

11661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“DETERMINACION DE PROTEINAS DE
SOBRENADANTE DE CULTIVO DE
Mycoplasma hyopneumoniae”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(AREA DE MICROBIOLOGIA)
P R E S E N T A :
FRANK DIAZ AYALA

DIRECTORES: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO
DR. TONATIUH CRUZ SANCHEZ
DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

ASESOR: M.C. EDGAR AGUILERA CERON

ABRIL 2005



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA

VOCAL

DRA. ROSA ELENA MIRANDA MORALES

SECRETARIO

DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

PRIMER SUPLENTE

DR. ALFREDO SAHAGUN

SEGUNDO SUPLENTE

DR. ABEL CIPRIAN

Este trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Virología de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la FES-CUAUTITLAN, bajo la dirección del Dr. Abel Ciprián Carrasco, la Dra. Susana E. Mendoza E. y el Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez y la asesoría del M.C. Edgar Aguilera Cerón y fue auspiciado por los proyectos PAPIIT IN223203-2 y IN209701

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios por la oportunidad que me dio de conocer otro aspecto de su creación. El microcosmos es tan apasionante y perfecto como el macrocosmos. Conocer más de su creación es descubrir como se refleja la grandeza de su ser en ella.

Gracias a mi esposa Mary y mis hijos Erick y Pamela Giselle por la paciencia, amor y apoyo que han mostrado durante todo este largo período de tiempo.

A mi madre que me ofreció la oportunidad de llegar hasta aquí.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme el privilegio de ser escogido entre sus frutos. Por brindar todo lo necesario en el ámbito académico.

Un agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Abel Ciprián, por su apoyo

A mi madre académica y directora de tesis la Dra. Susana E. Mendoza por su constante apoyo, motivación y por invertir su tiempo y trabajo para la realización de esta tesis.

A mi amigo y director de tesis el Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez por su dirección y recomendaciones durante el desarrollo de este trabajo y su apoyo durante mi desarrollo académico.

A la Dra. Susana García por su ejemplo de constancia y trabajo, por sus enseñanzas invaluable. Por su amistad y apoyo gracias.

A cada profesor que me dirigió durante todo el trayecto hasta llegar a la meta: Dr. Eliseo Hernández, Dra. Clara Inés Álvarez, Dr. Andrés Romero., M.C. Edgar Aguilera al Dr. Jorge Tórtora. Gracias por invertir en mí.

A mis hermanos Ernie y Marilyn Klassen por sus consejos y apoyo durante tiempos difíciles y por compartir su vida conmigo.

A mis amigos y compañeros de estudio Norberto, Marichuy, Paty y Rosa. Por su amistad y motivación en esta etapa.

"Bienaventurado el hombre que halla la sabiduría, y que obtiene la inteligencia; porque su ganancia es mejor que la ganancia de la plata, y sus frutos más que el oro fino. Más preciosa es que las piedras preciosas; y todo lo que puedes desear, no se compara a ella. Largura de días está en su mano derecha; en su izquierda, riquezas y honra. Sus caminos son caminos deleitosos, y todas sus veredas paz. Ella es árbol de vida a los que de ella echan mano, y bienaventurados los que la retienen. Proverbios 3:13-18

INDICE

A. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

B. RESUMEN

1. INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Distribución	2
1.3 Etiología	3
1.4 Antígenos de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	5
1.5 Transmisión	7
1.6 Patogenia	8
1.7 Inmunidad	14
1.8 Diagnóstico de la Neumonía Enzootica	15
2. JUSTIFICACION	16
3. HIPOTESIS	16
4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo general	18
4.2 Objetivos particulares	18
5. METODOLOGIA	20
Fase I	
5.1 Determinación de proteínas secretadas al medio de cultivo por <i>M. hyopneumoniae</i>	20
5.1.1 Cepas de <i>M. hyopneumoniae</i>	20
5.1.2 Medio de cultivo para el crecimiento de <i>M. hyopneumoniae</i>	20
5.1.3 Cultivo e identificación de <i>M. hyopneumoniae</i>	22
5.1.4 Pruebas bioquímicas para la caracterización de <i>M. hyopneumoniae</i> ...	22
5.1.4.1 Prueba de dependencia de esteroides	22
5.1.4.2 Prueba de fermentación de los carbohidratos	23
5.1.4.3 Prueba de reducción del tetrazolio	23



5.1.4.2	Prueba de fermentación de los carbohidratos	23
5.1.4.3	Prueba de reducción del tetrazolio	23
5.1.4.4	Prueba de hidrólisis de la arginina	23
5.1.4.5	Prueba de hidrólisis de la urea	24
5.1.4.6	Prueba de producción de peróxido de hidrógeno	24
5.1.4.7	Pruebas serológicas en la identificación de los micoplasmas	24
5.1.5	Electroforesis de las fracciones en geles de Poliacrilamida con Dodecil-Sulfato de Sodio (SDS)	24
5.1.5.1	Preparación de los geles	24
5.1.5.2	Preparación y corrimiento de las muestras	25
5.1.5.3	Tinción de geles de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio	25
5.1.5.4	Tinción de geles con nitrato de plata	26
5.1.5.5	Ecuación de la movilidad relativa	27
5.1.6	Purificación de Proteínas	27

Fase II

5.2	Obtención de sueros positivos a <i>M. hyopneumoniae</i>	28
5.2.1	Obtención de sueros de granja de animales vacunados	28
5.2.2	Obtención de sueros de animales infectados experimentales con cepa 194 de <i>M. hyopneumoniae</i>	28
5.2.2.1	Selección de cerdos libres de enfermedades respiratorias	30
5.2.2.2	Producción de <i>M. hyopneumoniae</i> in vivo y homogenizado Pulmonar	30
5.2.2.3	Grupos experimentales y diseño experimental	31
5.2.2.4	Inoculación de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	31
5.2.2.5	Evaluación de lesiones macroscópicas	32
5.2.2.6	Evaluación de lesiones microscópicas	32
5.2.2.7	Aislamiento de <i>M. hyopneumoniae</i>	32
5.2.2.7.1	Identificación inmunológica de los micoplasmas	33
5.2.2.8	Determinación del título de anticuerpos por la prueba de ELISA	34
5.2.2.8.1	Aplicación del antígeno Tween 20.....	34

Fase III

5.3 Inmunotransferencia con las proteínas detectadas por sueros porcinos ...	35
5.3.1 Electrotransferencia	35
5.3.2 Inmunotransferencia	37

Fase IV

5.4 Determinación de la actividad hemolítica de las proteínas purificadas	39
5.4.1 Prueba de hemólisis	39

6. RESULTADOS 41

Fase I

Determinación de proteínas secretadas al medio de cultivo por <i>M. hyopneumoniae</i>	41
6.1 Determinación de las proteínas de secreción por la técnica de electroforesis	41

Fase II

Obtención de sueros positivos a <i>M. hyopneumoniae</i>	48
6.2 Evaluación postmortem de los cerdos control e infectados experimentalmente con <i>M. hyopneumoniae</i>	48
6.2.1 Resultados de la prueba de ELISA	48

Fase III

6.3 Inmunotransferencia con las proteínas detectadas y sueros porcinos ...	49
--	----

Fase IV

6.4 Determinación de la actividad hemolítica de las proteínas purificadas	52
--	----

7. DISCUSION53

8. CONCLUSIONES57

9. APENDICE 1 58

APENDICE 2 62

APENDICE 3	65
APENDICE 4	66
APENDICE 5	67
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	68

A. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Presencia de proteínas de medio de cultivo sin inóculo de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	41
Tabla 2. Proteínas de sobrenadante de cultivo de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 194	42
Tabla 3. Resultado de lesiones macroscópicas, microscópicas, inmunofluorescencia y aislamiento de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	48
Tabla 4. Resultados de la prueba de ELISA	48
Figura 1 Diagrama de Diseño Experimental	19
Figura 2. Obtención de biomasa de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	21
Figura 3. Diseño experimental para obtención de sueros positivos	29
Figura 4. Colocación del Sistema de electrotransferencia	36
Figura 5. Técnica de electrotransferencia e inmunotransferencia de proteínas	39
Figura 6. Presentación de proteínas por día de la cinética de 11 días	44
Figura 7. Número de proteínas de secreción por día detectadas por electroforesis	45
Figura 8. Proteínas observadas por electroforesis en los días 9 y 10	46
Figura 9. Aparición de la proteína de 22 kd en el día 9 de la cinética	47
Figura 10. Perfiles de inmunotransferencia de sueros de animales infectados experimentalmente	49
Figura 11. Reactividad de la proteína de 22 kd con sueros de animales vacunados	50
Figura 12. Elusión de proteínas de sobrenadante en Sephacryl HR- 300	51
Figura 13. Desafío de la proteína de 22 kd en contra de sueros de animales vacunados.....	52

B. RESUMEN

Mycoplasma hyopneumoniae es la bacteria causante de la Neumonía Enzoótica. Debido a que se conoce poco acerca de factores proteicos vinculados a la patogenia de la enfermedad, este trabajo pretende caracterizar las proteínas excretadas por *M. hyopneumoniae* durante sus fases de crecimiento y que pudieran estar involucrados en la respuesta inmune del cerdo. Para determinar las proteínas producidas durante las fases de crecimiento en 11 días consecutivos, se cultivó *M. hyopneumoniae* cepa 194 utilizando 5 mg/ml de inóculo inicial. Se obtuvieron diariamente muestras de sobrenadantes para realizar geles de poliacrilamida en condiciones de desnaturalización. Posteriormente se realizaron inmunotransferencias con sueros de cerdos infectados experimentalmente con *M. hyopneumoniae*, así como de sueros provenientes de animales de campo vacunados con una bacterina comercial para determinar qué proteínas reconoce el cerdo infectado y el cerdo vacunado. El mayor número de proteínas se ubicó en el noveno día de la cinética, determinándose 17 proteínas con pesos como de 166 y 19 Kd. La inmunotransferencia mostró reactividad en sueros de cerdos inoculados experimentalmente contra las proteínas de peso molecular 102, 79, 69, 63, 57, 52 Kd; la proteína 22 Kd fue predominantemente detectada por los sueros de los animales vacunados. Se realizó la purificación de estas proteínas por columna de exclusión molecular con Sephacril S 300 HR. Debido a que se han involucrado proteínas citotóxicas de *M. hyopneumoniae* en la patogenia de la Neumonía enzoótica, se verificó esta capacidad a través de la prueba de hemólisis, presentando efecto hemolítico en glóbulos rojos de carnero solamente las proteínas de 102, 79 y 57 Kd. La determinación de estas proteínas abre la posibilidad de estudiar su implicación en la patogenia de la enfermedad, además de su potencial de su uso en el diagnóstico .

1. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes de la enfermedad

Las pérdidas económicas que originan los problemas respiratorios del cerdo son importantes y es una preocupación en la producción porcina, no solo en el país sino a nivel mundial. Existen datos que indican que al afectarse el tejido pulmonar, repercute negativamente en el crecimiento corporal del cerdo, se considera que a partir de un 15% de lesión pulmonar el animal va pierde 1.15 kg de peso. También se estableció que cuando afectados todos los lóbulos pulmonares, se tiene un decremento de crecimiento de 80%. Pijoan indica que por cada 10% de tejido pulmonar afectado, el animal sufre un retraso de crecimiento del 5% (Pijoan, 1985).

En un experimento para determinar la interacción de *M. hyopneumoniae* y *P. multocida* se formaron cuatro grupos experimentales: Grupo I, Testigo, inoculado con medio de Friss; Grupo II, inoculado con *M. hyopneumoniae*; Grupo III, inoculado con *P. multocida* y el Grupo IV, inoculado primero con *M. hyopneumoniae* y después con *P. multocida*. Se realizaron varios estudios entre los cuales se debía determinar la ganancia diaria de peso (GDP) y conversión alimenticia (CA). Los cerdos de los grupos I y III tuvieron una GDP de 0.355 ± 0.072 kg y de 0.360 ± 0.072 respectivamente y la CA fue de 2.68 ± 0.62 kg de alimento para el grupo I y de 2.42 ± 0.62 kg para el grupo III. Los cerdos del grupo II tuvieron una GDP parecida a los grupos anteriores (0.344 ± 0.072 kg) pero su CA fue de 3.55 ± 0.62 kg El grupo IV tuvo la más baja GDP (0.293 ± 0.072 kg) y la más alta CA (4.25 ± 0.44) (Ciprián, 1987; Ciprián et al., 1988).

El grupo testigo tuvo un índice de crecimiento normal y la inoculación con *P. multocida* tampoco afectó el crecimiento ni la conversión alimenticia de los lechones. Por otra parte, aunque la inoculación con *M. hyopneumoniae* no modificó GDP, los cerdos de este grupo consumieron 32% más alimento que los del grupo testigo. La infección secuencial con ambos agentes infecciosos provocó que los lechones consumieron 59% mayor cantidad de alimento que los cerdos del grupo testigo, aunque su GDP fue normal. Pointon et al. (1985) encontró que la infección con *M. hyopneumoniae* solo y en condiciones parecidas a las que operan en las granjas comerciales redujo la GDP en un 16% (en cerdos con un peso entre 8 a 85 kg) mientras que la CA aumentó un 14% (en cerdos con un peso entre

10 y 25 kg), en este trabajo se confirman tales observaciones, sin embargo, aunque la infección con *M. hyopneumoniae* solo (grupo II), resultó en lesiones pulmonares y un consumo de 32% de más alimento, estos parámetros fueron considerablemente más graves cuando se dio una superinfección con *P. multocida* (grupo IV) (Ciprián, 1987; Ciprián *et al.*, 1988).

