



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**"ENSAYO DE UNA PRUEBA SEROLOGICA  
DE ELISA PARA EL DIAGNOSTICO DE  
*Mycoplasma hyopneumoniae*."**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
**P R E S E N T A :**  
**FROYLAN L HERNANDEZ GERMAN**

ASESORES: MVZ M en C. IGNACIO CRUZ SANCHEZ  
MVZ DR. en C. ABEL CIPRIAN CARRASCO

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

AGENCIA NACIONAL  
 AGENCIA II  
 MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E .

ATN: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA: "Ensayo de una prueba fisiológica de LISA para el diagnóstico de Myxolasma myxomatosa".

que presenta el pasante: Proylan Hernández Germán  
 con número de cuenta: 22267251 para obtener el TITULO de:  
Médico Veterinario Zootecnista.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
 Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 199 <sup>6</sup>

PRESIDENTE	M.V.Z. Gilberto Ochoa Uribe	
VOCAL	M.V.Z. Luz Ma. Ortega de Ochoa	
SECRETARIO	M. en C. Tonatiuh Cruz Sánchez	
PRIMER SUPLENTE	M.V.Z. Victor Quintana Ramírez	
SEGUNDO SUPLENTE	M.V.Z. Heriberto Pajada Nacia	

a mi madre, Martha  
y a mis hermanos Abraham y Alberto

A las siguientes personas que de alguna u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo, con admiración y respeto, mi más sincero agradecimiento:

Dr. en C. Abel Ciprián Carrasco

Dr. en C. Susana Mendoza Elvira

M. en C Tonatiuh Cruz Sánchez

M en C Edgar Aguilera Cerón

M. en C. Horacio Lara Puente

M én C Carolina Moreno Ramos

Q B. A Abraham Massa

Q. F. B. Catalina Garcia Hernández

M. V. Z. Génaro Carrillo V.

Q. F. B. Oscar Torres Ángeles

## RESUMEN

Sin duda el *Mycoplasma hyopneumoniae* es un de los principales factores de inmunosupresión del tracto respiratorio porcino. Sin embargo, es una entidad patológica poco estudiada en nuestro país. Esta falta de información se debe en gran parte a la escasez de pruebas confiables para el diagnóstico del micoplasma en cerdos vivos. Este trabajo tiene la finalidad de ensayar una prueba serológica de ELISA desarrollada en el país y darle validez comparando los resultados obtenidos por esta prueba con sueros previamente diagnosticados con una prueba comercial de ELISA.

Se trabajaron un total de 256 sueros porcino provenientes de granjas porcinas con problemas respiratorios, los cuales se dividieron en dos grupos. En el grupo A se incluyen 81 sueros previamente diagnosticados con una prueba comercial de ELISA, divididos en dos subgrupos. El subgrupo 1 incluye los sueros diagnosticados como negativos por la prueba comercial (53) y en el subgrupo 2 se incluyen los diagnosticados como positivos (28). Los resultados obtenidos fueron 44, 30 y 7 diagnósticos negativos, positivos y sospechosos respectivamente, según el criterio de interpretación para la prueba ELISA Tween 20. En base a estos resultados el análisis comparativo a través de la estadística  $\chi^2$  no establece diferencias entre los resultados obtenidos por ambas pruebas. Sin embargo este análisis solo abre la posibilidad que por esta prueba se obtengan resultados similares a los que se obtendrían por la prueba comercial. En el subgrupo 1 se obtuvieron 39 diagnósticos negativos, 10 positivos y 4 sospechosos, con el 73.58% de resultados iguales en ambas pruebas. En el subgrupo 2 los resultados obtenidos fueron, 20 diagnósticos positivos, 5 negativos y 3 sospechosos, con un 71.42% de resultados iguales en ambas pruebas. En base a esto se desprende que existen diferencias entre los resultados obtenidos por ambas pruebas. Estas diferencias se atribuyen a posibles reacciones inespecíficas. De tal manera que se concluye que la prueba de ELISA Tween 20 requiere de más ensayos antes de ofrecerla como prueba diagnóstica de rutina.

El grupo B lo constituyen 175 sueros provenientes de una zona de elevada producción porcina, los resultados obtenidos son los siguientes: 98 positivos (52.57%), 68 negativos (38.85%) y 15 sospechosos (8.58%). Estos resultados muestran que la Neumonía Enzootica tiene una incidencia elevada.

# I N D I C E

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>1. CARACTERISTICAS GENERALES DE <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i></b>	<b>2</b>
<b>1.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS Mollicutes</b>	<b>2</b>
<b>1.2 ESTRUCTURA</b>	<b>5</b>
<b>1.3 CULTIVO E IDENTIFICACION</b>	<b>6</b>
<b>2. NEUMONIA ENZOOTICA</b>	<b>7</b>
<b>2.1 DEFINICION</b>	<b>7</b>
<b>2.2 ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
<b>2.3 SINERGISMO</b>	<b>8</b>
<b>2.4 EPIZOOTIOLOGIA</b>	<b>9</b>
<b>2.5 IMPORTANCIA ECONOMICA</b>	<b>10</b>
<b>2.6 PATOGENIA</b>	<b>11</b>
<b>2.7 SIGNOS CLINICOS</b>	<b>12</b>
<b>2.8 LESIONES</b>	<b>13</b>
<b>2.8.1 MACROSCOPICAS</b>	<b>13</b>
<b>2.8.2 MICROSCOPICAS</b>	<b>13</b>
<b>2.9 DIAGNOSTICO</b>	<b>14</b>
<b>2.9.1 DIAGNOSTICO SEROLOGICO</b>	<b>14</b>
<b>3. ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA)</b>	<b>15</b>
<b>3.1 ANTECEDENTES</b>	<b>16</b>
<b>3.2 FUNDAMENTOS Y TIPOS</b>	<b>16</b>

<b>3.3 ANALISIS DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL ELISA</b>	<b>18</b>
<b>3.3.1 UNION DE LOS INMUNOREACTIVOS A LA FASE SOLIDA</b>	<b>18</b>
<b>3.3.2 PROCESO DE LAVADO</b>	<b>20</b>
<b>3.3.3 ENZIMA Y CONJUGADO</b>	<b>21</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>2.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>22</b>
<b>2.2 OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>22</b>
<b>III. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>23</b>
<b>3.1 MATERIAL</b>	<b>23</b>
<b>3.2 METODO</b>	<b>24</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<b>V. DISCUSION</b>	<b>33</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>41</b>



## I. INTRODUCCIÓN.

### I. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Los micoplasmas más frecuentemente aislados en los cerdos son: *Mycoplasma hyopneumoniae*, agente etiológico primario de la Neumonía Enzootica, enfermedad infecciosa del tracto respiratorio, descrita en muchos países y que produce importantes pérdidas económicas; aislado en 1965 por Goodwin, Mare y Switzer *Mycoplasma hyorhinis*, que se asocia a pleuritis, pericarditis y artritis; aislado con frecuencia del tracto respiratorio de cerdos sanos; pero se ha establecido que puede producir lesiones pulmonares similares a las que produce el *Mycoplasma hyopneumoniae* *Mycoplasma hyosynoviae*, responsable de producir lesiones articulares. *Mycoplasma flocculare*, ampliamente difundido en el tracto respiratorio, sin que su papel patógeno esté bien definido (2, 4, 25)

Además del tracto respiratorio se aíslan ocasionalmente *Mycoplasma argini*, *Mycoplasma bucale* y algunos *Acholeplasmas*, mientras que del tracto gastrointestinal *Mycoplasma suis* y del tracto genital, *Ureaplasma* (2, 25)

### I.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS Mollicutes.

Los micoplasmas son microorganismos procariotes pertenecientes a la clase de los Mollicutes (del latín *mollis* = blando; *cutis* = piel). Su rasgo principal es que carecen de pared celular, como lo demuestran la microscopía electrónica y el análisis químico, que revelan la ausencia de ácido N-acetil murámico y ácido diaminopimélico. Contienen el mínimo de estructura metabólica y física para llevar a cabo sus procesos vitales de crecimiento y multiplicación. Son capaces de crecer en medios artificiales exentos de células y no revierten a ancestros bacterianos ni provienen de ellos como es el caso de las formas L (Lister). Probablemente son los microorganismos más pequeños capaces de crecimiento autónomo (2, 6, 13, 20, 25, 34, 47).

La clase de los Mollicutes comprende un orden: Mycoplasmatales; y tres familias: *Mycoplasmataceae* (I), *Acholeplasmataceae* (II) y *Spiroplasmataceae* (III). Esta subdivisión se basa en criterios nutricionales, propiedades bioquímicas y morfología (4, 25).

Mientras la familia de los *Acholeplasmataceae* se caracteriza por su independencia de esteroides; las otras dos familias difieren del resto de las procariotas en su dependencia de ellos para crecer (2, 4, 25, 34).

Por su parte la familia *Spiroplasmataceae* se diferencia de las otras dos familias por su morfología helicoidal y sus movimientos rotatorios y ondulantes (25).

Entre las dos primeras familias se han establecido diferencias en el tamaño del genoma, en sus RNAs y la presencia de lactato deshidrogenasa en todas las especies de *Acholeplasmataceae* identificadas a la fecha, misma que no está presente en los miembros de la familia *Mycoplasmataceae*; además tiene la habilidad de incorporar acetato a los lípidos de la membrana, lo que parece ser otro criterio para diferenciar ambas familias (2).

La familia de los *Mycoplasmataceae* comprenden dos géneros: *Mycoplasma*, que se caracteriza por su dependencia de esteroles, porque no hidrolizan la urea y son aerobios facultativos. *Ureaplasma* que se caracteriza porque hidroliza la urea (presencia de ureasa) (4, 25, 34).

Se reconocen dos géneros de posición taxonómica incierta: *Thermoplasma* que requiere de temperaturas de 56 a 60°C y pH de 1 a 2 óptimos para su desarrollo; y el género *Anaeroplasm* que son anaerobios estrictos y presentan cepas que requieren esteroides y otras que no (4, 13, 20, 25, 34, 48).

El análisis al microscopio electrónico revela una estructura extremadamente simple; se identifican tres organelos; la membrana plasmática, ribosomas y el núcleo (25).

La membrana plasmática está compuesta por proteínas y lípidos dispuestos en una estructura trilaminar; al microscopio electrónico se observan dos líneas oscuras de aproximadamente 39 Å, dentro de las cuales hay una zona clara de aproximadamente 50 Å, esta disposición puede ser simétrica o no; por ejemplo, una de las líneas oscuras puede aparecer menos electrodensa y con menor espesor que la otra (4).

En algunas especies la membrana está cubierta por una cápsula que en algunos casos es de naturaleza polisacárida y en otros la naturaleza no ha sido precisada (*M. meleagridis* y *U. urealyticum*) (4, 20, 25).

