Prueba de ELISA la cual en un principio tuvo problemas de especificidad ya que daba reacciones cruzadas entre los micoplasmas porcinos importantes, y es cuando Nicolet y Paroz (1980) introducen la prueba ELISA Tween 20 la cual mostró vino a resolver alguno de estos problemas. Actualmente la obtención del antígeno ha sido mejorada como lo demuestran Kazama y colaboradores (1989). Recientemente se ha introducido una prueba de ELISA competitiva mediante el uso de anticuerpo monoclonal específico (Barford y cols. 1994). Sin embargo, la importación de reactivos y kits comerciales para el diagnóstico inmunológico es difícil debido a las restricciones sanitarias. Por ello en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán fue creado el Proyecto Inmunodiagnóstico de la Neumonía Enzoótica, que tiene la finalidad del desarrollo de métodos de diagnóstico y de personal capacitado para diagnosticar esta enfermedad (Cruz y cols.1994). Este trabajo es parte de ese proyecto y tiene la finalidad de ensayar una prueba serológica de ELISA Tween 20 y compararla con una prueba de ELISA comercial utilizada en nuestro país.

## MATERIAL Y METODOS

### Sueros.

El control positivo es un suero hiperinmune de 1 *hyopneumoniae* que 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 cerdos SPF. Para la comparación de las pruebas se utilizaron 52 sueros negativos y 27 sueros positivos donados por el Q.B.A. Abraham Massa. los cuales fueron evaluados previamente en un Kit comercial de origen europeo.

### Prueba de ELISA

Para el desarrollo de la prueba de ELISA fue utilizado el antígeno Tween 20 (Hixx) elaborado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, así como los reactivos y la metodología empleada fue la sugerida en el Kit comercial Microwel ELISAmate for Peroxidase Conjugate (KPL), para llevarse a cabo cualquier tipo de determinación por ELISA.

La dilución óptima y concentración del antígeno fue determinada previamente así que cada pocillo de las placas de poliestireno fue sensibilizada con 100 microlitros del antígeno con 20 ng de proteína durante toda la noche a 4° C. Las muestras de suero fueron diluidas previamente en 1: 100 y adicionadas a las placas. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente fueron lavadas.

Se les adicionó 100 microlitros de un conjugado anti-IgG porcino de conejo marcado con peroxidasa (Sigma-Immunochemicals) a una dilución de 1:2000. Después de 1 hora de incubación fue lavada la placa y se adicionó una solución de sustrato consistente en ABTS y peróxido de hidrógeno; después de 15 minutos la reacción fue detenida con ácido sulfúrico 3N. Se hizo lectura de las placas a una absorbancia de 405 nm. Para la comparación de los resultados se utilizó la prueba estadística de X<sup>2</sup>.

## RESULTADOS

En la titulación de los sueros se observó que el suero de animales S.P.F. el rango fue de 0.0 a 0.667 y el rango del suero hiperinmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae* fue de 1.024 a 1.552. En este trabajo para considerar un suero positivo y negativo se determinaron los rangos de 0.803 a 1.124 y de 0.391 a 0.625 respectivamente. De esta manera fueron comparados con los resultados del kit comercial.

Los resultados obtenidos por el estudio estadístico se muestran en la siguiente tabla, donde se puede apreciar que estadísticamente no hubo diferencias entre las ambas pruebas.