La investigación actual esta enfocada a comprender las diversas enfermedades respiratorias tales como la Pleuroneumonía contagiosa porcina, Neumonía Enzoótica, Pasteurelisis pulmonar y la Rinitis atrófica a través del conocimiento de los factores de virulencia y su interacción con órganos afectados y la respuesta inmune generada , para así controlarlas adecuadamente promoviendo la prevención inmunológica específica para cada caso. Se reconoce que la Neumonía Enzoótica es una enfermedad de importancia en la producción porcina, por su alta incidencia (75%) lo que implica elevadas pérdidas económicas (Choi, 2003)

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente etiológico de la Neumonía Enzoótica. cuando este microorganismo esta ausente en los cerdos de crecimiento y finalización, el daño económico es menor. (Armstrong 1982, Morrison 1986, Pointon, 1985)

1.2 Distribución.

La Neumonía Enzoótica se encuentra en las regiones de más alta producción en el mundo, casi todas las granjas están afectadas y la incidencia de las afecciones es sumamente alta; una variedad de reportes indican que de los cerdos que salen al mercado, un 30 a un 75% está afectado (Armstrong, 1982). Es habitual encontrar un porcentaje significativo de pulmones con lesiones típicas de esta enfermedad en los diferentes rastros; la incidencia encontrada varia del 12 al 81 % (Whittlestone, 1979). En México, Maqueda (1977) hizo un análisis porcentual de la incidencia de Neumonía Enzoótica en cinco estados de la República, evaluando las lesiones macroscópicas de 4,013 pulmones correspondientes a igual número de cerdos. Los resultados mostraron que un 51% de los cerdos estaban afectados en mayor o menor grado, siendo la incidencia o severidad variables según los estados: Coahuila, 32.4% Guanajuato, 70.6%; Jalisco, 49.5%; Nuevo León, 23.5% y Sonora, 53.8%. En otro estudio realizado en rastros de la zona metropolitana de la Ciudad de México (Cuautitlán y Tlalnepantla), se encontró el 23% de fluorescencia específica en

pulmones neumónicos cuando se emplea la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Ciprián *et al.*, 1982).

Muestras realizadas en los estados de Guanajuato, Michoacán y México para analizar por serología la presencia de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* con la prueba Hyoptest^R, indicaron la distribución de anticuerpos en los diferentes rangos de edades, tanto para los de la línea de producción como para las productoras; las granjas de Guanajuato mostraron el 20% de seropositivos en las edades de 10 a 16 semanas, mientras que en las de Michoacán y México tuvieron menos reactores positivos, estos resultados indicaron una diferencia significativa entre granjas y entre estados (Nava *et al.*, 2001).

1.3 Etiología

Los micoplasmas son los microorganismos procariontes más simples y diminutos de vida libre, que se separan de las Eubacterias en una clase diferente denominada: *Mollicutes*. En el cerdo se han reconocido diferentes especies de micoplasmas y acholeplasmas; *Mycoplasma hyopneumoniae* es el género más importante en el cerdo y produce una enfermedad infecciosa del tracto respiratorio conocida como la Neumonía enzoótica, llamada también neumonía micoplasmática porcina. Otros micoplasmas relacionados con el cerdo son *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae* que están involucrados en procesos artríticos. Asimismo, géneros como *M. flocculare*, *M. suis*, *Acholeplasma axanthum* y *Acholeplasma granularum* cuya participación como patógenos es incierta. (Razin, 1992; Simecka *et al.*, 1992)

Taxonomía y Propiedades de los micoplasmas (Clase Mollicutes)

Clasificación	Número de especies reconocidas	Tamaño del genoma (kbp)	Mol % G+C	Requerimiento de colesterol	Propiedades distintivas	Habitat
Orden I: Mycoplasmatales Familia I: Mycoplasmataceae Género I: Mycoplasma	92	580 - 1300	23 - 41	+		Humanos, animales, plantas e insectos
Género II: Ureaplasma	5	730 - 1160	27 - 30	+	Ureasa (+)	Humanos, animales
Familia II: Spiroplasmataceae Género I: Spiroplasma	11	1350 - 1700	25 - 31	+	Filamentos helicoidales	Artrópodos, plantas
Orden II: Acholeplasmatales Familia I: Acholeplasmataceae Género I: Acholeplasma	12	Alrededor de 1600	27 - 36	-		Animales, plantas e insectos
Orden III: Anaeroplasmatales Familia: Anaeroplasmataceae Género I: Anaeroplasma	4	Alrededor de 1600	29 - 33	+	Sensible a O ₂ Anaerobio obiligado	Rumen de bovinos y ovinos
Género II: Asteroleplasma	1	Alrededor de 1600	40	-	Sensible a O ₂ Anaerobio obiligado	Rumen de bovinos y ovinos
MLO No Cultivados y Clasificados		500 - 1185	23 - 29	No establecido	No cultivado	Plantas e insectos

Razin, S., 1992

1.4 Antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae*

El análisis antigénico de los micoplasmas es extremadamente difícil, debido al pequeño volumen de microorganismos que se obtienen (de 5 a 20 mg por litro de medio de cultivo). La antigenicidad se encuentra localizada en la membrana citoplasmática, especialmente en los lipolisacáridos asociados a proteínas, que son capaces de estimular la producción de anticuerpos. Los estudios sobre la naturaleza antigénica de los micoplasmas han sido realizados por varios autores y los resultados encontrados revelan que existen antígenos proteicos, glicolípidos y polisacáridos ^(Ciprián 1979).

Además, se han comparado algunas cepas de *M. hyopneumoniae*, encontrando diversidad antigénica entre ellas por pruebas de inmunoelectroforesis bidimensional. Los determinantes antigénicos son proteínas, glicolípidos y fosfolípidos que se localizan en la superficie celular. Las diferencias en la virulencia, inmunogenicidad y distribución geográfica no han sido determinadas ^(Ro y Ross 1983).

Utilizando la técnica de inmunotransferencia con las cepas J y 194 de *M. hyopneumoniae*, la cepa Ms 42 de *M. flocculare* y *M. hyorhinis*, además de sueros de cerdos infectados con *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y antisuero porcino contra *M. flocculare*, se encontró que los antisueros detectaron cinco antígenos, estimando sus pesos moleculares en 110, 64, 50, 41 y 36 Kd. De igual forma se encontró que *M. hyopneumoniae* presenta reacciones cruzadas con *M. flocculare* y *M. hyorhinis*. Así los antígenos de 110, 50, 41 y 36 Kd de *M. hyopneumoniae* cruzan serológicamente con *M. flocculare*. El antígeno de 36 Kd cruza con *M. hyorhinis*. El único antígeno de *M. hyopneumoniae* que no cruzó con los otros micoplasmas mencionados fue el 64 Kd, el cual es utilizado como antígeno específico para el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* ^(Young y Ross 1987).

De igual forma en otro trabajo se menciona que utilizando lavados bronquiales de cerdos inoculados con *M. hyopneumoniae*, cepa 232 y mediante la técnica de inmunotransferencia se detectaron anticuerpos que reconocieron a diferentes antígenos cuyos pesos moleculares fueron : 200, 110, 97, 95, 80, 78, 74, 70, 60, 52, 50, 41, 36 kD. Es de un especial interés el antígeno de 97 kD, ya que es el primero en detectarse a partir de los 35 días postinfección por anticuerpos IgA e IgG ^(Young et al., 1990).

Existen algunos componentes de la superficie de los micoplasmas que contribuyen a la interacción con las células del hospedero. En el caso de *M. pneumoniae* una proteína, la P1, ha sido involucrada dentro del proceso de penetración a las células blanco, así como una adhesina de 160-190 kD. (Feld *et al.*, 1992) Con inmunotransferencia se han descrito cinco antígenos, denominados como p90, p68, p50, p30 y p26. Las proteínas p90, p68 y p50 están localizadas en la superficie de la membrana citoplasmática (Klinkert, 1985).

Estudios sobre las propiedades antigénicas de *M. hyopneumoniae* cepa J de referencia y aislamientos de campo revelaron la presencia de proteínas inmunodominantes que incluyen a una proteína citosólica con actividad de dehidrogenasa determinada como p36 (Frey *et al.*, 1994; Haldimann *et al.*, 1993; Stipkovits *et al.*, 1991) y tres proteínas de membrana, p46, p65 y p74 (Brooks y Faulds, 1989; Kim *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 1988). Estudios comparativos con otros micoplasmas del cerdo, demostraron que las proteínas p36 y la p46 son determinantes antigénicos especie-específicos de *M. hyopneumoniae* altamente conservados (Mori *et al.*, 1987; Strasser *et al.*, 1991)

Se ha identificado y caracterizado una adhesina de *Mycoplasma hyopneumoniae* mediante un anticuerpo monoclonal que inhibió la adherencia de micoplasma a los cilios traqueales durante la infección. El anticuerpo monoclonal F2G5, además de detectar numerosas bandas por medio de la técnica de inmunotransferencia reconoció predominantemente una banda proteica de 97 Kd. La proteína pura se adhirió al cilio y la adherencia fue bloqueada al *M. hyopneumoniae* completo. Esta proteína está localizada en la superficie de la membrana de *M. hyopneumoniae*. (Zhang *et al.*, 1995)

La región general de la p97 que media la adherencia a los cilios, está al parecer en la región R1 cerca de carboxilo terminal de la proteína, pero no es claro si la región media la adherencia a los cilios independientemente de otras secuencias de la p97. Los resultados mostraron que 8 unidades repetitivas de R1 son requeridas para la unión con el cilio y que 3 unidades repetitivas son necesarias para el reconocimiento de los anticuerpos (Hsu y Minion, 1998; Minion *et al.*, 2000).

Un análisis reciente de la dinámica proteica en *M. hominis* muestra que existe modificación en algunas de ellas durante el proceso de invasión (Hopfe, 2004)

1.5 Transmisión.

La transmisión de las bacterias respiratorias se lleva a cabo fundamentalmente por contacto directo, por las secreciones nasales y faríngeas, por lo tanto el medio principal de diseminación es de cerdo a cerdo debido a que el micoplasma es muy frágil y no resiste mucho tiempo fuera del hospedador, así la transmisión de *M. hyopneumoniae* se lleva a cabo por contacto o por aerosoles entre cerdos infectados (fase aguda) o cerdos portadores convalecientes y los cerdos sanos (Frlis, 1973; Ross, 1984 y PiJoan, 1985).

La infección por micoplasma es primero vertical (de madres jóvenes a lechones) y después al momento del destete, es horizontal (de lechones paridos por cerdas de primeros partos a lechones provenientes de cerdos de cuarto o quinto parto). La transmisión horizontal se intensifica debido a el profundo stress que acompaña al destete y se produce fundamentalmente al mezclar cerdos de diferentes camadas en un solo corral, lo que ocasiona enfrentamientos constantes. Se ha encontrado que el constante mezclado de animales de todas las edades es uno de las principales causas de tensión en la piara (PiJoan, 1985). Estudios de otras enfermedades por micoplasma en otras especies sugieren que la susceptibilidad a estas enfermedades puede incrementarse con la edad. Sin embargo, en trabajos experimentales se encontró que no existe ninguna diferencia de susceptibilidad a la Neumonía Enzoótica en cuanto a la edad (Piffer y Ross, 1984).

En condiciones experimentales, se ha reproducido la enfermedad, Hodges *et al.* (1969) utilizaron cerdos de granjas libres de Neumonía Enzoótica e infectaron a cerdos gnotobióticos con 2.5 a 5 ml (10^{-5} unidades cambiantes de color/ml) por vía intratraqueal y de 1 a 2 ml por vía intranasal y a cerdos SPF con 10 ml por vía intratraqueal y 5 ml por vía intranasal de la cepa J de *M. hyopneumoniae* en una dosis única y altamente purificada, logrando invariablemente reproducir la neumonía. Confirmaron que *M. hyopneumoniae* es el agente primario en las neumonías del cerdo pero no excluyeron la posibilidad de que otros agentes puedan estar involucrados.

En otro estudio se utilizaron cerdos nacidos por histerectomía y privados de calostro (HPPCD) y que fueron infectados por vía intranasal con suspensiones pulmonares de tejido neumónico de casos confirmados de Neumonía Enzoótica; aislaron micoplasma en 15 de

16 cerdos inoculados y confirmaron la regularidad con la cual *M. hyopeumoniae* puede reaislarse de casos activos de la enfermedad inducida experimentalmente ^(Goodwin, 1972).

Por otro lado Underdahl *et al.* (1980) infectaron por vía intranasal cerdos gnotobióticos con 3 ml de un cultivo diluido 1:1 con solución salina balanceada, usando la cepa NB-12 de *M. hyopeumoniae* de 26 pases en cerdos HPCD y 22 pases en medio líquido). Sólo aislaron micoplasma en 10 de 16 cerdos inoculados y con mayor frecuencia cuando se cultivaron a partir del área neumónica del pulmón. También se emplearon cerdos provenientes de granjas libres de la enfermedad y se inocularon con homogeneizados de pulmones suspensión de pulmón neumónico al 10% conteniendo la cepa 11 de *M. hyopeumoniae* inoculado por vía intratraqueal (IT) e intranasal (IN). Micoplasma sólo se reaisló en 10 de 18 cerdos del grupo IT y 9 de 12 del grupo IN ^(Piffer y Ross, 1984).