Los micoplasmas son extremadamente pleomórficos y pueden aparecer como cocos, filamentos, formas filamentosas ramificadas semejantes a los hongos (de ahí el nombre de micoplasmas); sin embargo, son muy sensibles al efecto de la presión osmótica, por lo que es cuestionable que puedan ser vistos libres de defectos producidos durante la preparación de especímenes. La microscopía electrónica revela formas cocoides o filamentosas y en condiciones osmóticas la células se observan redondas o cocoides (2, 4, 25, 34).

En consecuencia la morfología básica es la cocorde y las formas filamentosas son una etapa transitoria del desarrollo, en la que la división del genoma ocurre mucho antes que la división del citoplasma; las cuales terminan por dar origen a cadenas de cocos. El diámetro de la célula varía de 0.3µm a 0.8µm, donde los pequeños elementos cocoides de 0.2µm a 0.3µm de diámetro son las unidades más pequeñas capaces de crecimiento independiente (4, 20, 34).

El genoma tiene un peso molecular que varía de 5 a 10<sup>8</sup> dalton (*Mycoplasma* y *Ureaplasma*) a 5 a 10<sup>9</sup> dalton (*Acholeplasma* y *Spiroplasma*) y está formado por DNA circular bicatenario. El análisis de los ácidos nucleicos muestra un escaso porcentaje de pares de bases G - C que varía de un 23 al 41%. El genoma proporciona la información para la síntesis de unas 600 proteínas. Se dividen por fisión binaria (4, 20, 25, 34).

El cultivo impone grandes exigencias a los medios destinados a este fin; fundamentalmente constan de una base nutritiva, casi siempre extracto de corazón, extracto de levadura (10%), suero (10 a 20%), vitaminas y otros aditivos. En los micoplasmas dependientes de esteroides, el suero es importante como fuente de ácidos grasos y colesterol. Este último es incorporado a la membrana plasmática, donde funciona como factor estabilizante; igual papel desempeñan los carotenoides en los micoplasmas que no requieren de esteroides. Los sueros de equino y fetal bovino son los más empleados (4).

Son capaces de efectuar su propia síntesis de ácidos nucleicos, pero es necesario el aporte de precursores como purinas, piridinas y nucleótidos en algunos casos. Algunos son capaces de

**fermentar azúcares (glucosa, maltosa y fructuosa), mientras que otros hidrolizan la arginina (producen amoníaco a partir de ésta, cepas no fermentadoras) o la urea. El pH del medio se ajusta entre 6 y 8 (2, 4, 25, 34).**

En medio sólido las colonias características pueden observarse después de 3 a 7 días de incubación en condiciones de aerobiosis, y mejor aun, con el 5 al 12% de CO<sub>2</sub>. Se trata de colonias con un diámetro de 50 a 500 µm, que se desarrollan entre las fibras del agar extendiéndose después sobre la superficie en una zona periférica plana, de esta forma queda constituida la típica forma de "huevo estrellado", es decir, un denso cuerpo central que penetra en el agar rodeado por una área circular de un color más claro. En medio líquido el crecimiento se manifiesta por turbidez (25, 34).

## 1.2 ESTRUCTURA

El tamaño y la morfología del *M. hyopneumoniae* son bastante uniformes independientemente de la fase de crecimiento. Las células son redondas o cocoides con un diámetro de 0.2 a 0.5 µm tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta limitada por una membrana trilaminar asimétrica, contigua a esta se observa una cubierta de apariencia rizada, que consiste en delgados y largos pelos o cerdas de 1 a 2 nm de diámetro y 50 a 100 nm de largo (20).

En cortes de pulmón teñidos con ruteno rojo cultivados en presencia de suero hiperinmune, se observa una estructura capsular de 125 nm de espesor, y parecen consistir de elementos fibrilares orientados radialmente (49). El material capsular se extiende entre el micoplasma, las microvellosidades, cilios vecinos e interconectando células micoplasmales (55). Está compuesta por proteínas y carbohidratos entremezclados, la primeras predominan en la capa intermedia; mientras que los segundos predominan en la capa más externa (54).

### 1.3 CULTIVO E IDENTIFICACIÓN

Es uno de los microorganismos más exigentes del género, sin embargo, el desarrollo de medios complejos como los descritos por Eris y Goodwin facilitan su aislamiento (25).

En medio líquido con glucosa y rojo de fenol como indicador, el crecimiento se evalúa por el cambio de color rojo (pH 7.5) a amarillo (pH 6.8), ya que se fermenta la glucosa a 37°C produciéndose ácidos que causan la disminución del pH (25).

Existe una relación directa entre el crecimiento celular y la variación del pH. Este cambio se puede observar en 1 a 2 días de incubación cuando se inoculan  $10^7$  unidades cambiantes de color, mientras que en cantidades menores el cambio ocurre después de 20 a más días (4).

En medio sólido las colonias pueden ser detectadas después de 2 a 3 días de incubación y alcanzan su tamaño máximo después de 10 días. Se desarrollan en forma de pequeñas colonias redondas con un diámetro de 100 a 500  $\mu\text{m}$  desprovistas de la protuberancia central (dan la apariencia de "gotas de rocío"). Las placas se incuban a 37°C con la mayor cantidad de humedad posible y una atmósfera que contenga de un 5 a 10 % de  $\text{CO}_2$  (25, 41).

Para el aislamiento a partir de pulmones porcinos deben de considerarse tres factores. Primero es un microorganismo nutricionalmente exigente y solo puede aislarse en medios especialmente desarrollados para ello; además se requiere que el grado de pureza de los constituyentes del medio este garantizado así como la limpieza química del material empleado; segundo en los pulmones sospechosos de Neumonia Eizootica, casi siempre están presentes otros micoplasmas, especialmente *M. hyorhinis*, ambas especies producen ácido y desafortunadamente este último crece con más rapidez "enmascarando" al *M. hyopneumoniae* y tercero, aunque sean empleadas técnicas óptimas y medios adecuados, es difícil aislarlo de algunos casos (4, 27).

El esquema general para el aislamiento e identificación es el siguiente: a partir del tejido neumónico se hace la siembra en medio líquido, por ejemplo, en el medio de Eris, diluyendo la muestra  $10^7$ . Se incuba a 37°C durante 5 a 7 días en una atmósfera que contenga de un 5 al 10% de  $\text{CO}_2$ ; se observan las cajas para detectar las colonias sospechosas y a partir de éstas la identificación se realiza por pruebas bioquímicas, que incluyen la prueba de la dependencia de

esteroles, fermentación de carbohidratos, reducción del tetrazolio o través de pruebas serológicas, como las pruebas de inhibición metabólica o inhibición del crecimiento (9).

El *M. hyopneumoniae* sólo puede ser aislado del tracto respiratorio. En el pulmón se encuentra asociado estrechamente con el epitelio, por lo general asociado a los cilios, donde puede ser detectado por la tinción de Giemsa, microscopia electrónica, inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa (12,41, 46).

## **2. NEUMONÍA ENZOOTICA.**

### **2.1 DEFINICIÓN**

Es una enfermedad infectocontagiosa del tracto respiratorio de los cerdos de curso crónico y un alto índice de morbilidad, producida por *M. hyopneumoniae*. Caracterizada clínicamente por tos seca no productiva y reducción en el desempeño productivo de los animales afectados (3, 18, 41, 50).

### **2.2 ANTECEDENTES**

La Neumonía Enzoótica fue descrita en la década de los 30 y hasta 1948 se le definió y diferenció convincentemente de la Influenza Porcina. Ha recibido varios nombres tales como Gripe de los lechones y Neumonía viral, pero éstos presumían incorrectamente una etiología viral, por lo que el término de Neumonía Enzoótica es el más adecuado (33).

En 1965 de manera simultánea un grupo de investigadores en Estados Unidos y otro en Inglaterra confirman que el agente etiológico es un micoplasma, al que designaron como *M. hyopneumoniae* y *M. suis* respectivamente. En la actualidad el primer término es el que está en uso. En México, a partir de pulmones obtenidos en el rastro por medio de inmunofluorescencia indirecta, Ciprián y col. detectaron la presencia del microorganismo (9).

### 2.3 SINERGISMO

Si bien el *M. hyopneumoniae* es el agente etiológico primario de la Neumonía Enzoótica, otros agentes infecciosos (bacterias, virus y parásitos) están involucrados ya sea como invasores predisponentes o secundarios (8, 18, 33).

Las investigaciones a nivel de rastro demuestran que a partir de pulmones con lesiones típicas de Neumonía Enzoótica, varias especies microbianas pueden ser aisladas; entre las más frecuentemente están *M. hyopneumoniae*, *P. multocida*, *Haemophilus spp.*, *Bordetella bronchiseptica* (32) y *M. hyorhinis* (15), lo cual pone de manifiesto la naturaleza multietiológica de la enfermedad, en donde el *M. hyopneumoniae* actúa ya sea como agente primario o como enlace entre la infección bacteriana y la viral (15, 32, 33).

A partir de este tipo de estudios, se ha demostrado la interrelación sinérgica entre *M. hyopneumoniae* y *P. multocida*. En los pulmones en donde fueron aislados ambos agentes, se presentaron las lesiones más extensas y severas (15, 32, 33).

Ciprián y col. (1986) encontraron el mismo efecto a partir de cerdos inoculados experimentalmente y además demostraron que en presencia de ambos agentes, los signos clínicos son más severos (8, 15, 27).

De la discusión anterior se concluye que *P. multocida* probablemente no tiene la capacidad por sí misma de colonizar pulmones sanos, pero como invasor secundario hace las lesiones más extensas y severas, agravándose el cuadro clínico (8, 15, 32).

Por otra parte se ha estudiado el efecto de *M. hyopneumoniae* sobre el desarrollo de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* y se ha encontrado que la infección previa del micoplasma actúa como factor predisponente que exacerba a esta última enfermedad (52).

En base a lo anterior se puede concluir que la presencia de *M. hyopneumoniae* afecta la resistencia del huésped y hace al pulmón susceptible a la invasión bacteriana (8, 32, 37).

## 2.4 EPIZOOTIOLOGIA

La Neumonía Enzoótica está ampliamente difundida en el mundo y es causa de importantes pérdidas económicas en la producción porcina intensiva. Se puede presentar en cualquier época del año, pero su severidad puede variar de acuerdo a los procedimientos de manejo, condiciones ambientales y sanitarias (14, 15, 21, 22).

La transmisión a cerdos susceptibles se produce por contacto directo con animales infectados a través de la inhalación de aerosoles contaminados con el microorganismo a corta distancia (22, 37).

No se ha reportado la existencia de alguna otra vía de infección directa, teniendo en cuenta que la resistencia del microorganismo en el medio ambiente es muy escasa y no sobrevive en este más de 24 horas. Sin embargo, se ha probado la diseminación aérea a distancias tan lejanas como de 1.6 a 3.5 kilómetros en climas fríos y húmedos (23).

