

INTERACCION SEROLOGICA DE PROTEINAS DE SOBRENADANTE DE CULTIVO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* CON SUEROS DE ANIMALES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE, EN FORMA NATURAL Y ANIMALES VACUNADOS CON BACTERINA COMERCIAL. \*F. Díaz A. 1, E. Aguilera C. 2, T. A. Cruz S. 1, S. Mendoza E. 2, J. A. Ciprián C. 2. 1. Departamento de Ciencias Biológicas, FES-C. 2. Coordinación de Estudios de Posgrado, FES-C. FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, U.N.A.M. Apdo. postal 222, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México C.P. 54700 FAX 8730834 Cátedra: Afecciones bacterianas y virales del cerdo, PADEP 100001 \* Becario CONACYT 90582

## INTRODUCCION

El estudio de la patogenia de *Mycoplasma hyopneumoniae* ha enfocado sus esfuerzos en detectar proteínas constitutivas del microorganismo y descubrir cual es la actividad de estas en el tracto respiratorio de los animales infectados. Sin embargo, debemos considerar que los metabolitos secretados por la bacteria en forma de toxinas, enzimas y algunos productos de desecho, pueden participar en forma importante no solo en la invasividad en la infección, sino que pueden funcionar como mecanismos de patogenicidad y virulencia.

## OBJETIVO

El presente trabajo tiene como objetivo principal detectar las proteínas que se secretan durante una cinética de crecimiento y denotar su reacción contra sueros de animales infectados y vacunados.

## METODOLOGIA

Para el desarrollo experimental se inocularon 5 mg/ml de proteína total (1) de *Mycoplasma hyopneumoniae* cepa 194 en medio de Friis, incubando a 37°C durante 10 días (2). Para determinar las proteínas producidas durante la cinética, se obtuvieron muestras de sobrenadante de cada día para el corrimiento de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS al 12.5% (3, 5). Una vez determinado el perfil electroforético se realizaron transferencias a membranas de Inmobilon utilizando 3 V de corriente constante durante 12 horas, posteriormente se cortaron tiras de la transferencia y se desafiaron con 12 sueros de animales infectados experimentalmente con *Mycoplasma hyopneumoniae* (Título ELISA Tween 20 1:4096), 34 sueros de animales infectados en forma natural (positivos a ELISA) (3) y 24 sueros de animales vacunados con una bacterina comercial, determinando una dilución de 1:5 para todos los sueros como se muestra a continuación:

Dilución 1:5 de suero problema

Bloqueo de tiras transferidas con las proteínas

Lavado para eliminar el exceso de proteína bloqueadora

Desafío de las tiras con los sueros problema en agitación

durante 2 hrs. Lavado para eliminar el exceso de anticuerpo.

Adición de anticuerpo Anti IgG de cerdo peroxidado en agitación 2 horas.

Lavado para eliminar exceso de anticuerpo.

Revelado con solución alfa-cloronaftol-metanol-TBS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4)

## RESULTADOS

El perfil electroforético mostró que el mayor número de proteínas producidas en la cinética se ubicó en el noveno día, determinándose como se muestra en la Tabla 1.

La inmunotransferencia mostró una reactividad similar tanto para animales inculados experimentalmente como con infección natural, mientras que para los animales vacunados se presentó una banda específica como se observa en la Tabla 1.

TABLA 1. PROTEINAS PRESENTES EN LA CINETICA DE 9 DIAS Y SU REACTIVIDAD

MEDIO DE CULTIVO	SOBRENADANTE DIA 9	IT SUERO POSITIVO	IT SUEROS VACUNADOS
112	166	102	102
102	127	79	79
93	111	69	69
83	102	63	63
77	79	58	58
67	69	52	52
62	63	-	22
55	62	-	-
48	57	-	-
26	52	-	-
25	50	-	-
-	38	-	-
-	27	-	-
-	23	-	-
-	22	-	-
-	19	-	-

P.M. = Peso molecular en kD IT (+)= Inmunotransferencia sueros positivos con infección experimental y natural.

IT VAC= Inmunotransferencia sueros positivos animales vacunados.

\* Banda específica para vacunados.

## DISCUSION

Las proteínas secretadas por *M. hyopneumoniae* que se determinaron en este estudio se evaluaron por su reactividad con sueros de animales positivos infectados experimentalmente, con infección natural y sueros de animales vacunados. Del perfil electroforético se eliminaron todas aquellas proteínas presentes en el medio de cultivo y aquellas proteínas que presentaron un peso molecular similar a las proteínas del medio de cultivo.

De esta forma se puede asegurar que las proteínas consideradas son producto del metabolismo durante la cinética de crecimiento de *M. hyopneumoniae* y que además son capaces de producir una respuesta inmunológica importante en animales con infección experimental, infección natural y animales vacunados. Es de resaltar la importancia que ofrece la detección de una proteína específica para el caso de los vacunados, ya que puede servir para diferenciar entre animales con infección natural y animales vacunados.

Con los resultados obtenidos es posible concluir que aún cuando *M. hyopneumoniae* es capaz de exportar una gran cantidad de proteínas al medio de cultivo durante una cinética de crecimiento de 9 días, no todas ellas son generadoras de una respuesta inmune.

Aún se debe realizar una investigación sobre la actividad que tienen estas proteínas para seleccionar aquellas que son sujetas a ser neutralizadas y descubrir su papel en la patogenia.

## BIBLIOGRAFIA

- Bradford, M. M. (1976)  
Anal. Biochem 72: 248 - 254
- Friis, N.F. (1971)  
Acta Vet. Scand 12: 454 - 456
- Nicolet, J. (1980)  
Research in Veterinary Science 29: 305 - 309
- Young, F.T. (1987)  
American Journal Veterinary Research 4: 651-656
- Tully, G.J. (1983)  
Methods in Mycoplasmaology  
Academic Press, 3<sup>rd</sup> Edition, p.p 115 - 127