Con el objeto de evaluar agentes quimioterapéuticos o de estudiar mejor a la Neumonía Enzoótica, Hannan *et al.*, (1984) han desarrollado un modelo experimental basado en la reproducción de la neumonía en cerdos gnotobióticos inoculados por medio de aerosoles, utilizando cultivos puros de *M. hyopeumoniae* de tercer pasaje cepa NB12, aislados de pulmón neumónico de lechones gnotobióticos, el periodo de incubación de la Neumonía Enzoótica de los cerdos en condiciones naturales varió entre 10 y 15 días ^(Ross, 1984) o extendiéndose hasta 2 a 3 semanas. ^(Goodwin *et al.*, 1967; Livingston *et al.*, 1972). Sin embargo, se han detectado variaciones extremas en donde la enfermedad se mantiene en forma subclínica hasta por 15 meses ^(Whittlestone, 1979 y Ross, 1984).

1.6 Patogenia.

Los micoplasmas son depositados por inhalación en las márgenes centrales de los pulmones, estableciéndose en el epitelio bronquial y bronquiolar, en donde la población de este microorganismo aumenta y avanza a lo largo del árbol respiratorio ^(Armstrong, 1982). Se ha demostrado a través de microscopía electrónica de barrido e inmunofluorescencia que el *M. hyopeumoniae* se concentra en la superficie de las células epiteliales de los bronquios y bronquiolos sobre todo en los cilios, de donde parte hacia los alvéolos y es ingerido por los macrófagos alveolares. Los micoplasmas estimulan a la células linfoides que se acumulan en las células linfoides adyacentes a bronquios y bronquiolos como parte de la respuesta inmune hacia el micoplasma ^(Livingston *et al.*, 1972). Se mostró que en cultivo de

órganos el *M. hyopneumoniae* no tuvo preferencia para infectar a las células epiteliales de anillos traqueales o de pulmón de origen fetal, los resultados indicaron que un inóculo relativamente bajo de micoplasma, libre de otros microorganismos, produjo daño local *in vitro* en tejidos del sistema respiratorio del cerdo.

M. hyopneumoniae sólo afecta en forma natural al cerdo, el daño específico que origina es una disminución del número de cilios, y esto se debe a la producción de una citotoxina con un peso molecular de 54 kD. Los animales de experimentación como el hurón, cobayo, mono rhesus y embrión de pollo no han mostrado susceptibilidad al agente. Tampoco se ha observado que produzca lisis en glóbulos rojos del cerdo, caballo, vaca o pollo. Se ha observado desde hace tiempo, que la Neumonía Enzootica en los cerdos de engorda podía ser transmitida en forma experimental con filtrados libres de otro tipo de bacterias de muestras de pulmón neumónico. Al tratar estos filtrados con penicilina o sulfonamidas se mantenía la infectividad; por lo que se sugirió que el agente causal era un virus. Sin embargo, por evidencias posteriores, como el tratar los filtrados libres de bacterias con tetraciclinas para inhibir la infección, la determinación del tamaño del microorganismo causal cuyo tamaño mostró ser de 0.2 a 0.45 μm de diámetro, además de su observación en preparaciones pulmonares teñidas con Giemsa. Sumado a esto la exigencia mostrada para su crecimiento en medios libres de células, sugirió que el agente responsable no era un virus sino un micoplasma (Whittlestone, 1979 y Armstrong, 1982).

Se ha determinado la adherencia de *M. hyopneumoniae* sobre el epitelio ciliado del tracto respiratorio porcino, sobretodo en las porciones distales del pulmón, en donde se inicia un evento importante en el desarrollo de la Neumonía Enzootica. El modelo de estudio realizado *in vitro*, se caracterizó por el uso de una suspensión de células epiteliales ciliadas colectadas del tracto respiratorio del cerdo, que fueron mezcladas e incubadas con *M. hyopneumoniae*, posteriormente fueron diluidas, agitadas y sedimentadas sobre portaobjetos y teñidas con un conjugado contra *M. hyopneumoniae*. La fluorescencia fue observada principalmente sobre las células ciliadas, y solo algunos organismos fueron observados en otras partes no ciliadas o sobre otro tipo de células. La adherencia fue parcialmente inhibida con suero a bajas diluciones de cerdos convalescientes a un proceso neumónico inducido por *M. hyopneumoniae* y completamente inhibida con sueros a altos títulos. La preincubación del micoplasma con peryodato y tripsina bloqueo la adherencia, mientras que el formaldehído la disminuyó. Una variedad de carbohidratos como la D-

glucosa, D-galactosa, L-fucosa, D-mannosa, D-N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina, lactosa fetuina no afectaron la adherencia. El sulfato de dextrán, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, metionina, valina o glutamina redujeron la adherencia. El tratamiento con agentes hidrofóbicos destructores de las uniones micoplasma-célula tales como tetrametilurea, o incubaciones en ausencia de sal o a bajas temperaturas redujo la adherencia. Cuando se emplearon otras especies no hubo adherencia. Estos hallazgos sugieren definitivamente que la adherencia de *M. hyopneumoniae* es específica de huésped y que esta mediada por proteínas y carbohidratos localizados en la superficie del micoplasma y por moléculas que contienen azufre en la membrana de las células del cerdo. La localización altamente polarizada del micoplasma sobre la célula ciliada indica que posiblemente exista una interacción esteroespecífica entre la adhesina o adhesinas del micoplasma y el receptor o receptores de las células ciliadas, pero también indicaría que existe una interacción hidrofóbica no específica en el proceso de la adherencia, por el tratamiento con tetrametilurea, incubaciones en ausencia de sal o bajas temperaturas ^(Ziellinski y Ross, 1993).

Micoplasma induce la pérdida de cilios debido a la elaboración de una o varias enzimas, de sustancias tóxicas, por parasitismo o por competencia de los materiales nutricionales. Una vez que los cilios se pierden, el micoplasma coloniza como resultado de la disminución del movimiento protector de la cubierta mucosa, permitiendo su adhesión a las partes fijas de las células respiratorias ^(Williams y Gallagher, 1978). Mediante el ensayo de adherencia en placas de microtitulación, se ha establecido utilizando cilios traqueales de cerdo que contienen receptores para *M. hyopneumoniae*. La unión entre ambos fue dependiente de la concentración de cilios y el número de micoplasmas. El tratamiento de los cilios con neuraminidasa pareció promover la adherencia de los micoplasmas, mientras que el tratamiento de los cilios con metaperiodato de sodio disminuyó la unión. Los resultados indicaron que los receptores para *M. hyopneumoniae* en el epitelio ciliado del tracto respiratorio del cerdo son glicoconjugados naturales ^(Zhang et al., 1994).

También se ha encontrado ciliostasis y pérdida de cilios ocasionados por la infección con *M. hyopneumoniae*, en experimentos realizados *in vivo* (cerdos recién nacidos) e *in vitro* (cultivo de órganos/traqueales). Asimismo, se encontró que los niveles de las enzimas calmodulin o dehidrogenasa en los anillos traqueales no estaban alteradas cuando la ciliostasis y la pérdida de cilios eran extensivas, estos daños disminuyeron con los pasajes

del micoplasma *in vitro* (pasajes en cultivo), el daño inducido por *M. hyopneumoniae* en los anillos traqueales fue prevenido con el uso de un suero policlonal de cerdo o separando el micoplasma del cilio por filtración en una membrana con un tamaño de poro de 0.1 micras. La adherencia o la asociación del *M. hyopneumoniae* con el epitelio ciliado es necesario para inducir ciliostasis y pérdida de los cilios (Debey y Ross, 1994).

Se ha acumulado gran cantidad de evidencia sobre los mecanismos de patogenicidad y desarrollo de lesiones causadas por una infección con *M. hyopneumoniae* vistas con microscopía fotónica y electrónica tanto de transmisión en cortes finos, como en barrido. Algunos estudios han sido complementados con autorradiografía *in situ* con pulmones con Neumonía enzoótica. Geary y Walczak en 1985 aislaron e identificaron factor citopático de *M. hyopneumoniae* a partir de membranas de la cepa VPP 11. Este factor es una proteína con un punto isoelectrico de 6.2 y un peso molecular de 54 kD y fue capaz de inducir efecto citopático en fibroblastos de pulmón humano (MRC-5) a una concentración de 250 ng de proteína/ml. Es probable que este factor tenga un papel importante en la patogénesis de la enfermedad natural en el cerdo. Cuando se ha establecido la infección sobre la superficie del epitelio, el micoplasma puede detectarse hasta las 15 semanas después de la inoculación. Estudios con inmunofluorescencia y cultivo indicaron que el número de micoplasmas disminuye en los estados tardíos de la enfermedad experimental y la intensidad de la infección y su duración fueron variables (Livingston *et al.*, 1972 y Underdahl *et al.*, 1980).

Generalmente la patogenicidad de los micoplasmas es debida a su habilidad de adherirse a la célula huésped, más aún cuando ya se ha mencionado que existe una asociación estrecha entre la citoadsorción y la citopatogenicidad en el caso de las diferentes especies de micoplasmas (Mebus y Underdahl, 1977; Williams y Gallager, 1978). Ya se había encontrado en condiciones *in vitro* que *M. hyopneumoniae* interfiere en las ondulaciones normales del cilio (Williams y Gallager, 1978) y que también ocurría la eliminación de los cilios después de la infección con *M. hyopneumoniae* (Gabridge *et al.*, 1982; Tajima y Yagihashi, 1982). Asimismo, se observó que cuando el *M. hyopneumoniae* se multiplicaba en la tráquea y en los bronquios, el evento primario de la infección fue la adhesión de los micoplasmas a las células ciliadas, lo que desencadenó un efecto citopático y una exfoliación de las células epiteliales (Mebus y Underdahl, 1977).

El grupo de investigadores de la FES-Cuautitlán-UNAM, ha realizado estudios y visualizado a través de microscopía electrónica de barrido, la interacción secuencial que presentan dos géneros de bacterias, *M. hyopneumoniae* y *P. multocida*, y se ha encontrado en los animales inoculados sólo con *M. hyopneumoniae* lesiones características que permiten evaluar la patogenia de la neumonía enzoótica. El objetivo fue visualizar por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) los posibles mecanismos que permitieron la invasividad de *Pasteurella multocida* por *Mycoplasma hyopneumoniae*. El diseño experimental consistió en formar cuatro grupos de cerdos libres de neumonía enzoótica, que fueron desafiados con *M. hyopneumoniae* preparado en homogeneizado pulmonar, y con *P. multocida*. Se encontró, que el grupo A inoculado solo con medio de cultivo, y en el grupo C que se inoculó con *P. multocida* al día 23, no presentaron lesiones; el grupo B inoculado con *M. hyopneumoniae*, presentó lesiones macroscópicas y microscópicas características de la Neumonía Enzoótica; el grupo D inoculado al inicialmente con *M. hyopneumoniae* y al día 23 con *P. multocida* desarrolló lesiones de Neumonía Enzoótica (Ciprián, 1987; Ciprián *et al.*, 1988).

El estudio de MEB reveló que los pulmones testigo y los que fueron inoculados únicamente con *P. multocida*, no mostraron cambios patológicos, el epitelio bronquial estaba normal, y numerosas células caliciformes mostraban su típica característica cubierta de papilas, así como células epiteliales ciliadas largas. Los pulmones de los cerdos inoculados con *M. hyopneumoniae* presentaron consolidación pulmonar y se observaron cambios en los epitelios ciliados con bacterias, fibrina y muchas células fagocitarias alveolares. Además, los alvéolos estaban cubiertos por los exudados, células y bacterias; los cilios del epitelio respiratorio estaban adheridos unos a otros formando mechones o agregados que caracterizaron esta afección por micoplasma. El grupo de cerdos inoculado primero con *M. hyopneumoniae* y después con *P. multocida* mostró los mismos cambios que se encontraron en el grupo B, con la adición de que los epitelios ciliados mostraron zonas carentes de cilios y micoplasmas adheridos en ellos formando cilios apelmazados, así como de muchas bacterias. En los pulmones de los cerdos del grupo D infectados con *M. hyopneumoniae* y *P. multocida*, los alvéolos fueron cubiertos por exudados células y bacterias, mientras que la consolidación pulmonar observada no permitió distinguir los bronquiólos pulmonares; el epitelio de estos animales estaba entrando en degeneración y

por lo tanto el epitelio traqueo bronquial como forma de eliminación de contaminación del pulmón dejó de funcionar (González *et al*, 1999).

La acción conjunta de estos dos microorganismos son causa de la transvasación de plasma en los alvéolos, en donde la falta de actividad ciliar permite la permanencia del patógeno primario, sino además la de los oportunistas y el ejercicio de sus respectivas actividades patógenas, de tal manera que las zonas de consolidación pulmonar no sólo permiten la multiplicación microbiana, sino además crean una barrera a la penetración de medicamentos capaces de eliminarlos. Los epitelios ciliados por otra parte, no sólo muestran la pérdida de la motilidad por la formación de mechones, sino además la pérdida de los cilios y de las células de recubrimiento en la mucosa respiratoria. Esta solución de continuidad crea un sitio ideal para la invasión de oportunistas terciarios presentes en el aire, y representa un reto importante a la capacidad de defensa del animal (González *et al*, 2000).