El origen de la contaminación son las hembras jóvenes que tienen un bajo nivel de inmunidad, las cuales tienden a infectarse y eliminar micoplasmas (transmisión vertical), o bien al momento del destete, que es la principal forma de transmisión (transmisión horizontal), entre lechones paridos por cerdas jóvenes y lechones procedentes de cerdas viejas (la inmunidad lactogénica desaparece entre las 4 y 6 semanas, tiempo que depende del número de cerdas jóvenes). Esta última forma de transmisión se intensifica debido al gran estrés que acompañan al destete (25, 37, 33).

La incidencia real de la enfermedad no se conoce con exactitud, ya que el aislamiento del *M. hyopneumoniae* no se hace en el diagnóstico de rutina, sin embargo en algunos países puede haber una variación de un 10 al 80% o incluso superior (9, 25).

En México los trabajos realizados por Pijoan, Ochoa y Trigo demuestran un incidencia superior al 25%. Ciprián y cols. reportan una incidencia del 23% cuando emplearon la prueba de inmunofluorescencia indirecta y del 80% a partir del análisis de lesiones macroscópicas en pulmones colectados en el rastro (33). Maqueda (1977) evaluó lesiones neumónicas en diversos rastros del país y reportó un 51% de casos positivos (9).



## 2.5 IMPORTANCIA ECONÓMICA

La neumonía en el cerdo representa uno de los más graves problemas infecciosos de esta especie animal. El tipo y la severidad de la neumonía es el resultado de la interacción dinámica entre los agentes infecciosos y el huésped, que son fuertemente influenciados por las condiciones ambientales, prácticas de manejo y factores nutricionales (37), lo que favorece la invasión del tracto respiratorio por bacterias, micoplasmas y virus (27). De esta manera se pone de manifiesto la complejidad del estudio de las enfermedades respiratorias en general; en donde los agentes infecciosos son potencialmente capaces de producir lesiones pulmonares y algunos factores predisponentes interviene para que se manifieste su poder patógeno. Por otra parte la gran escala de la producción porcina se ha convertido en un factor que agrava y difunde la infección pulmonar (27).

El costo económico de esta enfermedad es enorme, debido al carácter crónico que usualmente presenta, lo que ocasiona severas pérdidas por deficientes ganancias de peso y retraso en el crecimiento; además, debe considerarse el enorme gasto por concepto de medicamentos, retraso en la comercialización (hasta de un mes), programas de prevención y control (33, 37, 41, 48).

La importancia de *M. hyopneumoniae* no es sólo su efecto como patógeno primario, si no también por su capacidad de actuar sinérgicamente con otros microorganismos para causar una enfermedad respiratoria grave (3).

Se ha determinado que entre el 30 y 60% de los cerdos de abasto presentan algún tipo de lesión neumónica, y que por cada 10% de tejido pulmonar afectado, la ganancia diaria de peso se reduce en 34.7 gr. En el caso de los animales que presentan lesiones sugestivas de Neumonía Enzootica se reporta el descenso del 17.4% en la ganancia diaria de peso y del 14% en la eficiencia alimenticia (38, 48).

Poiton (1985), encontró una reducción en el crecimiento diario del 12.7% en cerdos infectados entre los 8 y 80 kg. de peso, con un aumento en el índice de conversión del 13.8% (39).

## 2.6 PATOGENIA

Se ha determinado que los micoplasmas pueden provocar lesiones pulmonares como consecuencia de su acción directa sobre las células y la respuesta inmunológica producida por el huésped (6, 25). La modificación de las propiedades de la membrana de la célula blanco debido a la unión con receptores específicos y la liberación de metabolitos (peróxido de hidrógeno), pueden causar diversas alteraciones, como la inhibición de la actividad ciliar y la hiperplasia del epitelio; dando como resultado la exposición de antígenos que ya no son reconocidos como propios por el organismo. Este proceso de autoinmunización da origen a una reacción linfocitaria extensa, formación de complejos inmunes e inflamación (25).

La colonización de la mucosa respiratoria por el *M. hyopneumoniae* se produce tempranamente y la adhesión a receptores, probablemente específicos, de las células ciliadas es el evento inicial en el desarrollo de la neumonía (55).

Luego de la infección el *M. hyopneumoniae* se aloja en las vías respiratorias a nivel de los epitelios traqueal, bronquial y bronquiolar, localizándose entre los cilios y el citoplasma apical de las células. La presencia de este produce el aglutinamiento y la pérdida de cilios reflejando la intensa colonización que se produce. No se produce la penetración del microorganismo a los tejidos (6, 55).

La ciliostasis y la hipersecreción de moco contribuyen al acumulo de exudado mucopurulento en las vías aéreas bajas (11, 22, 23).

El *M. hyopneumoniae* produce peróxido de hidrógeno que produce irritación local. La activación del complemento, la degranulación de neutrófilos y la liberación de otros mediadores químicos de la inflamación por el huésped durante la reacción inmunológica, probablemente contribuyen a la irritación local de la mucosa (6, 11, 18).

Como respuesta a la infección se han determinado que se producen cambios en las propiedades fisicoquímicas del moco secretado por las células epiteliales, estos cambios al parecer incrementan la susceptibilidad y la infección bacteriana secundaria (11).

## 2.7 SIGNOS CLÍNICOS

El periodo de incubación para la infección natural es de 10 a 16 días. Se han descrito dos formas de presentación de la enfermedad

### A) Aguda.

Esta forma de presentación es poco frecuente y se asocia con la reintroducción en granjas libres o cuando aparece por primera vez. En estos casos son susceptibles los cerdos de cualquier edad y las cifras de morbilidad pueden llegar al 100%. Se pueden producir algunas muertes en animales adultos y hasta el 50% de los lechones mueren. Es característica la aparición de signos respiratorios agudos, tos, fiebre y anorexia. Esta forma evoluciona luego de un periodo de tiempo variable hacia la forma crónica (18, 25, 50)

### B) Crónica.

La forma crónica es la más común y es el patrón que se observa en la situación enzoótica de la enfermedad. Se caracteriza por su elevado índice de morbilidad y baja mortalidad (3, 18). Por lo general se observan pocos signos clínicos, los más afectados son los cerdos de entre 3 y 6 semanas de edad, aunque en los lechones lactantes se pueden presentar estornudos y secreciones nasales. Lo más frecuente es que la enfermedad tenga sus principales manifestaciones clínicas después del destete y en el periodo de crecimiento (3, 18, 41, 50).

El principal signo que se presenta es la tos. Al inicio es posible que sólo unos cuantos animales tosan, pero después la frecuencia aumenta hasta que la mayoría tosen. La tos se puede presentar en cualquier momento pero es más notable después del ejercicio y a la hora del alimento. El signo clínico más importante es la gradual desuniformación de los animales del mismo peso al destete como consecuencia de los diferentes grados de la infección (25, 50).

Los invasores secundarios, especialmente *P. multocida* complican el cuadro clínico, produciéndose una neumonía severa (8). Las manifestaciones clínicas se hacen menos evidentes al aumentar la edad de los animales y pocas veces se presentan en las cerdas adultas, sin embargo el microorganismo persiste en las hembras jóvenes (25).

## **2.8 LESIONES**

### **2.8.1 MACROSCOPICAS**

Las lesiones macroscópicas comprenden áreas de consolidación púrpura en las porciones craneoventrales del pulmón, principalmente a nivel de lóbulos cardíacos y apicales, claramente delimitadas de tejido sano (3, 23).

La primera lesión observada es la tumefacción grisácea de uno o más lobulillos, los cuales se observan ligeramente elevados sobre el contorno de lobulillos normales; al corte tienen aspecto húmedo, liso y homogéneo; que a la presión del bronquiolo central resuma un exudado mucoso limpio y espeso, pero si éste es opaco o amarillo indica la presencia de bronquiolitis o bronconeumonía secundaria (23, 27).

En un estadio posterior la tumefacción grisácea es sustituida por atelectasia, observándose el tejido rojo, deprimido y de consistencia firme. Dado que el proceso no se produce simultáneamente en todos los lobulillos, el aspecto general del pulmón es una mezcla irregular de lobulillos consolidados junto con otros atelectásicos. Puede observarse edema abundante que incluso puede llegar a nivel de la tráquea. Los ganglios linfáticos presentan inflamación, hiperemia y edema (23).

### **2.8.2 MICROSCOPICAS**

Al examen microscópico se aprecia una neumonía broncointersticial asociada a infiltración de linfocitos en las etapas crónicas (23).

El epitelio bronquial muestra una clara hiperplasia, debido al aumento de las células epiteliales nucleadas entre la membrana basal y la superficie bronquial (neumonía proliferativa); con pérdida y agrupamiento ciliar. Esto aunado a la dilatación de las glándulas de la submucosa producen un abundante exudado mucoso (11).

Los septos alveolares se encuentran engrosados debido a la infiltración abundante de linfocitos y células plasmáticas. A nivel alveolar se encuentran macrófagos, algunos neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas (11, 21, 23, 27, 32).

## 2.9 DIAGNOSTICO

El diagnóstico presuntivo se realiza en base a las condiciones epizootiológicas, signos clínicos, lesiones macroscópicas e histopatología (18, 50)

El diagnóstico definitivo se obtiene por el aislamiento, identificación a partir de tejido pulmonar o por la detección de anticuerpos específicos. Sin embargo esta última fase del diagnóstico plantea algunos problemas (3, 25, 50)

El aislamiento de *M. hyopneumoniae* es difícil y puede requerir de tiempo que a menudo es incompatible con el diagnóstico de rutina. Por su parte las pruebas serológicas en muchos casos no están disponibles y algunas de ellas presentan problemas de reacción cruzada con otros micoplasmas presentes en los cerdos (*M. hyorhinis* y *M. flocculare*) (1, 25)

### 2.9.1 DIAGNOSTICO SEROLOGICO

El control de esta enfermedad, es extremadamente difícil debido en gran parte, a la falta de pruebas confiables para el diagnóstico. Se han empleado varias pruebas serológicas, como la fijación de complemento, la hemoaglutinación indirecta y la prueba de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima); sin embargo, no están disponibles en el país, ya sea porque que no se han desarrollado o por su alto costo (1, 24, 35, 44, 45)

La prueba de hemoaglutinación indirecta es adecuada para la detección de anticuerpos en cerdos infectados experimentalmente con grandes dosis de *M. hyopneumoniae*, pero puede no ser lo suficientemente sensitiva para detectar anticuerpos en cerdos infectados naturalmente. La sensibilidad de la prueba de fijación de complemento es satisfactoria durante fases tempranas, pero algunos cerdos pueden darse como negativos durante fases tardías de la enfermedad por lo que pueden darse diagnósticos falsos negativos (1).