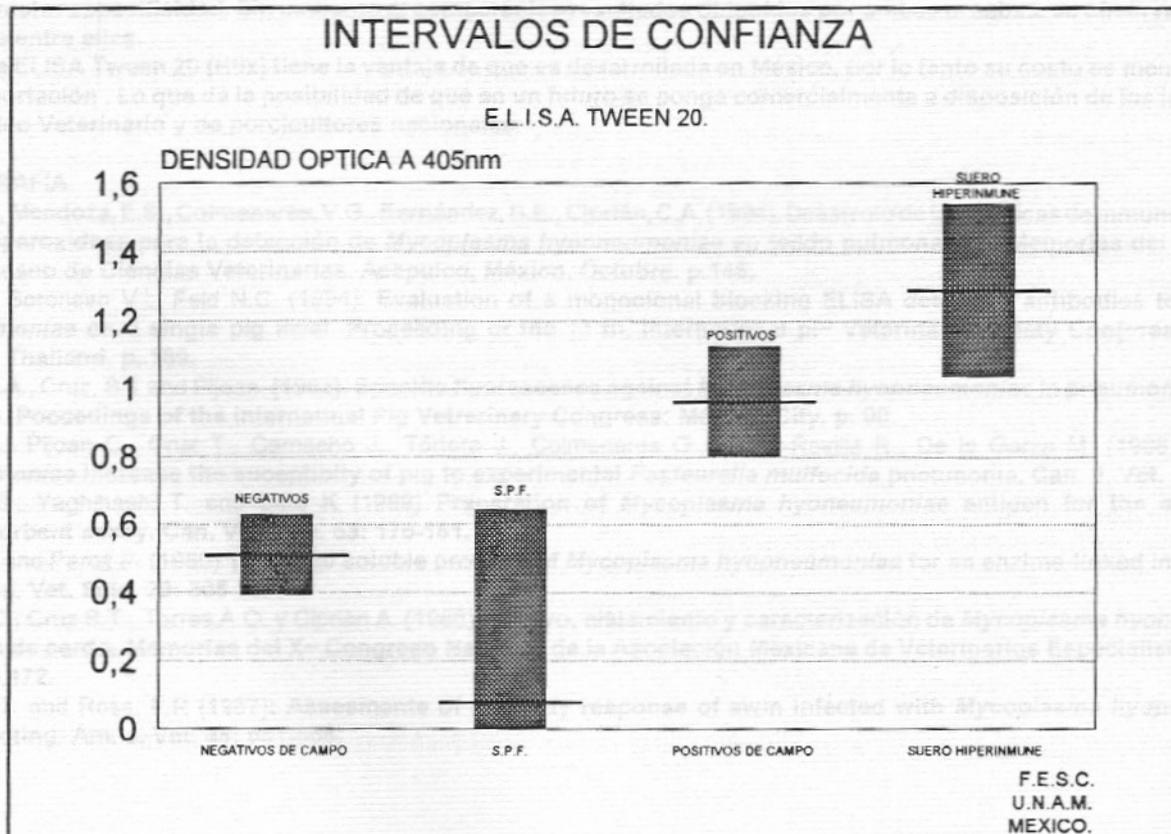
**CUADRO 1. Detección de reacción cruzada entre el antígeno Tween 20 (Hiix) y otras especies de micoplasmas porcinos.**

Suero Lectura de Densidad Óptica (405 nm)

SPF	0.078
<b>Anti</b>	
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	1.335
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	0.011
<i>Mycoplasma flocculare</i>	0.150

**Determinación del valor negativo**

El total de los sueros tanto negativos como positivos fueron sometidos a la prueba de Tukey. El valor negativo de los sueros de campo fue determinado en un rango de 0.391 a 0.625, mientras que los positivos se encontraron dentro de un rango de 0.803 a 1.124, también se observó que el rango para los sueros de animales S.P.F. fue de 0.0 a 0.667 y el rango del suero hiperinmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae* fue de 1.024 a 1.552, como lo muestra la siguiente tabla.





**TABLA 1 RESULTADOS DE LA PRUEBA X<sup>2</sup>**

Clase	Resultado Esperado	Resultado Observado	Desviación	O-E <sup>2</sup>	O-E / E
Positivo	27	29	2	4	.148
Negativo	52	50	-2	4	.076
Total	79	79			.224

G.L=1

**DECISIÓN:** No existe diferencia entre las pruebas.

#### DISCUSION.

La prueba ELISATween 20 (Hixx) utiliza un antígeno altamente específico, que no da reacción cruzada con otros micoplasmas presentes en los cerdos; en cambio en la prueba comercial se utiliza como antígeno un preparado de células completas, lo que le puede restar especificidad. Sin embargo al comparar los resultados obtenidos por ambas pruebas, se observa que no existe diferencia entre ellas.

La prueba ELISA Tween 20 (Hiix) tiene la ventaja de que es desarrollada en México, por lo tanto su costo es menor, evitándose así la importación. Lo que da la posibilidad de que en un futuro se ponga comercialmente a disposición de los laboratorios de Diagnóstico Veterinario y de porcicultores nacionales.

#### BIBLIOGRAFIA

- Cruz, S.T., Mendoza, E.S., Colmenares, V.G., Eernández, 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 XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, México. Octubre. p.145.
- Barfod K, Sorensen V., Feld N.C. (1994): Evaluation of a monoclonal blocking ELISA detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* on a single pig level. Proceeding of the 13 th. International pig Veterinary Society Conference, 26-30 June, Bangkok, Thailand. p.189.
- Ciprián, C.A., Cruz, S.T and Pijoan. (1982). Specific fluorescence against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pneumonic lungs of pig in México. Proceedings of the International Pig Veterinary Congress: México, City. p. 90.
- Ciprián, A., Pijoan C., Cruz T., Camacho J., Tórtora J., Colmenares G., López-Revilla R., De la Garza M. (1988) *Mycoplasma hyopneumoniae* increase the susceptibility of pig to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. Can. J. Vet. Res. 52: 434.
- Kazama S., Yaghihashi T. and Seto K (1989) Preparation of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen for the enzyme-linked immunosorbent assay. Can. Vet. Res. 53: 176-181.
- Nicolet, J. and Paroz P. (1980) Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* for an enzyme-linked immunosorbent assay. Res. Vet. Scie. 29: 305-309.
- 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.
- Young, F.T. and Ross, F.R (1987): Assessment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. Am. J. Vet. 48: 651-656.