Se realizó un experimento para demostrar si *M. hyopneumoniae* era capaz de inhibir a las células productoras de la sustancia descrita por Pijoan y Ochoa en 1978 y por Iglesias *et al* en 1982 que tiene la propiedad de destruir in vitro a la *P. multocida*. Las replicas de los grupos I y II que no fueron inoculadas con *P. multocida* solo sirvieron como controles. Las cuantas viables encontradas en los grupos III y IV fueron muy similares, así el promedio de los resultados encontrados de bacterias por ml en el grupo III fue el siguiente: a las 4 hrs: 41.5×10^7 , (Log_{10} :8.62); a las 8 hrs: 80.3×10^8 , (Log_{10} : 9.96; a las 12 hrs: 21.8×10^9 , (Log_{10} : 10.34) y a las 24 hrs: 33.7×10^5 , (Log_{10} : 6.52), mientras que las encontradas en el grupo IV fueron: a las 4 hrs: 39.5×10^7 (Log_{10} : 8.56); a las 8 hrs: 79×10^8 , (Log_{10} : 9.86); a las 12 hrs: 16.8×10^9 , (Log_{10} : 10.23) y a las 24 hrs: 16.7×10^5 , (Log_{10} :6.22). En este trabajo, se encontró que en lugar de disminuir las unidades formadoras de colonias en relación al tiempo, *P. multocida* continuó multiplicándose, esto puede deberse posiblemente a que la sustancia bactericida se trata de una proteína inestable debido a que las condiciones del experimento se sometió. Por otro lado, en los estudios de Iglesias *et al* en 1982 el tiempo máximo de exposición de la *P. multocida* con los explantes traqueales fue de una hora, mientras que el tiempo mínimo en este trabajo fue de 4 horas. Al parecer la inestabilidad de la sustancia bactericida y los tiempos prolongados de exposición no permitieron esclarecer si esta importante barrera del pulmón pudo ser afectada por *M. hyopneumoniae* (Ciprián, 1987).

1.7 Inmunidad.

A pesar de la escasa antigenicidad de estos microorganismo y a la naturaleza crónica de la enfermedad que producen, en las infecciones naturales por micoplasmas es notoria una marcada respuesta de inmunidad celular.

Existe primero una interacción entre *M. hyopneumoniae* y células específicas localizadas en pulmón, y nódulos linfoides retrofaríngeos y bronquiales, se detecta la presencia de inmunoglobulinas tipo IgG e IgA en secreciones traqueobronquiales en una cantidad elevada a las dos semanas postinfección. (Suter et al., 1985).

Posteriormente se han observado células con inmunoglobulinas IgG específicas en su superficie contra *M. hyopneumoniae* en tejidos linfoides y pulmón a las 3 y 4 semanas postinfección. Un dato significativo es que la presencia de anticuerpos coincide con la aparición de las lesiones neumónicas (Suter et al., 1985).

En una infección con *M. hyopneumoniae*, se observa que la proporción de células que contienen IgA:IgG es de 1:3 en mucosa nasal y en ganglios retrofaríngeos, cambiando esta proporción a 1:15 en nódulos linfoides bronquiales. En estos nódulos, a las tres semanas postinfección se encuentran todos los isotipos de inmunoglobulinas pero sobre todo la clase IgG que aparece desde la primera semana. Se han estudiado las secreciones traqueobronquiales utilizando la técnica de ELISA encontrándose que las inmunoglobulinas IgM e IgG predominan en las primeras fases de la infección, mientras que las IgA van incrementándose progresivamente (Suter et al., 1985).

Los anticuerpos séricos tienen un comportamiento diferente al observado en las secreciones traqueobronquiales. Estos anticuerpos se detectan 5 semanas postinfección, siendo las IgG las más importantes detectadas por la técnica de ELISA (Ethendge et al., 1979b). Las pruebas de ELISA y la fijación de complemento son las más utilizadas. Actualmente se ha desarrollado la prueba de ELISA Tween 20 que reduce al mínimo las reacciones cruzadas con *M. flocculare*, teniendo también ésta prueba amplias perspectivas para el monitoreo de datos, particularmente en la detección de anticuerpos del calostro de cerdas

(Armstrong *et al.*, 1983; Nicolet y Paroz, 1980; Bommeli y Nicolet, 1983). Sin embargo, a pesar de que en estas pruebas se ha observado la aparición de altos niveles de anticuerpos, éstos no confieren protección (Ross, 1999).

Con respecto a la inmunidad celular, ésta ha sido medida por las técnicas de transformación blastoide e hipersensibilidad cutánea (Roberts, 1972; Adegbeye, 1978), y se ha encontrado una respuesta significativa a las dos pruebas hasta por un período comprendido de 44 a 66 semanas postinoculación. También se ha detectado que existe una alteración de la fusión del macrófago alveolar e inmunosupresión en los cerdos infectados (Tajima *et al.*, 1985). También se han detectado anticuerpos contra las glicoproteínas de membrana de los eritrocitos de cerdo después de una infección experimental con *M. hyopneumoniae*, apoyando de esta forma la asociación de enfermedad autoinmune en la patogénesis de la Neumonía enzoótica (Kishima y Ross, 1985; Tajima *et al.*, 1983).

Asimismo, se ha observado que los animales recuperados desarrollan una fuerte inmunidad a la enfermedad, ya que en la exposición experimental de cerdos, cuatro meses después de la primoinfección no desarrollan neumonía, en comparación con los cerdos que no tuvieron primoinfección. Sin embargo, esta inmunidad es de corta duración ya que pueden desarrollar el proceso neumónico a los 11 meses después de una infección inducida (Ross, 1999).

1.8 Diagnóstico de la Neumonía Enzoótica.

El diagnóstico de la Neumonía Enzoótica en la mayoría de los casos se realiza observando lesiones macroscópicas e histopatológicas y aunque son características no son siempre específicas (Armstrong, 1982). En otras ocasiones, el diagnóstico se lleva a cabo en la granja en donde la piara presenta tos persistente, aunado a la presencia de cerca del 40% de lesiones macroscópicas cuando los cerdos llegan al rastro (Goodwin 1982). Sin embargo, para un diagnóstico definitivo se tienen que combinar aspectos como la historia clínica, signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas, identificación de *M. hyopneumoniae* por aislamiento o por técnicas inmunológicas y detección de anticuerpos contra este micoplasma (Ross, 1999).

La neumonía por micoplasma se diagnostica normalmente bajo condiciones prácticas, con base en la presencia de una neumonía crónica caracterizada por una tos no productiva y ausencia de fiebre, esta neumonía se caracteriza por una tos bien demarcada y explosiva. Además existen hallazgos histológicos que muestran neumonía intersticial, lo que finalmente produce crecimiento no uniforme, conversión alimenticia deficiente sin mortalidad. Sin embargo, estos signos y lesiones son solo indicativos y la confirmación requiere de pruebas de laboratorio para el diagnóstico confirmativo al introducir animales de otras piaras a una granja infectada. Las pruebas de laboratorio comprenden diferentes procedimientos. Entre las pruebas de laboratorio se cuentan el aislamiento, las pruebas de ELISA, Inmunofluorescencia y PCR. (Ross, 1990)

2. JUSTIFICACIÓN

La investigación sobre los factores que participan en la virulencia de *M. hyopneumoniae* están dirigidos principalmente a caracterizar la actividad patogénica de las porciones estructurales del microorganismo, específicamente las proteínas de la membrana. Sin embargo, consideramos que como consecuencia del metabolismo de la bacteria se generan un sin número de productos que pueden participar en la adaptación, multiplicación y virulencia. Este trabajo pretende caracterizar elementos proteicos excretados por *M. hyopneumoniae* durante sus fases de crecimiento y que pudieran estar involucrados en la respuesta inmune del cerdo.

3. HIPÓTESIS

Durante sus fases de crecimiento, *M. hyopneumoniae* produce y secreta proteínas del metabolismo al medio circundante que pudieran estar involucradas en la patogenia de enfermedad. Creemos que dentro de estos se encuentran elementos que funcionan como precursores o directamente como factores de virulencia.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

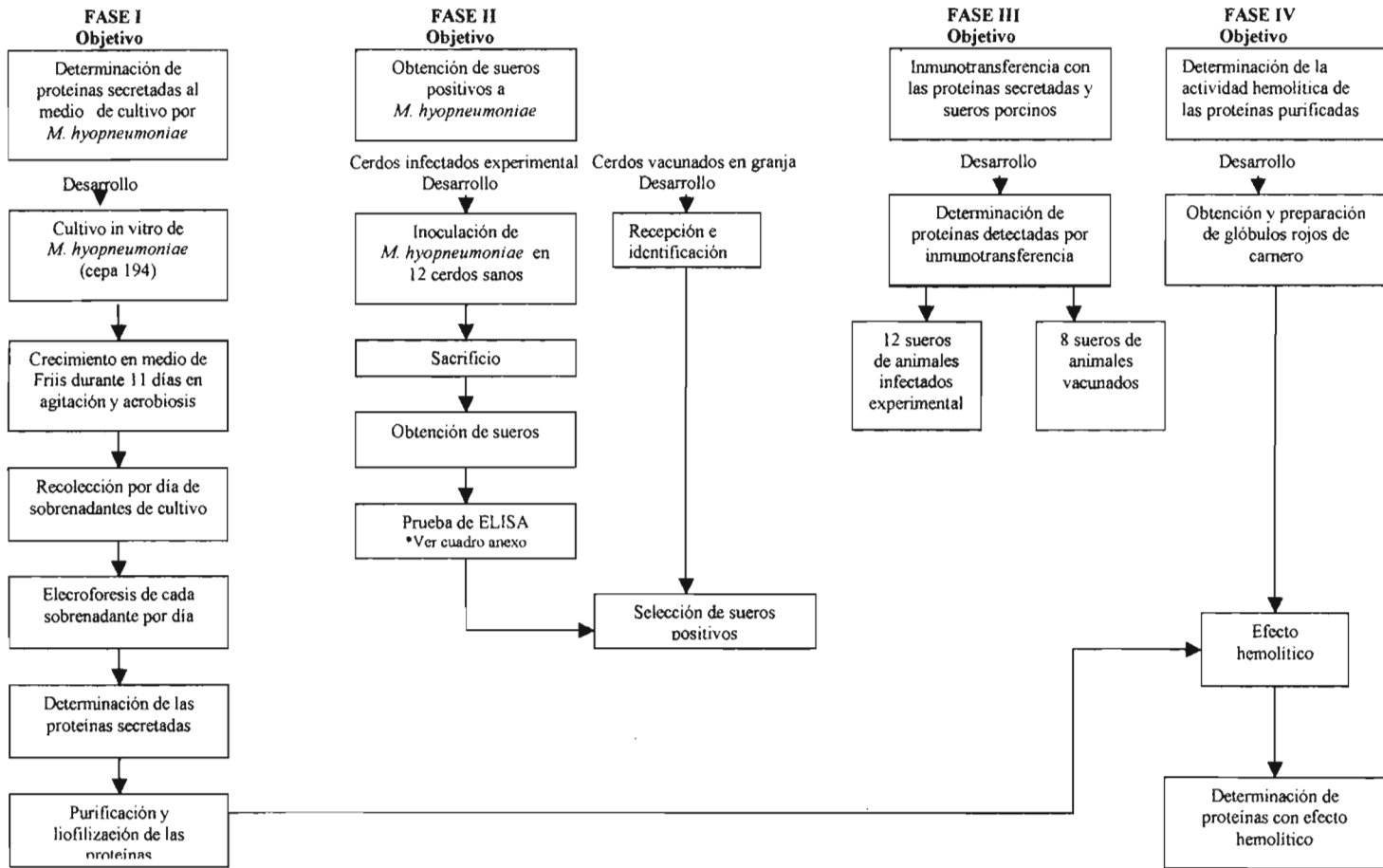
Aislar y purificar proteínas de sobrenadante de cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* .

4.2 Objetivos Particulares

- Cultivar la cepa de referencia 194 ATCC de *Mycoplasma hyopneumoniae* en medio líquido de Friis durante 11 días.
- Detección y purificación de proteínas de sobrenadante en el medio de Friis de *M. hyopneumoniae* de cada día de crecimiento, mediante la técnica de electroforesis.
- Detección de anticuerpos contra las proteínas de los sobrenadantes en animales infectados experimentalmente y vacunados utilizando la técnica de inmunotransferencia
- Determinación de proteínas con efecto hemolítico.

El diseño experimental se muestra en el siguiente diagrama.

FIGURA 1. DIAGRAMA DE DISEÑO EXPERIMENTAL



5. METODOLOGIA

FASE I

5.1 Determinación de proteínas secretadas al medio por *M. hyopneumoniae*

5.1.1 Cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae*

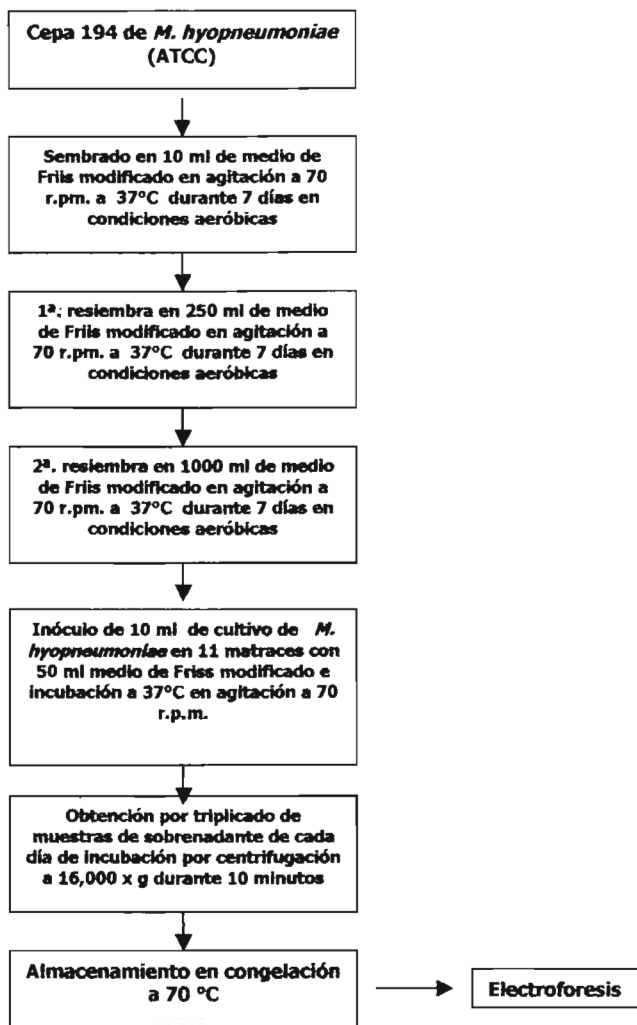
La cepa de *M. hyopneumoniae* utilizada para el desarrollo del presente trabajo es la cepa de referencia 194 donada amablemente por el Dr. Ross de Iowa State University.