La prueba de ELISA es más sensible que las dos anteriores, ya que detecta títulos de 10 a 32 veces más elevados que los más altos títulos detectados por las otras dos pruebas. La diferencia más importante entre estas tres pruebas es que ELISA puede detectar anticuerpos en fases tardías de la

enfermedad; sin embargo tiene el inconveniente de dar reacción cruzada con *M. hyorhinis* y con *M. flocculare* (1, 36, 45)

### 3. ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA).

El ensayo inmunoenzimático ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) es una de las técnicas de mayor aplicación en el área de patología animal. Muchas enfermedades están siendo diagnosticadas mediante esta técnica, obteniéndose en todos los casos resultados muy favorables. Desde 1976 hasta la fecha se han escrito más de 800 artículos sobre aplicaciones de este método en la patología animal (40)

Las pruebas inmunoenzimáticas se caracterizan por ser altamente sensibles y específicas. Por otra parte son fácilmente automatizables lo que permite que se procesen un alto número de muestras en un tiempo relativamente corto. En la mayoría de sus aplicaciones son comparables y normalmente superiores en estos aspectos a numerosas técnicas de diagnóstico y a muchas de las técnicas serológicas convencionales más sensibles (inmunofluorescencia, inmunoelectroforesis y radioinmunoensayo). Otra ventaja es que a través de ellas se pueden detectar todas las clases de inmunoglobulinas (7, 24, 29, 30)

#### 3.1 ANTECEDENTES

Lo que hoy en día se conoce como técnicas inmunoenzimáticas, empezó a desarrollarse con los trabajos de Avrameas y Uriei (1966), que concibieron la idea de marcar antígenos y anticuerpos con enzimas para ser utilizados en técnicas convencionales como la inmunodifusión doble. Wincker y Avrameas (1969), procedieron al marcado de anticuerpos mediante enzimas con la finalidad de localizar antígenos virales en cortes de tejidos animales. En el mismo año Avrameas, estudió y utilizó el glutaraldehído como agente puente para la fijación de proteínas; método que continúa vigente (7, 40).

Fueron Equvall (1971) y Perlman (1972) quienes, utilizando los métodos anteriores, describieron el denominado método de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) para titular inmunoglobulinas; para ello utilizaron como inmunoabsorbente tubos de poliestireno e indicaron que la sensibilidad del método era comparable a los radioinmunoensayos. Van Weemen (1971) y

Shuurs (1972), utilizaron conjugados antígeno-enzima y hapteno-enzima en ensayos serológicos. Woller y cols. (1974), pusieron a punto la realización del método en microplacas de poliestireno y sugirieron su uso para titular anticuerpos inducidos por enfermedades infecciosas. En el año de 1975 apareció el primer trabajo de ELISA aplicado a la patología animal, concretamente a la detección de anticuerpos contra *Trichinella spiralis* (40)

### 3.2 FUNDAMENTOS Y TIPOS

La utilización de enzimas como marcadores de antígenos o anticuerpos a provocado que surgan numerosos métodos inmunoenzimáticos que tienden a suplir, o incluso a sustituir cada vez más, a los métodos inmunológicos que utilizan otros marcadores como la inmunofluorescencia o los radioisótopos (40, 51)

El principio básico es la reacción de un antígeno o anticuerpo acoplado en forma covalente a una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática, con un antígeno o un anticuerpo inmovilizado (es decir naturalmente asociados a un tejido o fijados artificialmente a soportes). Después la detección de la enzima con la ayuda de un sustrato específico, produciéndose como producto de esa reacción un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o colorímetro (7, 29, 30, 40, 51).

Así se puede distinguir dos grupos de métodos inmunoenzimáticos: los métodos de dosificación cuantitativa y los métodos de visualización del complejo antígeno-anticuerpo, ya sea sobre los tejidos o sobre impresas de proteína en una lamina de nitrocelulosa (30,51)

Los métodos de dosificación inmunoenzimática permiten dosificar con buena sensibilidad componentes de interés biológico, fueron descritos por primera vez para la dosificación de antígenos (51).

Estas técnicas se basan en dos tipos de procedimientos: 1) Se necesita una fase sólida para inmovilizar el antígeno o anticuerpo asociado a una enzima y permitir así la evaluación de la actividad enzimática del complejo antígeno-anticuerpo-enzima, son las dosificaciones en fase heterogénea y 2) Un proceso en el que no se necesita ninguna separación, porque la dosificación del complejo antígeno-anticuerpo-enzima se efectúa directamente en la mezcla de reacción y se

modificada su actividad según la extensión de la reacción antígeno-anticuerpo; son las dosificaciones en fase homogénea (51).

Estas últimas generalmente se utilizan para cuantificar anticuerpos en contra de sustancias de bajo peso molecular como drogas (opio, barbitúricos y anfetaminas) y niveles terapéuticos de algunos fármacos (lidocaina y fenobarbital) (29, 30, 51)

Las dosificaciones en fase heterogénea, se utilizan para medir o detectar sustancias de peso molecular elevado (del orden de 100 000), fueron descritas inicialmente para la dosificación de antígenos y rápidamente se aplicaron para la dosificación de anticuerpos. El análisis de la enzima ligada a un inmunoabsorbente o ELISA corresponde a una dosificación heterogénea, sin embargo, el término también se aplica a todas las dosificaciones que utilizan enzimas marcadoras (29, 30, 51).

Las técnicas de ELISA se pueden clasificar en competitivas y no competitivas, dependiendo de que el antígeno libre y el antígeno ligado a una enzima o fijado a una fase sólida, compita con un número limitado de sitios activos de anticuerpos, o depende si el antígeno o anticuerpo a medir se le permite reaccionar con un exceso de reactante inmune (29, 30, 39)

Los tipos de ELISA también se pueden clasificar en función del reactivo marcado y de la finalidad para la que sea utilizado (40)

#### 1) Inmunoreactivo marcado:

- a) Anticuerpo marcado: ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA DAS, ELISA IDAS.
- b) Anticuerpo marcado: ELISA competitivo, ELISA directo.

2) Detección de antígeno y su cuantificación: ELISA directo, ELISA DAS, ELISA IDAS, ELISA competitivo

3) Detección de anticuerpos y su cuantificación: ELISA indirecto, ELISA IDAS.

En términos generales las distintas modalidades del método se realizan con la adición secuencial de una serie de reactivos en las median etapas de incubación y lavados (39, 40).



**De manera general se describen los métodos directo e indirecto de ELISA.**

#### **ELISA directo**

1) Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos e incubación. 2) Lavado para eliminar aquellos antígenos fijados deficientemente o no fijados. 3) Adición de anticuerpos marcados con una enzima. Si los anticuerpos reaccionan con los antígenos fijados, el complejo quedará inmovilizado. 4) Lavado. 5) Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima. Parar la reacción si se desea y lectura (7, 29, 30).

#### **ELISA indirecto**

1) Fijación de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio. 2) Incubación y lavado. 3) Adición de antisuero: suero problema o sobrenadante de cultivos celulares. Sus inmunoglobulinas reaccionarán específicamente con los antígenos fijados. 4) Lavado. 5) Adición de anti-globulinas conjugadas con una enzima. Estas reaccionarán con los anticuerpos específicos presentes en la etapa previa y que ya están fijados al antígeno. 6) Adición del sustrato específico para la enzima. Parar la reacción si se desea. Lectura (7, 29, 30).

Esta es la variable del método que más se utiliza actualmente para la detección de anticuerpos específicos en el área de patología animal. La principal ventaja de este método es que se utilizan antiglobulinas "universales" (producidas en ratones, conejos y caprinos) conjugadas a enzimas para detectar anticuerpos, y tanto éstos como los antígenos pueden ser estandarizados (7, 40).

La interpretación del ensayo es simple y fácilmente controlado. El uso de un primer anticuerpo y de la antiglobulina da al ensayo mayor sensibilidad en relación al método directo (7).

### **3.3 ANALISIS DE LAS DIFERENTES ETAPAS DE ELISA.**

#### **3.3.1 Unión de inmunoreactivos a la fase sólida.**

Los inmunoreactivos (antígeno y anticuerpo) se pueden clasificar en solubles o particulados. Entre los primeros se encuentran fundamentalmente las proteínas, carbohidratos y los ácidos nucleicos; entre los segundos podemos nombrar a las células bacterianas completas (7, 29, 40).

Las proteínas son los inmunoreactivos más utilizados y el método que se utiliza para fijarlas a las fases sólidas es la adsorción física directa, sin embargo, en algunos casos este sistema es inadecuado. Esto puede suceder cuando la proteína se adsorbe débilmente a cualquiera de las fases sólidas disponibles o cuando el grado de desorción durante las etapas de lavado es demasiado importante que impida obtener resultados satisfactorios. En estos casos se procede a la unión covalente de la proteína (40).

Las fases sólidas más usadas son el poliestireno, el cloruro de polivinilo (PVC), nailón, polipropileno, nitrocelulosa, celulosa, goma de silicona y vidrio (29).

Las microplacas o pocillos sueltos de poliestireno, cloruro de polivinilo (PVC) o polipropileno, son las más recomendables porque son fácilmente manejables especialmente durante los lavados. Normalmente se utilizan placas rígidas de poliestireno de 96 pocillos, con fondo plano y una capacidad de 350  $\mu$ l por pocillo (7, 29, 39).

El tapizado o sensibilización suele realizarse con inmunoreactivos purificados, pero en algunos casos puede hacerse uso de inmunoreactivos semipurificados o sobrenadantes de cultivo celular (29, 30).

Existe el riesgo de que algunas moléculas de inmunoreactivo no específico en solución se adsorban inespecíficamente a la fase sólida, en lugar de hacerlo por medio de una reacción antígeno-anticuerpo. Cuando esto sucede se observa un exceso de actividad enzimática y el resultado se verá falseado. Para evitar al máximo esta fuente de error, se suele agregar al medio de reacción un exceso de una proteína inerte (0.1 a 1 %) para que compita por los sitios de unión inespecíficos en la fase sólida. Para este propósito se utiliza seroalbúmina bovina, suero entero y gelatinas entre otras (7, 40).

Estas mismas también se utilizan como agentes bloqueadores de los sitios activos de la superficie que no fueron ocupados por el inmunoreactivo en fase sólida; también es necesario agregarlas al medio de reacción para que bloqueen los sitios que puedan quedar libres por el arrastre durante el desarrollo de la prueba. También es necesario añadir al medio de reacción un detergente no iónico (usualmente Tween 20 al 0.05%), que también evita las uniones inespecíficas porque, aunque no se

fija, impide que macromoléculas se fijen a la fase sólida. Por esta razón se le utiliza en el proceso de lavado después de cada reacción para eliminar el exceso de inmunoreactivos (7, 39, 40).

