

PRODUCCION DE SUERO HIPERINMUNE CONTRA *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* Y *MYCOPLASMA FLOCCULARE* PARA USO DIAGNOSTICO

Cruz S.T.A*, Hernández G.F., León S. C., Mendoza E. S. y Ciprián C.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, I-calli Edo. de México. CP. 54700, Apartado Postal 222, Teléfono y Fax 8730834, México.

Proyecto apoyado por PADEP-UNAM: 100302.

Cátedra: Microbiología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo.

INTRODUCCION.

La Neumonía Enzoótica es una enfermedad crónica respiratoria causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*, Para su diagnóstico se puede realizar el aislamiento e identificación bioquímica, aunque resulta difícil y tedioso, por lo cual se ha recurrido a la utilización de procedimientos inmunológicos para su identificación mediante las pruebas de inhibición de crecimiento e epifluorescencia. Dentro de estas pruebas están la prueba de fijación de complemento y ELISA Tween 20. También puede detectarse al micoplasma en tejido pulmonar mediante pruebas de inmunofluorescencia, sondas génicas y PCR. A pesar de que la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el país, existen pocos recursos para su diagnóstico ya que en la actualidad solo se puede realizar mediante la observación de lesiones macroscópicas y microscópicas. Aunque recientemente se han introducido kits comerciales para su diagnóstico serológico. Uno de los objetivos de este trabajo es la producción de sueros hiperinmunes que puedan ser utilizados en la detección del micoplasma en el pulmón mediante las técnicas de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa, así como la identificación de colonias o cultivos mediante las pruebas de inhibición de crecimiento, Epiinmunofluorescencia e inmunoperoxidasa.

MATERIAL Y METODOS. Animales.

Para la producción de suero hiperinmune se emplearon los siguientes animales: tres cerdos S.P.F. proporcionados por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria y Forestal (INIFAP-SARH), Palo Alto y 15 conejos nueva Zelanda de aproximadamente 1.5 kg, proporcionados por el Módulo de Conejos del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M

Todos los animales fueron seronegativos a *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* ~ serotipos 1,3,5, 7) y a *Pasteurella multocida* tipo D.

Antígenos de *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare*.

Se empleó como antígeno la cepa 194 de *Mycoplasma hyopneumoniae* donada por el Dr. Ross de la Universidad de Iowa. Así también fue utilizada la cepa de referencia de *Mycoplasma flocculare* Ms42 donada amablemente por el Dr. Carlos Pijoan de la Universidad de Minnesota. Para la producción del antígeno de ambas cepas se siguió el proceso sugerido por Nicolet (1980).

Calendarios de Inmunización. Cerdos S.P.F: Para la inmunización se siguió el calendario sugerido por Young y Ross (1987). Conejos: Debido a que la bibliografía señala varios calendarios se tomó la decisión de evaluar cinco formas de inmunización sugeridos por Klinkert y cols. (1985), Janson R. (1974), Williams y Taylor Robinson (1967), Ciprián (1978) Y Pijoan (1973). Después de concluir los calendarios de inmunización los animales fueron anestesiados y se obtuvo su sangre por punción cardíaca, la sangre así obtenida fue depositada en frascos estériles durante 24 hrs a 4 C, seguidamente el suero fue centrifugado y depositado en alícuotas y conservado a -20C hasta el momento de su uso.

Titulación.

Para la titulación se empleó la prueba de ELISA Tween 20 (Hiix) desarrollada en la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán para su aplicación en el cerdo y su modificación para su uso en el conejo. Se utilizaron microplacas de poliestireno sensibilizadas con el Antígeno Tween 20 (Hiix) de *Mycoplasma hyopneumoniae* en donde se realizaron diluciones dobles del suero. Después de 1 hr de incubación a temperatura ambiente fueron lavadas. Se adicionó 100 microlitros del conjugado anti IgG porcino de conejo marcado con peroxidasa (Sigma) para los sueros porcinos y anti IgG de conejo de cabra marcado con peroxidasa (Sigma) para los sueros de los conejos a una dilución 1 :2000 y 1: 3200 respectivamente. Después de 1 hr de incubación fue lavada la placa y se adicionó una solución de sustrato ABTS (KPL) después de 25 minutos la reacción fue detenida con ácido sulfúrico y las placas fueron leídas a 405 nm. Para el caso del antisuero de *Mycoplasma flocculare* se empleó el mismo procedimiento solo que las placas fueron sensibilizadas con antígeno completo de la cepa de *m. flocculare* cepa Ms42.

RESULTADOS Y DISCUSION.

El titulo de los sueros hiperinmune porcino y de los conejos bajo diferentes protocolos de inmunización utilizados fueron los siguientes:

TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES PROTOCOLOS DE INMUNIZACION UTILIZADOS EN LOS CERDOS Y CONEJOS

Animal	No. de Animales	Promedio del título de anticuerpos.
Antisuero contra <i>M. flocculare</i>		
Cerdo	1	1: 2046
Antisuero contra <i>M. hyopneumoniae</i>		
Cerdo	2	1:2046
Conejo		
Protocolo		
1	5	1 : 537.4
2	2	1 : 1024
3	2	1 : 768
4	3	1 : 2046
5	3	1 : 2046

Los antisueros producidos en los cerdos de los dos antígenos en promedio tuvieron un título de 1 :2046, no detectándose reacción cruzada con los sueros porcinos para los dos micoplasmas. . Asi mismo para el caso de los conejos los protocolos 4 y 5 resultaron significativamente mejores en la producción de antisuero obteniéndose títulos recomendados por otros autores para su utilización en las tecnicas indirectas de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa para la detección del micoplasma en tejido pulmonar, asi como la identificación de 1~ *hyopneumoniae* y *M. Jlocculare* a partir de cultivos mediante las pruebas de inhibición de crecimiento e epifluorescencia

Con este procedimiento se puede establecer ya un protocolo de trabajo de inmunización y titulación para la obtención de antisueros de buena calidad que pueden utilizarse como sueros de referencia para pruebas como EUSA, fijación de complemento, asi como ser la base de la preparación de conjugados para el diagnóstico en México de la Neumonía Enzoótica.

BIBLIOGRAFIA.

Ciprián C A.: Aislamiento y caracterización de micoplasmas a partir de puomones neumónicos de ovinos y caprinos de México. Tesis de Maestría . ENEPC-INIP. 1979

Janson R: Evaluation of some serological techniques for the identification of *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma suipneumoniae*. Acta Vet. Scand. 15: 274-282. 1974

Klinkert M., Herrman and Schaller H : Surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* identified from an *Escherichia coli* expression plasmid library. Infect Immun 49 . 329-335 . 1985.

Nicolet, J. and Paroz P.: Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen for the enzyme-linked immunosorbent assay. Can. J. Vet. Res. 53: 176-181. 1980.

Pijooan C: Studies of *Mycoplasmas* in relation to porcine respiratory diseases. PhD Thesis. Univ. of Surrey. 1973..

Williams, M.H. and Taylor-Robinson D . Antigenicity of Mycoplasma membranes, Nature: 215: 973-974. 1967.

Young F.T. and Ross F.R.: Assesment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. Am.J.Vet. Res. 40: 651-656. 1987.