5.1.2 Medio de cultivo para crecimiento de *M. hyopneumoniae*

El aislamiento primario se realizó en medio sólido de Friis utilizando de medio BHI (Difco), caldo PPLO (Difco, rojo de fenol al 2%, agar noble (Difco) y DNA (Sigma). Se ajustó el pH a 7 y se esterilizó en autoclave a 121° C a 15 lb durante 15 minutos. Se mantuvo en baño maría a 45 –50 ° C para agregar en forma aseptica los siguientes componentes: Solución balanceada de Hank's, extracto de levadura, suero inactivado de caballo, metilina y sulfato de kanamicina. Posteriormente se distribuyó en cajas de Petri de 10 cm de diámetro.

El medio líquido empleado fue el medio de Friis modificado, que se preparó a partir de medios basales comerciales: caldo PPLO (Difco) y caldo BHI (Difco). Se esterilizó en autoclave a 121 ° C, 15 libras de presión durante 15 minutos y se mantuvo posteriormente a una temperatura de 45 a 50 ° C en baño María. Después se adicionó en forma aseptica, suero estéril de caballo colectado en rastro, clarificado mediante la filtración con cartuchos Millipore "Lifeguard" CP-15 y esterilizado por filtración con membranas Millipore de 0.22 µm), extracto de levadura estéril e inhibidores. **Ver Apéndice #1**

Figura 2. OBTENCIÓN DE BIOMASA DE *M. hyopneumoniae*



	Día										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
No. de muestras de medio inoculado	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Control	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Total de muestras con inóculo de *M. hyopneumoniae* = 33

Total de muestras control sin inóculo = 11

Figura 2. Procedimiento utilizado para la obtención de biomasa de *M. hyopneumoniae* a partir de la cepa 194 ATCC (referencia)

5.1.3 Cultivo e identificación de *M. hyopneumoniae*

El cultivo de *M. hyopneumoniae* se realizó sembrando al microorganismo en medio de Friis sólido incubándose a 37° C durante 7 días en una atmósfera de CO² al 5%. Se realizó una selección de las colonias sospechosas. Se realizaron 2 pases en medio sólido para lograr su purificación y posteriormente se efectuaron las pruebas bioquímicas correspondientes para establecer su identificación. La cepa 194 de *M. hyopneumoniae* fue cultivada en 10 ml. de medio de Friis modificado e incubada durante 4 días a 37 ° C en agitación y condiciones aeróbicas. Posteriormente se resembraron 10 ml de cultivo en 250 ml. de medio de Friis modificado manteniendo las condiciones de tiempo, temperatura, agitación y aerobiosis. Después se realizó una segunda resiembra en 1000 ml. del medio mencionado anteriormente e incubándose por agitación a 37° C, 70 r.p.m. Durante 4 días, sin cambio en las condiciones de crecimiento en aerobiosis. Para la obtención de biomasa las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 16,000 x g y se inocularon 10 ml de pastilla bacteriana en 250 ml de medio de Friis incubándose a 37° C en agitación durante 4 días en aerobiosis. Después se tomó una alícuota para determinar la concentración de proteína por el método de Bradford. Posteriormente para lograr el cultivo final se resembraron 10 ml de medio inoculado con *M. hyopneumoniae* en 11 matraces conteniendo 50 ml de medio de Friis modificado incubando a 37° C en aerobiosis y agitación. Se colectaron muestras del sobrenadante de cada día realizando una centrifugación a 16,000 x g durante 10 minutos y se almacenándolos en viales estériles a -20 ° C.

5.1.4 Pruebas Bioquímicas en la caracterización de micoplasmas.

5.1.4.1 Prueba de dependencia de esteroides.

La prueba de dependencia de esteroides es un criterio que nos sirvió para determinar a la familia que pertenecen los microorganismos, es decir si es dependiente de esteroides pertenecerá a la familia *Mycoplasmataceae* y si no depende será *Acholeplasmataceae*. Para la realización de esta prueba se requirieron discos de papel filtro impregnados con .025 ml de una solución de digitonina al 1.5%, permitiendo su secado durante un día a 37° C y almacenándolos en refrigeración a 4° C. Posteriormente este se colocó sobre los cultivos de 7 días en medio sólido los cuales fueron sembrados con micoplasmas

sospechosos. La formación de un halo alrededor del disco sin crecimiento indicó la presencia de esteroides en la membrana celular, interpretado como zona de inhibición característico para especies de *Mycoplasma*. La falta de halo de inhibición nos indica la ausencia de esteroides en la membrana característico de especies de *Acholeplasma* (Fris, 1975).

5.1.4.2 Prueba de fermentación de los carbohidratos.

La prueba de fermentación de los carbohidratos nos fue útil para determinar la capacidad de degradar un determinado carbohidrato en un medio de cultivo líquido. Los carbohidratos analizados a través de la prueba de fermentación fueron: glucosa, fructosa, manosa, inositol y dulcitol. La concentración de los carbohidratos fue al 50% adicionando 1 ml de la solución a 70 ml de caldo PPLO, el cual contenía 10 ml de suero equino inactivado, extracto de levadura al 25% y 0.5 ml de rojo de fenol al 1%. Se inocularon 10 ml de cultivo de *M. hyopneumoniae* y se incubaron 37° C durante 5-7 días. Un cambio del medio a un color amarillo debido a la acidificación del medio nos indicó una reacción positiva (Boughton y Thoms, 1976).

5.1.4.3 Prueba de reducción del tetrazolio.

Esta prueba nos ayudó a determinar si el micoplasma es fermentativo o no, por la capacidad de reducir el colorante tetrazolio (cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio). Se realizó incubación a 37°C durante 5-7 días. La interpretación a dicha prueba fue la siguiente: Si existía formación de una mancha rosada en el agar que contiene tetrazolio a una concentración de 0.03%, sería positiva, si no había cambio de color sería negativa (Boughton y Thoms, 1976).

5.1.4.4 Prueba de hidrólisis de la arginina.

Esta prueba nos ayudó a medir la capacidad de descarboxilar el aminoácido L-arginina. Los micoplasmas aislados se sembraron en el medio conteniendo 5 ml de L-arginina HCl al 10% el cual contiene 70 ml de caldo PPLO, extracto de levadura al 25% y 20 ml de suero equino inactivado. Se incubaron a 37° C por 5-7 días. Una reacción color púrpura debido a la alcalinización de medio se daba como positiva (Boughton y Thoms, 1976).

5.1.4.5 Prueba de hidrólisis de la urea.

Esta prueba nos sirvió para detectar la capacidad de desdoblar a la urea en amoníaco. 10 ml de cultivo se incubó a 37° C durante 5-7 días en medio líquido con 1 g de urea y diluido en extracto de levadura, una reacción positiva nos daría una coloración púrpura debido a la alcalinización del medio (Boughton y Thoms, 1976).

5.1.4.6 Prueba de producción de peróxido de hidrógeno.

Esta prueba nos ayudó a determinar si este agente era capaz de producir peróxido de hidrógeno *in vitro* en medios de cultivo sólido a 37° C durante 5-7 días. En la prueba se utilizaron eritrocitos tipo O de humano y la presencia de la producción del peróxido se detectó por medio del daño que les causa. Los glóbulos rojos se mezclaron con azul de metileno. Una reacción positiva se manifestó cuando los eritrocitos que rodeaban a las colonias de micoplasmas se tiñeron de color azul (Roberts y Pijoan, 1977).

5.1.4.7 Pruebas serológicas en la identificación de los micoplasmas.

Se desarrollaron una serie de pruebas serológicas con la finalidad de confirmar la especie de micoplasma con la que se estaba trabajando. Las pruebas realizadas fueron la prueba de inhibición metabólica y la prueba de inhibición de crecimiento. Las dos primeras son muy similares ya que son pruebas de neutralización, la cuales se llevaron a cabo por medio de un antisuero homólogo, que ejerce una actividad inhibitoria. La diferencia básica es que la prueba de inhibición metabólica se realizó en medio líquido y la prueba de inhibición de crecimiento se realizó en un medio sólido. (Boughton y Thoms, 1976; Ciprián, 1987).

5.1.5 Electroforesis de las fracciones en geles de poliacrilamida con Dodecil-Sulfato De Sodio (SDS)

Para la preparación del gel de poliacrilamida al 7.5% y 12% con SDS y del gel concentrador al 5% según Laemmli (1970), así como de los reguladores de corrimiento y de la muestra con 2-mercaptoetanol. **Ver Apéndice # 2**

5.1.5.1 Preparación de los geles

La mezcla se vertió rápidamente a la cámara de electroforesis Modelo No. SE 250 Hoefer Scientific Instruments®, se colocó 1 ml de isopropanol sobre la superficie, cuando la gelificación se lleva a cabo se observa una interfase muy definida entre el isopropanol y el

gel, entonces se enjuaga y se escurre. Posteriormente se puso la mezcla para el gel concentrador adicionado con cuidado y rapidez, luego se colocó el peine, el cual se retiró cuando el gel se había polimerizado, quedando de esta forma los pozos bien definidos.

5.1.5.2 Preparación y corrimiento de muestras.

- Se colocó el volumen suficiente la muestra que contiene un mínimo de 20 μg de proteína en tubos Eppendorff bien etiquetados.
- Se agregó el mismo volumen de solución digestora, se mezcló y se colocó en baño maría durante 3 minutos.
- Se realiza una precorrida de 30 minutos a 25 mAmp.
- Posteriormente con la ayuda de una jeringa Hamilton o con puntas multifix de 20 μ (Sorenson), se colocó la mitad del volumen preparado de cada muestra en los carriles del gel de concentración.
- Junto con las muestras problemas, se colocó en un carril, una muestra de proteínas de pesos moleculares conocidos (SDS Molecular Weight Markers (MW-SDS-200), Anhidrasa Carbónica de 29 Kd; Ovoalbúmina de 45 Kd; Albúmina Bovina de 66 Kd; B-Galactosidasa de 116 Kd y Miosina de 205 Kd.), con el fin de tomarlas como referencia.
- Se corrió en una fuente de poder Mod. PS250/25 Amp Hoefer Scientific Instruments®.
- El corrimiento se realizó durante 30 a 45 minutos a 25 mAmp, hasta el momento en que el colorante que sirva de referencia llegue al final del gel de separación.

5.1.5.3 Tinción de geles de poliacrilamida-Dodecilsulfato de Sodio Page con Azul de Comassie R-250. Ver Apéndice # 3

Tinción De Geles.

Se colocó el gel en un recipiente con la solución teñidora durante 2-3 horas, con agitación lenta, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se sacó el gel con cuidado y se

coloca en la solución desteñidora I durante 2 horas. Posteriormente se transfirió a la solución desteñidora II hasta que las bandas se observan.

5.1.5.4 Tinción De Geles Con Nitrato De Plata (Hitchcock Y Brown, 1983; Tsai Y Frash, 1982).

1. Después de la electroforesis, se retiró el gel de poliacrilamida y se dejó fijando toda la noche con 200 ml por gel (isopropanol 24%/Ac. Acético 7%).
2. Después de 24 hrs. de fijación se realizó la oxidación con (150 ml. de agua desionizada + Ac. peryódico 1.05 g + 10 ml Et-OH 40% + Ac. acético 7% + 4ml de isopropanol a 25% v/v), durante 5 minutos con agitación lenta.
3. Se lavó 8 veces con agua desionizada (cada vez con 200 ml durante media hora cada una).
4. Se tiñó con (28 ml de NaOH 0.1 N + 0.9 de agua desionizada + 2.1 de NH₄OH al 70% en solución fría). + 5 ml gota a gota de AgNO₃ al 20%. + 115 ml de H₂O desionizada fría. Se mantiene 10 minutos a temperatura ambiente con agitación vigorosa.
5. Se lavó 4 veces con agua desionizada por 10 minutos cada vez.
6. Se reveló de 10 a 20 minutos con 250 ml de revelador, preparado con 50 mg de Ac. cítrico más 0.5 ml de formaldehído y se afora a un litro.
7. Posteriormente se observaron las bandas, se detiene la reacción durante 1 h sin agitación con la solución (200 ml de agua desionizada + 10 ml de ac. acético 7% v/v).
8. Se lavó con 200 ml de agua desionizada.
9. Conservar correctamente el gel en refrigeración.
10. Se midió el R_f (Movilidad relativa), para correlacionar los pesos moleculares, en base a la Ecuación de Regresión, que se obtuvo de los resultados.