La fijación de inmunoglobulinas suele realizarse mediante incubación en una solución amortiguadora de carbonatos a pH 9.6 durante unas horas a 35 o 37 °C o durante 16 a 24 horas a 4° C. En tanto que la adsorción de antígeno es un proceso más delicado que hay que experimentar con cada tipo de antígeno. Básicamente, el antígeno suele diluirse en una solución amortiguadora de carbonato pH 9.6 y se incuba de 2 a 5 horas a 37° C o 16 a 24 horas a 4° C (29).

### **3.3.2 Proceso de lavado**

Este proceso es muy importante, ya que si no se realiza correctamente puede disminuir enormemente la especificidad y la reproductividad de la técnica. Si éste no es suficiente, aparecerán resultados excesivamente altos, debido a la presencia de inmunoreactivos inespecíficos que pueden quedar unidos a la fase sólida; pero si son excesivos, pueden dar lugar a arrastre (debido a la reversibilidad de las reacciones) tanto del reactivo unido a la fase sólida como del complejo antígeno-anticuerpo. Por esta razón es recomendable utilizar métodos bien estandarizados y repetirlos siempre igual para que las pérdidas por arrastre sean similares en todas las muestras (29, 40).

El equipo utilizado para lavar microplacas de materiales plásticos puede variar desde un frasco lavador o un depósito elevado provisto de una salida múltiple, hasta equipos automatizados. También puede efectuarse con aspiración previa de los reactivos mediante vacío, o por simple arrastre de los reactivos sobrantes directamente al realizar el lavado (40).

### **3.3.3 Enzima y conjugado.**

La sensibilidad depende del efecto de amplificación dado por la enzima, o sea la formación de moléculas del sustrato por el complejo antígeno-anticuerpo-enzima (40).

La enzima debe de unirse fácilmente con el antígeno o anticuerpo y no debe tener actividad similar a éstos en la fase sólida. Debe tener un sustrato cromogénico o fluorogénico conveniente y de fácil preparación (51).

Las enzimas más utilizadas son: la peroxidasa (extraída del rábano picante), fosfatasa alcalina (extraída de intestinos de terneras o de *E. coli*), la glucosa oxidasa (extraída del *Aspergillus niger*) y la  $\beta$ -galactosidasa (extraída de *E. coli*) (29, 51).

Para cada una de estas enzimas se han estudiado varios sustratos. El principal requerimiento para éstos, es que ofrezcan un método sensible de detección. Se menciona el uso de sustratos cromógenos, los cuales inicialmente carecen de color y cuando se degradan muestran un color intenso. Debe ser barato, seguro y fácil de usar (7, 51).

En las técnicas inmunoenzimáticas se utilizan anticuerpos purificados provenientes de animales hiperinmunizados, líquido de ascitis o sobrenadantes de cultivos en caso de anticuerpos monoclonales. El conjugado enzimático se prepara por la unión covalente de la enzima con el anticuerpo o antígeno. Las técnicas disponibles para llevar a cabo este proceso de acoplamiento son muy variadas. La más utilizada es la reacción con glutaraldehído, en la que dos moléculas con grupos amino libres pueden unirse a través de su reacción con los dos grupos carbonilo de éste (51).

Para este fin también se puede utilizar el peryodato de sodio y la p-benzoquinona. El primero de éstos se ha utilizado para acoplar la peroxidasa a anticuerpos, basándose en el hecho de que esta enzima tiene pocos grupos aminados, pero es una glucoproteína con el 18% de azúcares, que el peryodato puede oxidar a grupos aldehído activos, éstos pueden reaccionar con los grupos aminados de un anticuerpo añadido secundariamente (7, 40, 50).

## II. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL:

Ensayar una prueba serológica de ELISA para el diagnóstico serológico de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

### 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

2.2.1 Ensayar la prueba de ELISA Tween 20 desarrollada en la Coordinación de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM con muestra de campo.

2.2.2 Validar la prueba a través del análisis comparativo de los resultados obtenidos por ésta con sueros previamente diagnosticados con una prueba comercial de ELISA.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en los laboratorios de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y fue parcialmente financiado por el proyecto PADEP 100302.

#### 3.1 MATERIAL.

1. KIT ELISA mate KPL.\* (Kiekgaar and Perry 1994 No. Cat. 546200) que contiene las siguientes soluciones:

- a) Solución amortiguadora de recubrimiento concentrada.
- b) Solución BSA diluyente bloqueadora concentrada
- c) Solución de lavado concentrada
- d) Sustrato de peroxidasa ABTS:
  - 1) Sustrato de peroxidasa
  - 2) Sustrato de peroxidasa solución B
- e) Solución inhibidora de peroxidasa concentrada

2. Conjugado anti-IgG porcina peroxidasa\* (Sigma, Immunochemicals No. cat. A-9417).

3. Antígeno Tween 20 de *M. hyopneumoniae* elaborado en la FES-C, por Cruz Sánchez y col. a partir de una cepa aislada de pulmón porcino, en base al método de Nicolet (1980) modificado por los autores.

4. Microplacas de poliestireno de 96 pozos de 350 µl (Nucleon\*).

5. Espectrofotómetro (Bekman DV-64)

6. Material suplementario

7. Sueros.

a) Sueros problemas: 256 sueros provenientes de granjas porcinas ubicadas en la Piedad Michoacán; remitidos al laboratorio especializado No. 6 para diagnóstico de Neumonía Enzoótica (donados por el Q.F.B. Abraham Massa); de los cuales 81 fueron sometidos a diagnóstico serológico de Neumonía Enzoótica por una prueba comercial de ELISA ( 28 positivos y 53 negativos ).

b) Sueros control: como control positivo se utilizó suero hiperinmune de *M. hyopneumoniae* que fue obtenido de un cerdo SPF inoculado de acuerdo a un esquema modificado por Young y Ross

(1987), producido por Cruz y col. Como control negativo se utilizó suero de cerdo SPF (donado por la Dra. Mendoza E.).

\* MARCA REGISTRADA

### 3.2 MÉTODO

En el presente trabajo se empleó el método indirecto del ensayo inmunoenzimático de ELISA según Cruz, S.T., Aguilera, C.F., Hernández G.F. y col. (1995) denominado por éstos Prueba ELISA Tween 20, desarrollada en la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la FES-C, en la que se utilizó para su desarrollo los reactivos y el método indirecto de ELISA para la detección de anticuerpos sugeridos por el Kit comercial Microwell ELISAmate for Peroxidase Conjugate KPI y el antígeno de *M. hyopneumoniae* Tween 20 (1994), desarrollado por los mismos autores, mismos que fueron utilizados para el desarrollo de este trabajo. Las condiciones del ensayo se determinaron previamente y son las siguientes:

Antígeno de recubrimiento: (Antígeno Tween 20) 100 µl con 20 ng de proteína a cada pozo.  
Tiempo de incubación: 18 a 24 horas a -4°C.

·Muestra: dilución 1:100. Tiempo de incubación 1 hora a temperatura ambiente

Dilución del conjugado anti-IgG porcina 1:2000. Tiempo de incubación 1 hora a temperatura ambiente

·Lectura de absorbancia: a 405 nm.

·Interpretación de Resultados: En este trabajo se consideró una muestra como positiva, las absorbancias mayores de 0.803, y como negativas las absorbancias menores de 0.625.

El total de las muestras se dividió en dos grupos. En el grupo A se incluyeron 81 sueros cuyo resultado a prueba comercial de ELISA se conoce, siendo 53 negativos (subgrupo 1) y 28 positivos (subgrupo 2). La comparación de los resultados obtenidos por ambas pruebas, se realizó a través de la prueba estadística  $\chi^2$ ; se obtuvo el porcentaje de resultados iguales en ambas pruebas y se determinó la sensibilidad y especificidad de la prueba ELISA Tween 20 en relación a la prueba comercial a través del siguiente esquema:

### Determinación de la sensibilidad y especificidad comparativa.

	PRUEBA COMERCIAL	
ELISA Tween 20	POSITIVO	NEGATIVO
POSITIVO	A	C
NEGATIVO	B	D

Donde  $A + B + C + D =$  número de diagnósticos efectuados con ambas técnicas.

$$\text{Sensibilidad comparada} = A / A + B \times 100$$

$$\text{Especificidad comparada} = D / C + D \times 100$$

$$S = A / A + B \times 100$$

$$E = D / C + D \times 100$$

El grupo B lo constituyen los 175 sueros restantes, de los cuales se obtuvo el porcentaje de positivos,

negativos y sospechosos, la media y la desviación estándar de las absorbancias registradas.

### Preparación de reactivos

1. Se preparan el mismo día que se van a utilizar.
2. Los volúmenes mencionados están calculados para una placa de 96 pozos.
3. Solución amortiguadora de recubrimiento: mezclar 1 ml de la solución concentrada y 9 ml de agua desionizada.
4. Solución BSA diluyente bloqueadora: mezclar 5 ml de la solución concentrada y 45 ml de agua desionizada.
5. Solución de lavado: mezclar 15 ml de la solución concentrada y 285 ml de agua desionizada.
6. Sustrato de peroxidasa ABTS: mezclar 5 ml de la solución de ABTS concentrada y 5 ml de la solución de peroxidasa B.
7. Dilución de los sueros de trabajo: los sueros se diluyen en la solución amortiguadora de recubrimiento.

### Procedimiento de lavado.

Los lavados se realizan después de adiconar el suero (anticuerpo primario) y el conjugado (anticuerpo secundario).



1. Se llena cada pozo con la solución de lavado
2. Vaciar la placa por inversión rápida de la misma.
3. Retirar los residuos sobre una toalla de papel o tela absorbente mediante sacudidas rápidas.
4. Repetir el proceso de 3 a 5 veces

#### **Ensayo ELISA indirecto para la detección de anticuerpos.**

##### **Sensibilizado o tapizado.**

1. Poner 100  $\mu$ l de la solución de recubrimiento a cada pozo
2. Incubar 18 a 24 horas a 4°C.
3. Vaciar la placa para eliminar residuos por inversión rápida de la misma.
4. Agregar 300  $\mu$ l de la solución BSA diluyente bloqueadora a cada pozo.
5. Dejar reaccionar 30 minutos.

##### **Aplicación de muestras ( Anticuerpo primario)**

1. Se agregan 100  $\mu$ l del suero diluido en la solución amortiguadora de recubrimiento (1:100).
2. Se deja reaccionar 1 hora a temperatura ambiente
3. Vaciar la placa para desechar el líquido excedente
4. Lavado (ver antes)

##### **Aplicación del conjugado (anticuerpo secundario).**

El conjugado se diluye en la solución BSA diluyente bloqueadora (1:2000).