5.1.5.5 Ecuación de la Movilidad Relativa

Distancia de la migración X Tamaño del gel antes de secar
de cada proteína.

$$\text{Movilidad relativa} = \frac{\text{Distancia de la migración de cada proteína.}}{\text{Tamaño del gel después de secarlo X Distancia de migración del frente del colorante}}$$

5.1.6 Purificación de proteínas

El proceso de purificación se inició con una primera cromatografía de exclusión molecular en DEAE Sepharosa. Para ello se inyectaron 5ml. de sobrenadante de medio de cultivo en una columna de 50 x 2.5 cm (Sigma) como fase estacionaria. La fase móvil fue un tampón Tris-HCl 100mM, pH 7.0 impulsada por una bomba peristáltica con un caudal de 30 – 40 ml/h, recogándose fracciones cada 6 minutos. Se determinó en que pico (absorbancia 280 nm) estaban presentes las principales proteínas sintetizadas como consecuencia del crecimiento de *M. hyopneumoniae* en la cinética de 11 días. Tras seleccionar las fracciones del pico correspondiente se realizó una segunda cromatografía de intercambio iónico inyectando todo el volumen de las fracciones seleccionadas en una columna 25 x 1.5 cm (Sigma) Sephacryl HR-300. Como fase móvil se utilizó tampón Tris-HCl, pH 7.8, empleando un caudal de 40 ml/h y recogiendo las fracciones cada 5 minutos. La elución de las proteínas se efectuó en gradiente operando a diferentes concentraciones del tampón: 300, 325, 500 mM. Se comprobó la pureza de las proteínas separadas con la realización de un corrimiento electroforético.

Finalmente se liofilizaron 50 ml de cada muestra para su posterior uso.

FASE II

5.2 Obtención de sueros positivos a *M. hyopneumoniae*

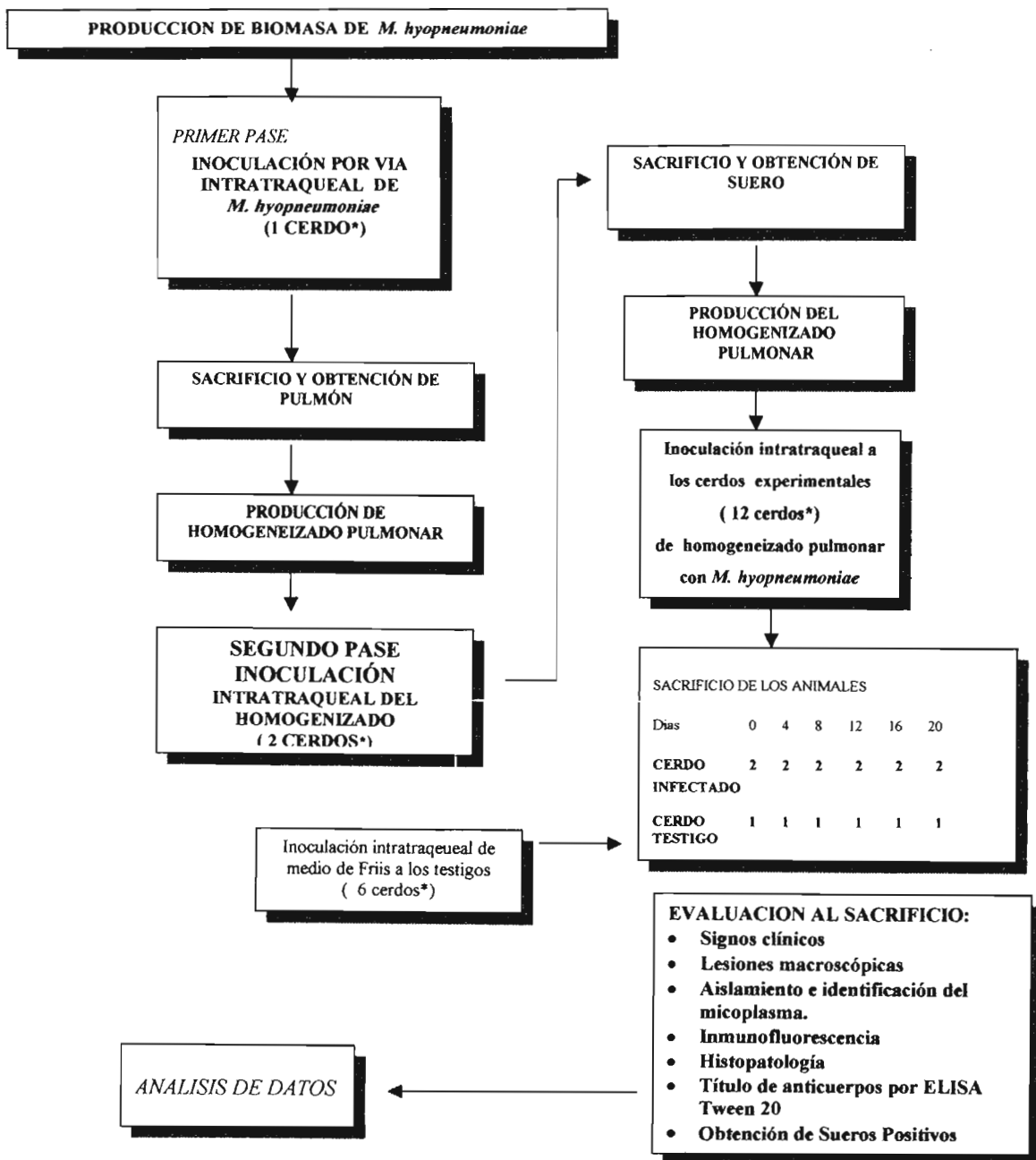
5.2.1 Obtención de sueros de granja de animales vacunados

Se obtuvieron 27 sueros positivos a *M. hyopneumoniae* que fueron donados amablemente por el Q.B.A. Abraham Massa de Laboratorio de Patología Animal de la S.A.R.H. en la Piedad, Michoacán, México. Estos sueros fueron evaluados previamente contra *M. hyopneumoniae* usando un kit comercial europeo (DAKO^R)

5.2.2 Obtención de sueros de animales infectados experimentalmente con la cepa 194 de *M. hyopneumoniae*

Para la obtención de sueros experimentales se realizó la inoculación de *M. hyopneumoniae* siguiendo el procedimiento mostrado en el Figura 2.

FIGURA 3. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE SUEROS POSITIVOS



SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Dias	0	4	8	12	16	20
CERDO INFECTADO	2	2	2	2	2	2
CERDO TESTIGO	1	1	1	1	1	1

5.2.2.1 Selección de cerdos libres de enfermedades respiratorias.

Se emplearon cerdos entre 4 y 6 semanas de edad de una granja ubicada en el Municipio de Zumpango, Estado de México, los cuales provenían de hembras de más de tres partos y/o de 2 años de edad. Los cerdos fueron negativos serológicamente a *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*.

Uno de estos cerdos se empleó para la obtención de pulmones negativos y suero para la elaboración del medio de Friis para la producción de biomasa de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

De esta granja se solicitaron 21 cerdos de 4 semanas de edad. Tres para la primera etapa de producción de homogeneizado y diesiocho para el desarrollo del trabajo final.

5.2.2.2 Producción de *M. hyopneumoniae* in vivo y homogeneizado pulmonar

El procedimiento de infección experimental consistió en inocular un lechón con una suspensión de 10 ml de *M. hyopneumoniae* cepa 194 ATCC, con un título de 10^4 UCC/ ml. (Unidades Cambiantes de Color / ml) por vía endotraqueal con una sonda nasofaríngea, para lo cual el cerdo fue previamente sedado con azoperona a razón de 2 mg/kg de peso por vía intramuscular y anestesiado con clorhidrato de metomidato a razón de 1.5 mg/kg de peso por vía intravenosa. Posteriormente el lechón se sacrificó cuando se presentaron signos clínicos de neumonía, en el día 20. Se obtuvieron asépticamente los pulmones, se tomaron muestras para la prueba de inmunofluorescencia, las cuales fueron embebidas en el crioprotector Tissue Tek y congeladas a -20 °C. A partir del suero se realizó la prueba de ELISA Tween 20. De las áreas neumónicas se preparó un homogeneizado pulmonar al 20 % (p/v) en medio de Friis. De este primer pase en cerdo se obtuvo el 1 % de lesión pulmonar y una reacción positiva a la prueba de inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa y reislamiento al día 20 post inoculación. A partir de esta lesión neumónica se preparó homogeneizado para efectuar un segundo pase inoculando a dos cerdos de la misma manera antes descrita y sacrificándolos a los 20 días.

En el segundo pase los dos cerdos resultaron positivos en la prueba de inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, reislamiento y ELISA, uno de ellos presentó un 4 % de lesión pulmonar y el otro aproximadamente 5 % a los 20 días. Con el

homogeneizado producido de este segundo pase se inocularon los 12 animales la etapa final.

5.2.2.3 Grupos experimentales y diseño experimental.

Se formaron seis grupos experimentales de tres cerdos, de 4 semanas de edad, dos de los cuales fueron inoculados y uno permaneció como testigo. Estos procedían de la granja libre de enfermedades respiratorias, en donde se reportó que no se realiza vacunación en contra de *M. hyopneumoniae*. La explotación está ubicada en el municipio de Zumpango, Estado de México. Los cerdos se mantuvieron en adaptación y observación durante una semana antes de iniciar el experimento. Los cerdos inoculados permanecieron aislados de los animales control, en el bioterio de la Unidad de Posgrado de la FES Cuautitlán (U.N.A.M.). Los grupos formados fueron sacrificados cada 4 días, del día 0 hasta el día 20 postinfección, siendo este el periodo aproximado de desarrollo de la enfermedad con el fin de determinar lesiones microscópicas, detección del micoplasma por inmunofluorescencia y cultivo, títulos de anticuerpo por la Prueba de ELISA Tween 20. Los grupos quedaron constituidos de la siguiente forma. Cada grupo estuvo integrado por 2 animales infectados y un control. El programa de sacrificio se realizó de la siguiente forma:

Grupo I, sacrificado el día 0, el Grupo II, el día 4, el Grupo III, el día 8, el Grupo IV, el día 12, el Grupo V, el día 16 y el Grupo VI, el día 20.

5.2.2.4 Inoculación de *M. hyopneumoniae*

A cada lechón del grupo inoculado se le administró una suspensión de 10 ml. de *M. hyopneumoniae* cepa 194, con un título de 10^4 UCC/ml por vía endotraqueal con una sonda nasofaríngea, para lo cual el cerdo fue previamente sedado con azaperona (2 mg/kg peso, vía intramuscular) y anestesiado con clorhidrato de metomidato (1.5 mg/kg de peso, vía intravenosa). A los cerdos control solo se les inoculó con 10 ml. de medio de Friis. El día de la inoculación se designó como el día 0. Estos lechones fueron observados diariamente y se les tomó la temperatura por vía rectal en la mañana y se observaron los signos respiratorios de tos y de disnea en agitación. (Ruiz, Alvaro 2002)

Se sacrificaron dos cerdos al azar cada cuatro días (día 0,4,8,12,16 y 20), mediante el uso de los mismos anestésicos antes mencionados y realizando el sangrado para

obtención de sueros. Los pulmones se obtuvieron asépticamente, tomándose muestras para la prueba de inmunofluorescencia, las cuales fueron embebidas en Tissue Tek. A partir del suero se realizó la prueba de ELISA Tween 20.

5.2.2.5 Evaluación de las lesiones macroscópicas.

Se midió la extensión de las lesiones mediante la técnica de planimetría, en donde se comparan con diagramas pulmonares normales, tanto de vista dorsal como ventral. Para ello se observó el pulmón de cada cerdo por sus dos vistas y se dibujaron en los diagramas las áreas afectadas, señalando la presencia de adherencias y aspecto de las lesiones. Posteriormente se sobrepuso el diagrama realizado a un pulmón cuadrículado en acetato y se contó el número de espacios del cuadrículado que representó cada lesión. Se calculó el promedio del área ocupada por las lesiones neumónicas tomando como base el porcentaje del área total del pulmón (Ciprián, 1988).

5.2.2.6 Evaluación de lesiones microscópicas

Para la detección de lesiones microscópicas se fijó con formalina al 10% tejido pulmonar representativo de las zonas de lesión y se incluyeron en parafina para la realización posterior de cortes de 6μ de espesor. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina para determinar el tipo de lesión.

5.2.2.7 Aislamiento de *M. hyopneumoniae*

Se tomó el pulmón de un cerdo con lesiones neumónicas y se esterilizó la parte afectada empleando una espátula calentada hasta llegar al rojo vivo, se cortó y retiró la parte esterilizada con pinzas y tijeras previamente esterilizadas por flama. Se cortó un trozo de pulmón de aproximadamente 1 g de peso y se colocó en un homogeneizador de tejidos Ten Broeck previamente esterilizado conteniendo 3 ml de medio de cultivo líquido de Friis estéril, y se homogeneizó hasta formar una suspensión. La suspensión se decantó en un tubo estéril de centrífuga y se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 10 minutos.. Se tomaron 0.3 ml del sobrenadante y se efectuaron diluciones logarítmicas hasta 10^{-5} en el medio de cultivo líquido. Los tubos conteniendo 2.7 ml se incubaron a 37 C durante una semana y se revisaron diariamente para observar un cambio de coloración a amarillo. Los tubos contaminados se desecharon. De los tubos inoculados no contaminados se tomó un

inóculo con el asa de platino y se sembró en medio sólido, estos subcultivos de muestras se realizó cada 5 días. Los medios sólidos inoculados se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante una semana, usando el método de velobiosis. Los medios sólidos se revisaron diariamente y las muestras contaminadas se desecharon. De las muestras en que se observó que había crecimiento de micoplasmas fueron separadas para efectuar una serie de subcultivos con la finalidad de mantener viables las cepas aisladas. Las muestras de medio líquido con crecimiento fueron congeladas a -70 C empleando un crioprotector. La metodología es la siguiente: Se toma 1 ml de cultivo de *M. hyopneumoniae* de 48 a 72 de incubación (fase logarítmica) y se adiciona dimetil sulfóxido (DMSO) al medio hasta alcanzar una concentración final de 1.5 M. Esto reduce la muerte celular durante el congelamiento a un grado mínimo . Para la identificación serológica se requirió de cultivos de micoplasmas puros, para ello se hicieron una serie de pases. Estos pases se realizaron tomando una colonia del medio sólido con una espátula u hoja de bisturí fina pasándola a medio líquido de Friis. Este proceso se repitió tantas veces como fue necesario para obtener las colonias puras.

5.2.2.7.1 Identificación inmunológica de *M. hyopneumoniae*

Prueba de inhibición de crecimiento (Growth- Inhibition Test GIT). Discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro fueron esterilizados en autoclave. Cada disco fue impregnado con una gota del antisuero específico de *Mycoplasma hyopneumoniae* elaborado en cerdo, se colocaron los discos en una caja de Petri estéril y se dejaron secar a 37 °C toda la noche. Después fueron almacenados en un frasco estéril y congelados a -70 °C hasta el momento de su uso.

Cajas conteniendo medio sólido de Friis fueron inoculadas con los cultivos de micoplasmas obtenidos del aislamiento de pulmón, empleando para ello hisopos y sembrando sobre la placa en tres direcciones tratando de obtener un crecimiento uniforme. Después el inóculo se dejó secar junto al mechero o incubando la caja a 37° C durante aproximadamente en aerobiosis 15 minutos. Al secarse la caja se colocaron los discos sobre la superficie del agar y la caja fue incubada por 7 días a 37° C en aerobiosis. Una zona de inhibición de crecimiento de 3 a 5 mm. de diámetro alrededor del disco se consideró una reacción positiva por efecto inmune (Friis and Jensen, 1984, Janson 1974, Kobish, 1982).

5.2.2.8 Determinación del título de anticuerpos por la prueba de ELISA Tween 20

La prueba se desarrollo utilizando el kit comercial Microwell ELISAmate for Peroxidase Conjugate. Se usó el antígeno de *M. hyopneumoniae* Tween 20

5.2.2.8.1 Aplicación del antígeno Tween 20

1. Se sensibilizaron las placas con 100 μ l de antígeno de *M. hyopneumoniae* Tween 20 usando una dilución de 1:30000 (20 ng/ml) durante una noche a 4° C en solución sensibilizadora.
2. Se retiró el antígeno excedente y se lavó.
3. Se bloqueó la placa con solución de albúmina sérica bovina a 1%, aplicando 300 μ l a cada pozo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Se retiró la solución bloqueadora y se lavó.

Aplicación del suero.

Las muestras fueron diluidas previamente 1:1000 con PBS y adicionadas a las placas.

1. Después de 1 hr. de incubación a temperatura ambiente se lavaron.

Aplicación del anticuerpo secundario.

1. Se adicionaron 100 μ l de un conjugado anti-IgG porcino de conejo marcado con peroxidasa (Sigma Immunochemicals) en dilución 1:2000
2. Después de 1 hr. De incubación se lavó la placa.
3. Se adicionaron 300 μ l de una solución de sustrato conteniendo ABTS (2,2 azino-diethylbenzothiazolin sulfona-6-3), sal de amonio y peróxido de hidrógeno.
4. Después de 15 minutos la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 3N
5. Las placas se leyeron a 405 nm de absorbancia.

FASE III

5.3 Inmunotransferencia con las proteínas secretadas y sueros positivos

5.3.1 Técnica de Electrotransferencia (Towbin, H. *Et Al.*, 1979; Wemvoort, G. 1989)

1. Posterior a la realización de la PAGE (Electroforesis en geles de poliacrilamida), se cortaron pedazos de papel de nitrocelulosa (Inmobilon-P Millipore Corporation, Bedford, MA.), de poro de 0.45 μm del tamaño del gel. Se debió usar guantes para evitar dejar huellas. Antes de usarse se sumergieron algunos segundos en metanol para activarlos.
3. También se cortaron 4 pedazos de igual tamaño de papel filtro por cada tira de Inmobilon-P.
4. En un recipiente se pusieron a humedecer con el amortiguador de transferencia (Tris 25 mM (pH 8.3), Glicina 0.192 M SDS 0.1%, Metanol 20%, SIGMA), las fibras (Scotch Brite).
5. Se tomó un "cassett" del aparato de electrotransferencia (TE 22 Mighty Small Transphor. Hoefer Scientific Instruments, san Francisco, CA).
6. El sistema se colocó de acuerdo al diagrama siguiente y posteriormente todo se cubrió con el amortiguador de transferencia (sistema:metanol-tris-glicina).



Figura 4. Colocación del Sistema de Electrotransferencia

Nota: Se tuvo cuidado de no formar burbujas entre el papel filtro y gel. Se puso una marca con lápiz en la orilla del papel filtro. Se cerró, quedando todo firmemente aprisionado.

7. Se colocó el "cassette" en la cámara de transferencia y se conectó a los electrodos de tal manera que el cátodo este del lado del gel.

8. Se conectó al sistema de la fuente de poder EC-135 E-C Apparatus Corporation. St. Petesburg, Florida®. La transferencia se realizó a 30 V, voltaje donstante durante 1.6 horas con agitación constante (PCM-Agitador magnético) y reflujo de agua fría.

9. Al término de la transferencia se procesó para detectar las proteínas transferidas. Se cortó el pedazo donde se corrieron los marcadores para garantizar la electrotransferencia tiñendo con negro amido. **Ver Apéndice # 4**

10. Se sumergió el pedazo del papel de nitrocelulosa en esta solución, durante 5 minutos; posteriormente se lavó con agua destilada durante 1 minutos y se lavaron con las dos soluciones desteñidoras que se utilizan en el proceso de PAGE, finalmente se observaron las bandas presentes.

11. Cuando no fue posible realizar inmediatamente la inmunotransferencia, las membranas de nitrocelulosa se guardaban en PBS a 4 ° C, o se enjuagaban con agua desionizada y se almacenaban ya secas a -20 °C.

5.3.2 Técnica de Inmunotransferencia (Western blot) (Towbin, H. *ET AL.* 1979; Wamvoort, G. 1989). **Ver Apéndice # 5**

Procedimiento

1. Aplicación Antígeno

- a) Se adicionaron 400 µl de solución "coating" a cada carril.
- b) Se incubaron durante 1 hr. a temperatura ambiente, con agitación suave.
- c) Posteriormente se vaciaron las placas y se sacudieron sobre una toalla, tratando de que quedaran lo más seco posible.
- d) Se adicionaron 400 µl de solución bloqueadora/BSA (preparada en el momento).
- e) Se esperó la reacción durante 5 minutos, se vació la solución y sacudió sobre una toalla.

2. Tablero de ajedrez

El suero problema y anti-anticuerpo IgG peroxidado tuvieron que ser probados y estandarizados para localizar su concentración óptima para trabajar la técnica de inmunotransferencia.

3. Reacción del Primer Anticuerpo

- a) Se le adicionaron 400 µl del suero problema (Título 1:25) detectando por medio del tablero de ajedrez.
- b) Se permitió la reacción durante una hora, a temperatura ambiente con agitación suave.
- c) Posteriormente se vaciaron las placas y se sacudieron sobre una toalla, tratando que quedaran lo más secas posible.
- d) Se llevó a cabo el proceso de lavado.
 - d.1. Se llenaron los carriles o tubos con 400 µl de la solución para el lavado.
 - d.2. Se vaciaron y se sacudieron.
 - d.3. Se repitió esta operación 5 veces.
 - d.4. Se volvió a sacudir sobre una toalla.

4. Solución de anticuerpo secundario, marcado.

- a) Se adicionaron 400 µl de la solución preparada del anticuerpo secundario marcado (anti-IgG*-SIGMA-Chemical), a una dilución 1:200 con solución de Skim Milk al 1%.
 - b) Se dejaron reaccionar durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave.
 - c) Posteriormente se vaciaron las placas y se sacudieron sobre una toalla tratando que quedaran lo más secas posible.
 - d) Se llevó a cabo el proceso de lavado, mencionado anteriormente.
 - e) El último lavado se dejó durante 5 minutos y posteriormente se desechó el líquido y se secaron las placas.
4. Reacción del Substrato.
- a) Se depositaron 400 µl de la solución de substrato en cada carril o tubo.
 - b) Se permitió la reacción durante 20 minutos a 1 hora, hasta que se observó el desarrollo del color.
 - c) "Opcional": Si se deseaba parar la reacción se debía usar 100 µl de la solución "STOP" en cada carril o tubo.
 - d) Lectura de las bandas que se observaron.

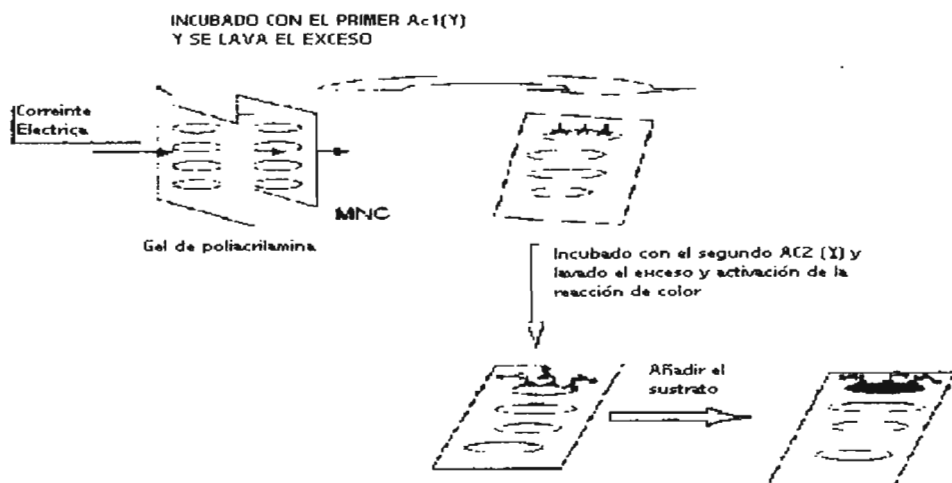


Figura 5. Técnica de electrotransferencia e inmunotransferencia de proteínas

FASE IV

5.4 Determinación de la actividad hemolítica de las proteínas purificadas

5.4.1 Prueba de Hemólisis

Se han reportado algunos factores de virulencia de *M. hyopneumoniae* que funcionan como inductores de citopatogenicidad sobre las células epiteliales. Entre ellos se han mencionado fosfolipasas, proteínas de membrana, ATPasas y sistemas de peróxidos y superoóxido. Conociendo que existe la presencia de estos factores en la estructura bacteriana, se decidió evaluar la capacidad de las proteínas excretadas por *M. hyopneumoniae* en la cinética de crecimiento de 11 días y su posible participación en el

daño celular causado a nivel pulmonar, buscando la presencia de factores de virulencia no considerados hasta ahora. Para ello se probaron todas las proteínas obtenidas en presencia de glóbulos rojos de carnero, usando la concentración estandarizada descrita a continuación en la metodología.

Se realizó la colección de sangre de carnero a partir de la vena yugular. La sangre extraída se colectó en un matraz que contenía citrato como anticoagulante en una relación 1:10. Se procedió a la separación del plasma mediante centrifugación, eliminándose el sobrenadante con una pipeta Pasteur. Los eritrocitos fueron lavados cuatro veces en solución tamponada de fosfato (PBS) a pH 7. Posteriormente los glóbulos rojos se resuspendieron en PBS a razón de 8×10^9 glóbulos/ml.

Mientras tanto las proteínas liofilizadas fueron rehidratadas en una solución de PBS a un pH de 7 para obtener el rango de concentración $3 \mu\text{g/ml}$, manteniendo las constantes de osmolaridad y garantizar una relación dosis-respuesta de hemólisis.

Se agregaron $25 \mu\text{l}$ de la suspensión de glóbulos rojos hasta completar $100 \mu\text{l}$ en proporción 1:40 (v/v) en placas de 96 pozos y se incubaron durante 10 minutos en agitación constante a temperatura ambiente.

Finalizada la incubación, se centrifugaron las muestras a $2,000 \times g$ durante 10 minutos. Se midió la absorbancia a 280 nm contra una solución blanco, la cual contenía solamente las proteínas diluidas en PBS.

La hemólisis espontánea fue determinada añadiendo la suspensión de glóbulos rojos a PBS, mientras que se añadió agua destilada para producir hemólisis osmótica de todos los glóbulos rojos, en ambos casos la proporción fue de 1:40. Todas las soluciones se trabajaron a un pH de 7.4, manteniéndose como constante durante toda la prueba.

Se evaluó el efecto de los 17 antígenos purificados obtenidos de la elución sobre los glóbulos rojos de carnero. Las fracciones evaluadas fueron las proteínas de peso molecular 166, 127, 111, 102, 79, 78, 69, 63, 62, 57, 52, 50, 38, 27, 23, 22 y 19 Kd.