1. Se agregan 100  $\mu$ l a cada pozo.
2. Se deja reaccionar 1 hora a temperatura ambiente.
3. Lavado (ver antes).

##### **Aplicación del sustrato.**

1. Poner 100  $\mu$ l de la solución de sustrato a cada pozo
2. Se deja reaccionar durante 15 minutos.
3. Se agregan 300  $\mu$ l de la solución inhibidora de peroxidasa a cada pozo.
4. Registrar la absorbancia a 405 nm en el espectrofotómetro

#### IV. RESULTADOS

En el grupo A se obtuvieron los siguientes resultados: 44 sueros negativos, 30 positivos y 7 sospechosos considerando la totalidad de los sueros analizados. En la tabla 4.1 se registran las absorbancias obtenidas y el resultado comparativo de ambas pruebas. El porcentaje de coincidencia para el total de sueros de este grupo es de 72.83% (59/81) Tabla 4.2. El resultado a la prueba  $\chi^2$  se muestra en la tabla 4.3 donde se puede apreciar que no existe diferencia entre ambas pruebas (los resultados caracterizados como sospechosos se toman como negativos, ya que no se esperaban este tipo de resultados). Se obtuvo una especificidad del 79.59% y una sensibilidad del 80% comparativas y se muestra en la tabla 4.4.

Para el subgrupo 1 se obtuvieron los siguientes resultados: 39 negativos, 10 positivos y 4 sospechosos y para el subgrupo 2 se obtuvieron 5 negativos, 20 positivos y 3 sospechosos. el porcentaje de coincidencia para el subgrupo 1 es de 73.58% (39/53) y para el subgrupo 2 es de 71.42% (20/28), tabla 4.2 (en este caso se excluyeron los resultados sospechosos).

Los resultados del grupo B fueron: 68 negativos (35.85%) con un promedio de absorbancia de 0.294 (SD .177), 92 positivos (52.57%) con un promedio de absorbancia de 1.237 (SD .319), y 15 sospechosos (8.5%) con un promedio de absorbancia de .713 (SD .047). En las tablas 4.5, 4.6, y 4.7 se registran las absorbancias obtenidas para cada tipo de resultado y en la tabla 4.8, se registran los porcentajes y el promedio de absorbancias obtenidas para cada caso.

Tabla 4.1. Grupo A. Registro de los valores de absorbancia obtenidas y el resultado para ambas pruebas.

Suero No	Absorbancia	ELISA T 20	Pbe comercial
1	0.644	S	-
2	1.066	+	-
3	0.434	+	-
4	0.618	-	-
5	0.103	-	-
6	1.080	+	-
7	0.608	-	-
8	2.047	+	-
9	0.623	-	-
10	1.612	+	-
11	0.497	+	-
12	0.303	-	-
13	0.059	-	-
14	0.667	-	-
15	0.114	S	-
16	0.934	+	-
17	0.574	-	-
18	0.731	S	-
19	0.297	-	-
20	1.200	+	-
21	0.266	-	-
22	1.206	+	-
23	0.067	-	-
24	0.152	-	-
25	0.225	-	-
26	0.025	-	-
27	0.135	-	-
28	0.172	-	-
29	0.542	-	-
30	0.568	-	-
31	0.003	-	-
32	0.002	-	-
33	0.198	-	-
34	0.242	-	-
35	0.258	-	-
36	0.260	-	-
37	0.074	-	-
38	0.590	-	-
39	0.027	-	-
40	0.101	-	-
41	0.531	-	-
42	0.417	-	-
43	0.066	-	-
44	0.879	+	-
45	0.066	-	-
46	0.285	-	-

## CONTINUACION tabla 4.1

47	0.387	-	-
48	0.653	S	-
49	0.281	-	-
50	0.304	-	-
51	0.615	-	-
52	0.270	-	-
53	0.589	-	-
54	1.285	+	+
55	1.368	+	+
56	1.242	+	+
57	1.206	+	+
58	1.193	+	+
59	1.478	+	+
60	1.412	+	+
61	1.343	+	+
62	1.089	+	+
63	0.893	+	+
64	0.783	S	+
65	0.029	-	+
66	0.388	-	+
67	0.252	-	+
68	1.119	-	+
69	0.784	S	+
70	0.412	-	+
71	1.406	+	+
72	0.768	S	+
73	0.984	+	+
74	1.215	+	+
75	1.438	+	+
76	1.380	+	+
77	1.560	+	+
78	1.333	+	+
79	0.316	+	+
80	1.342	+	+
81	0.937	+	+

Tabla 4.2. Grupo A. Resultados obtenidos por la prueba de ELISA Tween 20 para los subgrupos 1 y 2. Porcentaje de coincidencia por subgrupo y en general.

Pba Comercial	ELISA		TWEEN 20		Porcentaje de coincidencia
	Positivo	Negativo	Positivo	Suspechoso	
Negativo (53)	39		10	4	73.58%
Positivo (28)	5		20	3	71.42%
Total (81)	44		30	7	72.83%

Tabla 4.3 Resultado de la prueba  $\chi^2$ .

Clase	Resultado esperado	Resultado observado	Desviación	$O-E^2$	$O-E^2/E$
Positivo	28	30	-2	4	0.148
Negativo	53	51	2	4	0.076
Total	81	81	0		0.224

DECISION: no existe diferencia entre las pruebas G.I. 1

Tabla 4.4 Determinación de la sensibilidad y especificidad comparativa.

		PRUEBA COMERCIAL	
ELISA	TWEEN 20	POSITIVO	NEGATIVO
POSITIVO		A 20	C 10
NEGATIVO		B 5	D 39

Siendo  $A + B + C + D$  = Número de diagnósticos efectuados con ambas técnicas.

Sensibilidad comparada =  $20/20+5 = 80\%$

Especificidad comparada =  $39/10+39 = 79.59\%$

Tabla 4.5 Resultados del grupo B. Registro de Absorbancias caracterizadas como negativas.

0.256	0.297	0.259	0.433
0.574	0.147	0.025	0.226
0.306	0.180	0.011	0.247
0.182	0.127	0.218	0.211
0.021	0.183	0.474	0.521
0.293	0.385	0.200	0.505
0.503	0.244	0.302	0.017
0.454	0.211	0.098	0.501
0.363	0.322	0.228	0.404
0.221	0.435	0.119	0.567
0.354	0.494	0.528	0.608
0.089	0.443	0.528	0.329
0.062	0.247	0.121	0.238
0.321	0.517	0.170	0.226
0.089	0.102	0.022	0.342
0.592	0.420	0.609	0.207
0.568	0.303	0.017	0.545

Tabla 4.6 Registro de Absorbancias caracterizadas como positivas. Grupo B

1.578	1.853	0.823	1.221
0.897	1.499	1.044	1.013
1.388	1.153	1.398	0.844
1.619	1.002	1.604	1.358
1.633	0.842	1.340	1.038
1.658	1.246	0.838	1.267
1.767	1.201	1.734	1.243
1.444	0.947	1.486	1.185
1.242	1.203	1.078	0.831
1.735	1.311	1.486	1.082
1.060	1.812	1.078	1.305
1.322	1.632	1.413	1.147
1.626	1.490	1.611	1.060
1.117	1.538	1.142	1.020
1.351	0.858	1.283	0.943
1.737	1.172	1.009	0.859
1.009	1.398	0.940	1.163
0.989	1.116	0.871	1.737
1.157	1.115	1.102	1.860
1.726	1.487	0.803	0.993
1.731	1.227	0.917	0.882
1.255	1.661	0.817	1.316
0.827	0.840	1.136	0.983

Tabla 4.7 Registro de absorvancias caracterizadas como sospechosas. Grupo B.

0.682	0.637	0.776
0.637	0.700	0.777
0.719	0.703	0.658
0.770	0.708	0.786
0.734	0.681	0.737

TABLA 4.8 Porcentaje de los resultados obtenidos para el grupo B y promedio de las absorvancias.

	POSITIVOS	NEGATIVOS	SOSPECHOSOS
NUMERO	92	68	15
PORCENTAJE	52.57	38.85	8.5
MEDIA- ABSORVANCIA.	1.237	0.294	0.713
DESVIACION ESTANDAR.	0.319	0.177	0.047

## V. DISCUSION

Se sabe que existen factores predisponentes que juegan un importante papel en el desarrollo de la Neumonía Enzoótica. Pero la difusión del *M. hyopneumoniae* no ha sido adecuadamente definida; particularmente en lo que respecta a la edad en la que los cerdos se infectan bajo diferentes esquemas de explotación en nuestro país. Esta falta de información se debe, en parte, a la escasez de pruebas suficientemente sensibles y específicas para detectar la presencia del *M. hyopneumoniae* en cerdos vivos (43).

Se han utilizado diferentes pruebas, como la fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, aglutinación en tubo, aglutinación en latex; sin embargo, los resultados obtenidos por estas pruebas a menudo son difíciles de interpretar y además existen cuestionamientos sobre su sensibilidad y especificidad, limitando su valor como herramientas epidemiológicas (1, 14, 28, 44, 45).

Pese a su enorme impacto económico, la Neumonía Enzoótica es una entidad patológica poco estudiada en nuestro país, donde el diagnóstico en la mayoría de los casos, sólo se realiza a través del análisis de los signos clínicos y las lesiones postmortem, ya que no se disponen de otro tipo de métodos de diagnóstico. Ante tal problemática en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán fue creado el programa "Inmunodiagnóstico de la Neumonía Enzoótica". Como parte de este proyecto se desarrolló la prueba de ELISA Tween 20, la cual se plantea como una alternativa viable para el diagnóstico rutinario de esta enfermedad. El presente trabajo constituye una fase experimental del desarrollo de dicha prueba.

Bruggman (1977) propuso una prueba de ELISA, que ofrece mayor sensibilidad y que puede ser una posibilidad para monitorear el desarrollo de la infección, midiendo la respuesta inmune en animales bajo condiciones comerciales. Sin embargo, la sensibilidad del método depende del uso de antígenos de buena calidad, los cuales no deben revelar dudas u originar reacciones inespecíficas (5).

El análisis comparativo de los resultados obtenidos a través de la prueba estadística de  $\chi^2$ , donde se consideraron la totalidad de las muestras analizadas del grupo A, revela que no existe diferencia entre los resultados de ambas pruebas, en este punto es necesario considerar, que esta valoración parte de casos no confirmados por otros métodos de diagnóstico, de tal manera que se toma como



indicador los resultado dados por la prueba comercial y que este análisis solo permite inferir que por la prueba ELISA Tween 20 pueden obtenerse resultados aproximadamente iguales a los que se obtienen por la prueba comercial, sin embargo es necesario valorarla corroborando los resultados con otros metodos de diagnóstico, para determinar la sensibilidad y especificidad reales de la prueba.

También es necesario señalar que en la prueba de ELISA Tween 20 se obtuvieron resultado caracterizados como sospechoso para el grupo A, mismos que no fueron reportados por la prueba comercial, lo que se atribuye a los diferentes criterios de interpretación empleados en cada una de las pruebas, de tal manera que este tipo de resultados se consideraron como negativos, ya que con un nivel de corte mayor estos caen dentro del rango de negatividad. De esta manera se requiere de precisar mejor este criterio, ya que queda un amplio margen para que se de este tipo de resultados. Una característica importante del metodo ELISA es su nivel de corte preciso, es decir, la propiedad de discriminar entre resultado positivo y negativos de manera precisa (7).

Por otra parte Levenon (1994) probó la especificidad de esta misma prueba comercial y encontró reacción cruzada con *M. hyorhinis*, de tal manera que puede ser relativamente inespecifica (26). Sin embargo, el número de muestras utilizadas para el analisis comparativo puede ser relativamente pequeño y para emitir un juicio mas valedero se requiere del analisis de un mayor número de muestras.

Por otra parte el analisis comparativo del resultado de cada muestra en particular a traves del porcentaje de coincidencia y la determinacion de la especificidad y sensibilidad comparativas muestra que existen diferencias en los resultados obtenidos por ambos metodos. Quizá la diferencias se explique por que en ambos metodos se utilizan diferentes preparaciones antigénicas, diluciones de suero y conjugado así como diferentes criterios de interpretación, factores que podrían conducir a que los resultados no sean concordantes. Estas condiciones son desconocidas en el caso de la prueba comercial, lo cual limita el analisis a la simple comparación de resultados.

Estas diferencias, podrían deberse a la presencia de reacciones inespecificas presentes en el sistema de identificación de anticuerpos especificos, entre las que se incluye la reacción cruzada entre el antígeno Tween 20 y anticuerpos de otros micoplasmas presentes en los cerdos, principalmente *M. hyorhinis* y *M. flocculare* (1).

Por otra parte la confiabilidad es un punto clave para la interpretación de los resultados. No basta sólo con probar que el método diagnóstica correctamente la muestras como positivas o negativas, sino también es necesario, ensayarla en condiciones de campo y averiguar que los resultados obtenidos concuerdan con la realidad. Esta comparación es a veces difícil, ya que las pruebas inmunoenzimáticas son las más sensibles, y los métodos disponibles para el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica plantean algunos problemas: por una parte, requieren de tiempo o no están disponibles. Con el objeto de simplificar el desarrollo de la prueba ELISA Tween 20 se determinó establecer la comparación con los resultados obtenidos por una prueba comercial disponible en el país, que se supone da resultados confiables y sus índices de sensibilidad y especificidad son elevados.

Bruggman y Armstrong (1977) describen una prueba de ELISA, en la que utilizan antígeno solubilizado con SDS, por su parte Nicolet (1980), describe la preparación de un antígeno de *M. hyopneumoniae* que contiene proteínas seleccionadas, después del tratamiento de las células con un detergente neutro, el Tween 20; y lo compara con un preparado antigénico de células completas, determinando que este da los mejores resultados. El Tween 20, tiene la capacidad de solubilizar las proteínas de membrana selectivamente, en especial aquellas que están expuestas sobre la superficie de la célula, mismas que se suponen son las más antigénicas en el transcurso de la infección; en comparación con el SDS que es menos selectivo. El tratamiento de las células con el Tween 20 dió los mejores resultados, pero las reacciones inespecíficas no se eliminaron por completo (34).

Los componentes que producen estas reacciones no han sido estudiados suficientemente; observaciones hechas con preparaciones somecadas sugieren que algunos componentes celulares internos, como los ácidos nucleicos y posiblemente ribosomas, pueden intervenir con las reacciones serológicas (34)

Por su parte Kazama (1989), describe varios métodos para la obtención de antígenos de *M. hyopneumoniae* para ser utilizados en la prueba de ELISA con el fin de detectar anticuerpos específicos contra *M. hyopneumoniae* así como las propiedades de éstos y determina que el antígeno obtenido a partir de células tratadas con Tween 20 y sometido a columna cromatográfica con Sephacril S-300, fue superior en cuanto a su reactividad al antígeno obtenido de manera similar pero sometido a cromatografía en columna con Sephadex G-25 y el antígeno lipídico (24).

El mismo autor a través de la electroforesis SDS-PAGE, se determinó que los dos primeros antígenos contienen 14 y 25 bandas respectivamente. Es decir el antígeno S-300 presenta 11 bandas menos en relación al antígeno producido por Nicolet, lo cual sugiere que éste se purificó mejor. Este último investigador a su vez con la SDS-PAGE, después de someter su preparación antigénica a cromatografía con sephadex G25, encontró 6 bandas menos, en comparación con un antígeno preparado con células solubilizadas con SDS, eliminándose algunas proteínas de peso molecular 30 kd (24).

Young (1987), utiliza la inmunotransferencia para evaluar la respuesta de anticuerpos con células de *M. hyopneumoniae* solubilizadas con SDS, detectando anticuerpos para 5 antígenos como cuyos pesos moleculares se estimaron en 110, 64, 50, 41 y 36 kd. Los antígenos con pesos moleculares de 110, 64 y 41 dieron reacción cruzada con suero hiperimmune de *M. flocculare*, mientras que el de 36 daltons cruza con *M. hyorhinus*, solo el de 74 kd no dio reacción cruzada. También determinó que el uso de células completas da reacción cruzada entre antígenos preparados a partir de *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare*, lo cual indica que ambos comparten algunos antígenos, lo que probablemente da origen a reacciones inespecíficas (53).

Las preparaciones antigénicas, pueden estar contaminadas por constituyentes del suero o del medio de cultivo, la SDS-PAGE, detecta algunas bandas similares a las presentes en el suero y medio de Friis. La unión aparente detectada por inmunotransferencia entre el *M. hyopneumoniae* y algunos componentes del suero aparentemente da origen a reacciones inespecíficas (53).

Freeman (1984) a través de una prueba de ELISA indica reacción cruzada significativa entre *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare*, cuando el suero hiperimmune de ambos fue probado con antígeno de *M. hyopneumoniae*. Finalmente no se sabe si existan otros microorganismos patógenos o no con determinantes antigénicos similares al *M. hyopneumoniae* (17).

Debido a su alta sensibilidad en la técnica de ELISA no es imprescindible utilizar antígenos purificados, ya que incluso con antígenos semipurificados se pueden obtener resultados superiores a los que se obtendrían con otras técnicas serológicas convencionales. No obstante cuanto mayor sea el grado de pureza de los antígenos, mejor serán los índices de especificidad y repetibilidad de

**los resultados, evitándose la obtención de resultados falsos positivos (40). En base a lo anterior un proceso de purificación adicional del Antígeno Tween 20 requiere ser evaluado.**

**En cuanto a la condiciones del ensayo que podrían ser factores que expliquen las diferencias en los resultados obtenidos se mencionan las siguientes. Con frecuencia se comete el error de usar cantidades inapropiadas de antígeno (o anticuerpo) para tapizar las placas, debido a deficiente titulación, pérdida de título o cálculo erróneo de la cantidad necesaria. En estos casos la proteína no cubrirá la totalidad de la superficie del poelito y en los huecos se podrán producir fijaciones inespecíficas (40).**

**Por otra parte los parámetros físicoquímicos fundamentales que han de tenerse en cuenta en la adsorción de la proteína en la fase sólida, son la estabilidad resultante de la unión y la concentración óptima de la proteína a adsorber. La estabilidad depende de la energía de la unión entre los sitios activos de la superficie del material y las regiones de las moléculas de proteína responsables de la interacción con ellos (7).**

**Su importancia reside en que la pérdida de proteína durante las diferentes etapas del ensayo y la influencia que sobre ella ejerzan las condiciones experimentales, pueden afectar profundamente la sensibilidad, la precisión y la exactitud de la técnica. La concentración óptima de la proteína surge de la necesidad de usar la concentración óptima para lograr la máxima sensibilidad y el riesgo de que una concentración excesiva produzca interacciones protina-protina, en lugar de la interacción proteína-superficie que por ser más débiles pueden romperse a lo largo del ensayo (40).**

**También es necesario considerar, como se indica anteriormente, que existe el riesgo de que algunas moléculas de inmunorreactivo no específico en solución se adsorban a la fase sólida, en lugar de hacerlo por medio de una reacción antígeno-anticuerpo. Cuando esto sucede el resultado se verá falseado y se observara un fuerte exceso de actividad enzimática en la fase sólida respecto a lo que corresponde a la concentración real del inmunorreactivo específico de la muestra. En relación a las muestras de suero, es recomendable que este se obtenga lo más rapido posible y conservarlo en congelación de inmediato hasta su uso. Cuando el suero se descongela, la IgG es muy estable a 4° C y se puede mantener por periodos muy largos, siempre y cuando no se contamine. No es recomendable la práctica de congelarlo y descongelarlo repetidas veces, por que los anticuerpos pueden desnaturalizarse y provocar baja en los títulos (30). Situación que se presentó con las**

muestra utilizadas para realizar este trabajo, las cuales fueron remitidas por vía de una empresa comercial de mensajería en condiciones no óptimas.

Otra posible causa de problemas del métodos es atribuible al conjugado, ya sea por deficiente titulación, pérdida de actividad enzimática o inmunológica. El uso del conjugado en dosis superiores a la óptima, puede implicar la aparición de resultados falsos positivos, y en dosis bajas puede producir resultados falsos negativos (7).

Finalmente una fuente de error posible se refiere al proceso de lavado, principalmente después de incubar el conjugado. Si este es deficiente da origen a reacciones inespecíficas.

En cuanto a los resultados el grupo B, que consiste de 175 muestras de suero, indican que el *M. hyopneumoniae* está ampliamente difundido ya que el 52.57% fueron diagnosticados como positivos, según el criterio de interpretación utilizado. Por otra parte las absorbancias registradas pueden servir de base para futuras valoraciones de la prueba ELISA Tween 20, ya que son muestras de campo.

El objetivo primario de una prueba serológica es, en primer lugar, obtener el diagnóstico específico de un microorganismo dado y detectar por lo menos un positivo entre un grupo de individuos (31). En base a esto la prueba ELISA Tween 20, tomando en consideración el análisis comparativo de los resultados del grupo A, así como los resultados de sueros provenientes de una zona de alta producción porcina y en la que se reporta que la Neumonía Enzootica está presente, grupo B, indican que el método cumple con este objetivo.

## VI. CONCLUSIONES

Si bien el uso de la prueba ELISA Tween 20 pueden ciertamente contribuir a la investigación serológica de la Neumonía Enzootica y a través de ésta obtener una mejor comprensión de el desarrollo de esta enfermedad, requiere de una valoración más completa antes de ofrecerla como prueba de diagnóstico, sin embargo, tiene la ventaja de ser desarrollada en el país, lo que la hace más prometedora.

En base a los resultado obtenidos y el análisis de los mismos se concluye lo siguiente:

- 1.- La prueba de  $\chi^2$  indica que no existe diferencia entre los resultados entre ambas pruebas. lo que plantea la posibilidad de que ambos métodos sean igualmente confiables en condiciones de campo.
- 2.- Se obtuvo una sensibilidad y especificidad comparativas del 80% y del 79.59% respectivamente. La diferencia entre los resultados se atribuye a reacciones inespecíficas, en las que se incluyen posibles reacciones cruzadas de la prueba ELISA Tween 20.
- 3.- Los resultados totales para ambas pruebas coinciden en un 72.83 %. Lo que establece diferencias entre ambos métodos; sin embargo, la comparación sólo se limita al diagnóstico serológico, de tal manera que los resultados no son concluyentes. Se requiere por lo tanto una valoración en la que el diagnóstico serológico sea corroborado con otros métodos de diagnóstico para el *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- 4.- El antígeno Tween 20 requieren de una valoración mas completa; en la que se incluya un proceso de purificación adicional. Las condiciones del ensayo requieren de más ensayos para confirmarlas o en su caso, ajustarlas.
- 5.- El criterio de interpretación para la prueba ELISA Tween 20 requiere de una revaloración porque deja un amplio margen para que se presenten resultados sospechosos, situación que no es compatible con las características de el método ELISA.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**6.- A través del diagnóstico por la prueba ELISA Tween 20 se demuestra que la Neumonía Enzoótica es una enfermedad de amplia distribución en nuestro medio, ya que se diagnosticaron como positivas el 52.57% muestras de campo.**

## VII BIBLIOGRAFIA

1. Arsmotrong, C. H., Freeman, M. J. (1983). Comparison of the ELISA and the indirect hemagglutination and complement fixation test for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Can. J. Comp. Med. 47:464-470
2. Biberstein, E. L., Yuan S. C. (1990). Review of Veterinary Microbiology. Blackwell Scientific Publication. Pág. 213-220
3. Blood, D.C. (1987). Medicina Veterinaria 6a ed Interamericana. México. Pág: 765-770.
4. Boatman, S. E. (1979). The Mycoplasmas. Vol. I. Eds. Tully and Whitcomb. Academic Press Inc. USA. Pág. 63-101.
5. Bruggman, H. K., Bertschinger, B. E. (1977). Quantitative detection of antibodies to *M. suis* pneumoniae in pigs' sera by an enzyme-linked immunosorbent assay. Vet. Record. 109:111.
6. Cassell, G. H., Clyde, Jr., Davis, J. K. (1985). The Mycoplasmas. Vol. IV. Academic Press. Inc. USA. Pág: 4 y 65-105.
7. Catty, D., Raykundalia, C. (1990). Antibodies. Vol. 2. (Antibodies a practical approach). Oirl-Press. Oxford USA. Pág. 97-153.
8. Ciprián, A., Pijoan, C., Cruz, S., Camacho, J., Tortora, J., Colmenares, G., Lopez Revilla, R., Garza, M. (1988). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *P. multocida* pneumonia. C. J. Vet. Res. 52:434-438.
9. Cruz, S. T. (1994). Memorias del Primer Cielo Nacional de Afecciones respiratorias del cerdo. Editores Abel Ciprián Carrasco, Susana Mendoza y Claudia García. Mérida Yucatán. Méx. Pág. 38-45.
10. Cruz, S. T. Neumonía Enzootica en México (1994). Nuestro Acontecer Porcino. 8:22-32
11. DeBey, M. C., Jacobson, D. C., Ross, R. F. (1992). Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *M. hyopneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 53 (9):1705-1710.
12. Doster, R. A., Changlin, B. (1988). Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. Am. J. Vet. Res. 49(10):1719-1721.
13. Etheridge, J. R., Lloyd, L. C. (1980). A complement-fixation test of enzootic pneumoniae of pigs using a complement dilution method. Aust. Vet. J. 56:101-105



14. Falk, K., Høie, Lium, B. M. (1991). An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. II. Enzootic pneumonia of pigs: Microbiological findings and their relationship to pathomorphology. *Act. Vet. Scand.* 32: 67-77.
15. Falk, K., Lium, B. M. (1991). An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. III. Serological findings and their relationship to pathomorphological and microbiological findings. *Act. Vet. Scand.* 32:79-88.
16. Freeman, M. J., Armstrong, L. L., Sands-Freeman and Lopez-Osuna. (1984). Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae*, indicated by the EI ISA, CF and IHA test. *Can. J. Comp. Med.* 48:202-207.
17. Freund, E. A., Edward, G. G. (1979). The Mycoplasmas Vol I. Academic Press Inc. USA. Pág: 1-49.
18. García, R. O. (1988). Enfermedades de los cerdos. Ed. Trillas. México. Pág:100-104.
19. Gyles, C. L., Thoen, O. Ch. (1993). Pathogenesis of bacterial infection in animals. 2a. Ed. Iowa State University Press/Ames. USA. Pág:297-310
20. Hovind-Hougen, K., Friis, F. N. (1991). Morphological and ultrastructural studies of *Mycoplasma flocculare* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro. *Res. Vet. Sci.* 51:155-163.
21. Intraraksa, Y., Engen, L. R., Switzer, P. W. (1984). Pulmonary and hematology change in swine with *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 45(3) 474-477.
22. Jericho, K. W. F. (1986). Pathogenesis of *Mycoplasma hyopneumoniae* of swine. *Can. J. Vet. Res.* 50:136-137.
23. Jubb, K., Kenedy, C. P. (1990). Pathology of Domestic Animals. Vol. Y. Third Edition. Academic Press Inc. USA. Pag. 511-531.
24. Kazama, S., Yagihashi, T., Seto, K. (1989). Preparation of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen for the enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Vet. Res.* 53:176-181.
25. Kobisch, M. 1987. Les Mycoplasmas respiratoires du porc: Recueil de Medicine Veterinaire. 163(4):419-430.
26. Levonen, K. (1994). Detection of enzootic pneumonia in pigs herds using an enzyme linked immunosorbent assay in sow colostrum. *Res. Vet. Sci.* 56:111-113.
27. Lium, B. M., Falk, K. (1991). An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. I prevalence and morphological description of gross lung lesions. *Act. Vet. Scand.* 32:55-65.

28. Lloyd, L. C., Badman, R. T., Etheridge, J. R., McKelchie, K., Iyer, H. (1984). Assessment of a complement fixation test to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Aus. Vet. J.* 61(7):216-218.
29. Margni, R. A. (1989) *Inmunología e inmunquímica*. 4a ed. Panamericana. Argentina. Pág: 571-586.
30. Morilla, G. A., Bautista, G. C. (1986). *Manual de inmunología*. Ed. Diana. México. Pág: 127-142.
31. Morilla, G. A. (1994). Los seroperfiles en la clínica porcina. *Nuestro acontecer porcino*. 9:65-74.
32. Morrison, B. R., Pijoan, C., Hilley, H. D. and Rapp, V. (1985) Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Can J. Comp. Med.* 49:129-137.
33. Necochea, R. R., Pjoan, C. (1987) *Enfermedades de los cerdos*. Ed. Diana Técnico. México. Pág: 290-296.
34. Nicolet, J. (1985). *Compendio de bacteriología veterinaria*. Ed. Aeribia. España. Pág: 225-241.
35. Nicolet, J., Paroz, P. (1980). Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sci.* 29:305-309.
36. Piffer, L. A., Young, M. A. (1984). Comparison of complement fixation test an enzyme linked immunosorbent assay for detection of early infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 45(6):1122-1126.
37. Pijoan, C. (1985). *Avances en las enfermedades del cerdo*. Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México. Pág: 85-96.
38. Poiton, A. M., Byrt, D. and Heap, P. (1985). Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. *Aus. Vet. J.* 62(1) 13-18.
39. Ross, R. N., Freedman, H. (1989). *Manual of laboratory immunology*. 3a. edition. American society for Microbiology. Washintong D. C. USA. Pag: 97-109.
40. Sánchez-Vizcaino, J. M., Alvarez, M. (1987) *Técnicas Inmunoenzimáticas ELISA en Patología animal y vegetal*. Office International des Epizootes-Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. París. Francia.
41. Scanlan, M.C. (1988). *Introduction to Veterinary Bacteriology*. Iowa State University-Press/Ames. Pág:170- 175 y 325-327.
42. Sheldrake, R. F., Gardner, Y. A., Saunders, M. M. and Romalis, L.F. (1990). Serum antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by enzyme linked immunosorbent assay after experimental and natural infection of pigs. *Aus. Vet. J.* 67 (2): 39-42.

43. Sheldrake, R. F., Romalis, L. F. (1992) Evaluation of an ELISA for detection de *Mycoplasma hyopneumoniae* antibody in porcine serum. *Aust. Vet. J.* 69 (10): 255-258.
44. Slavik, F. M., Switzer, W. P. (1981). Comparison of microtitration complement-fixation test and tube latex agglutination test for diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* swine pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 42 (5) 862-864
45. Sorensen, V., Barford, K., Feld, N. C. (1992) Evaluation of monoclonal blocking ELISA and IHA for antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in SPF pig herds. *Vet. Rec.* 130: 488-490.
46. Stainer, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. I. and Painter, P. R. (1986). *The Microbial Word* 5a. Editon. Prentice-Hall, New Jersey, USA. Pag. 520-524
47. Stainer, R. Y. (1986) *Microbiologia*. Ediciones Repla. Mexico. Pag. 121-123
48. Straw, E. B., Tuovinen, K. V., Bigras-Poulin, M. (1989). Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. *JAVMA*, 195 (12) 1702-1706
49. Tajima, M., Yagihashi, T., Nunoya, T. (1985). Ultrastructure of Mycoplasmal capsules as revealed by stablitation with ruthenium red. *Jpn. J. Vet. Sc.* 47 (2): 217-223.
50. Taylor, D. J. (1987) *Enfermedades de los cerdos*. Ed. Manual Moderno. México. Pág: 116-127.
51. Teryinek, T., Avrameas, S. (1989) *Técnicas inmunoenzimáticas*. Grupo Editorial Iberoamericana México. Pág. 21-29 y 31-51
52. Yagihashi, T., Nunoya, T. and Tajima, M. (1984). Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on the development of *Haemophilus pneumoniae* in pigs. *Jpn. J. Vet. Sc.* 46(5): 705-713.
53. Young, F. T., Ross, R. F. (1987). Assessment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. *Am. J. Vet. Res.* 48 (4): 651-656.
54. Zielinski, C. G., Ross, R. F. (1992). Morphologic features and hydrophobicity of the cell surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 53 (7):
55. Zielinski, C. G., Ross, R. F. (1993). Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to ciliated respiratory trac cells. *Am. J. Vet. Res.* 54 (8) 1262-1269.