6. RESULTADOS

FASE I. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SECRETADAS AL MEDIO DE CULTIVO POR *M. hyopneumoniae*

6.1 Determinación de proteínas de secreción por electroforesis

El resultado del crecimiento de *M. hyopneumoniae* en una cinética de 11 días mostró que una gran cantidad de proteínas son vertidas al medio de cultivo como resultado del metabolismo del microorganismo. Como es posible observar en la Tabla 1, existe la presencia de proteínas contenidas en el medio de cultivo y que fueron determinadas con la finalidad de evitar confusiones durante la detección de proteínas que serían vertidas al medio de cultivo como parte del metabolismo de *M. hyopneumoniae*. Estas proteínas del medio de cultivo funcionan como nutrientes durante el desarrollo de *M. hyopneumoniae* durante su crecimiento en la cinética de 11 días. Dichas proteínas fueron determinadas y consideradas a la hora de la evaluación de las proteínas generadas por *M. hyopneumoniae*.

228,650	101,090
213,142	96,356
209,840	92,118
206,918	90,308
204,927	89,683
201,942	88,817
199,614	87,297
190,963	85,965
186,723	84,781
184,323	84,639
178,278	82,347
176,887	81,939
162,442	80,946
155,095	74,346
143,021	73,753
141,318	68,130
138,066	65,305
134,896	59,423
132,062	58,308
130,932	45,704
128,954	44,258
125,834	42,991
124,018	39,736
123,282	36,426
122,941	34,366
120,019	31,996
117,121	30,521
115,390	18,126
108,000	16,134
107,784	12,095
104,490	10,096
103,049	

Tabla 1. Presencia de proteínas del medio de cultivo sin inóculo de *M. hyopneumoniae*. Peso molecular mostrado en daltons

A través de la técnica de electroforesis SDS-PAGE se logró identificación de las proteínas que se generaron *in vitro* durante la cinética de crecimiento en 11 días y que pudieran ser de relevancia durante la patogenia de la enfermedad.

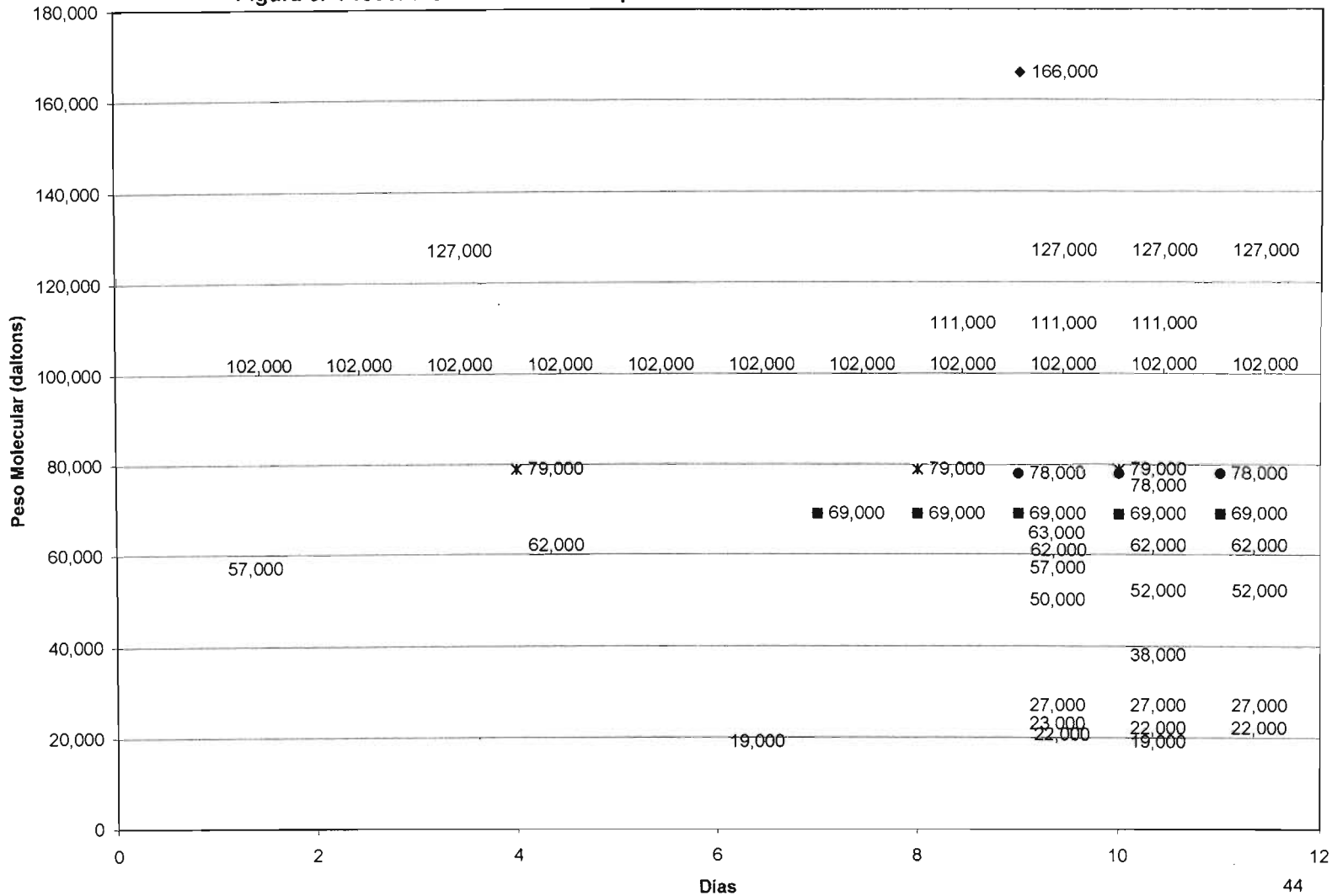
El metabolismo de *M. hyopneumoniae* mostró una gran actividad evidenciándose por la aparición de proteínas al medio de cultivo. Como se puede observar en la Tabla 2, el microorganismo exportó estos productos proteicos desde el primer día de la evaluación. A medida que la prueba se desarrollo, el número de proteínas vertidas al medio se incrementó alcanzando su pico máximo a los nueve días. Tras la repetición en tres ocasiones de los corrimientos, se determinó que las proteínas que se observaban con regularidad, así como su frecuencia se encontraban en el rango de 19 Kd a 166 Kd.

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
P.M. (Daltons)											
166,000									x		
127,000			x						x	x	x
111,000								x	x	x	
102,000	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
79,000				x				x		x	
78,000									x	x	x
69,000							x	x	x	x	x
63,000									x		
62,000				x					x	x	x
57,000	x								x		
52,000										x	x
50,000									x		
38,000										x	
27,000									x	x	x
23,000									x		
22,000									x	x	x
19,000						x				x	

Tabla 2. Proteínas de sobrenadante de cultivo de *M. hyopneumoniae* cepa 194 de referencia. La tabla muestra los días de presentación de las proteínas, así como sus pesos moleculares.

Algunas proteínas presentaron tiempos de vida muy corta, desapareciendo en el siguiente día. Sin embargo, hubo la aparición de proteínas con un tiempo más prolongado de permanencia en el medio. Los rangos de proteínas presentadas fluctúan desde los 19 kd y con un máximo de 166 kd. La dinámica de presencia y desaparición de las proteínas se muestra en la Figura 6.

Figura 6. Presentación de Proteínas por día en la Cinética de Crecimiento de 11 días



En esta secuencia es posible observar la forma en que se generaban proteínas diariamente.

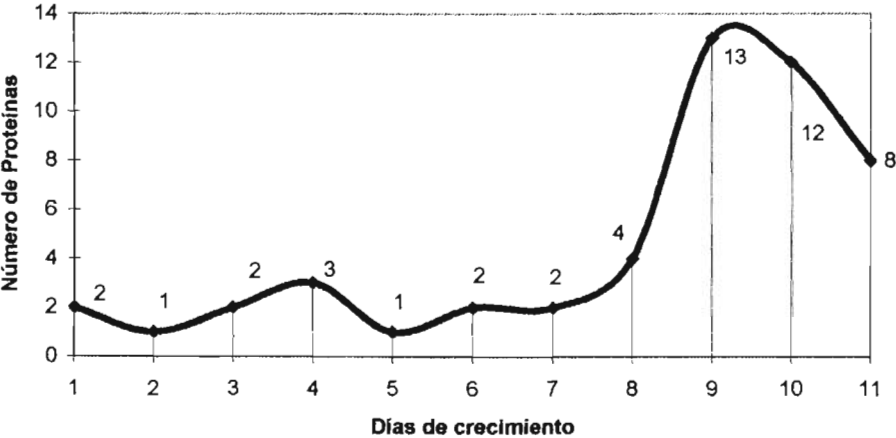


Figura 7. Número de proteínas por día observadas por la técnica de electroforesis en la cinética de crecimiento durante 11 días con *M. hyopneumoniae*.

Como se observó en la figura anterior la cinética de crecimiento mostró que el día 9 es el día más productivo en relación a la dinámica de generación de proteínas de exportación. Las proteínas se observan en la Figura 8. Esto determinó la selección del sobrenadante que se utilizó para realizar la inmunotransferencia y su desafío ante los sueros de animales inoculados experimentalmente y de animales vacunados.

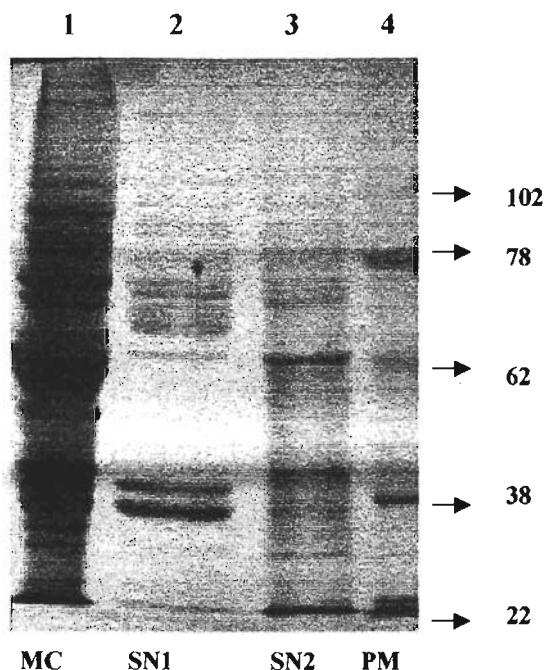


Figura 8. Carril 2 y 3 Detección de proteínas por electroforesis mostrando proteínas generadas el día 9 y 10 respectivamente por *M. hyopneumoniae* durante la cinética de 11 días de crecimiento. Se evidenció el mayor número de proteínas exportadas al medio de cultivo ocurrió en el día 9. El carril 1 muestra las bandas que evidencian las proteínas contenidas en el medio de cultivo antes de la inoculación de *M. hyopneumoniae*. El carril 4 muestra el peso molecular standard.

Durante los días 9, 10 y 11 de la cinética de crecimiento se detectó la presencia de una proteína de 22 Kd, la cual tuvo una gran significancia cuando se realizó la determinación de reactividad con sueros de animales vacunados. Figura 9

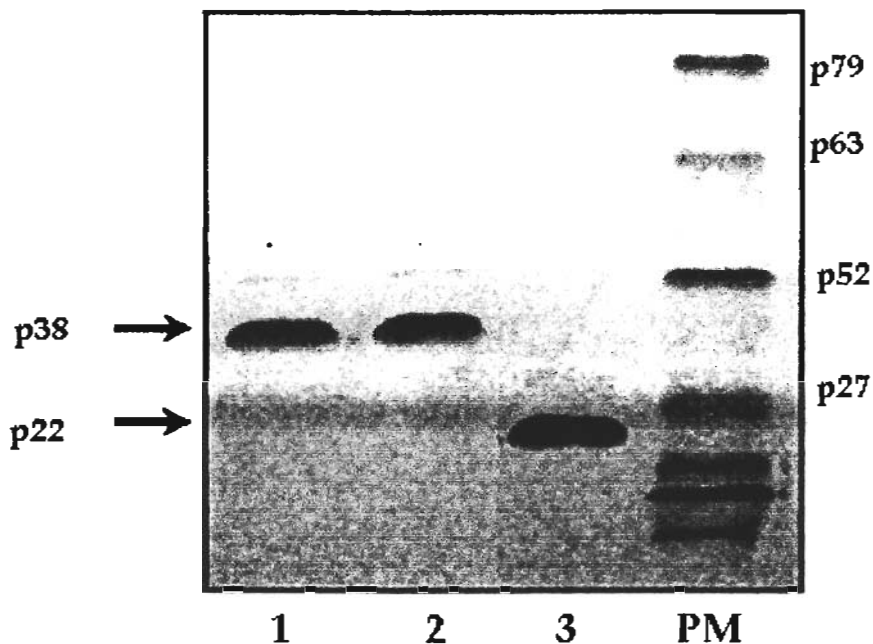


Figura 9. Después de 9 días de crecimiento se hizo evidente la aparición de la proteína de 22kD. Esta se mantuvo presente hasta el día 11 de la evaluación. Esta proteína presentó reactividad específica contra sueros de animales vacunados en contra *M. hyopneumoniae*

FASE II. OBTENCIÓN DE SUEROS POSITIVOS A NEUMONÍA ENZOÓTICA

6.2 Evaluación postmortem de los cerdos infectados experimentalmente con *M. hyopneumoniae* y control

Los 6 cerdos control que fueron inoculados solamente con medio de Friis y sacrificados en los días 1-20 resultaron negativos para todas las pruebas.

En la siguiente tabla se puede observar el resumen las lesiones macroscópicas expresadas en porcentaje, lesiones microscópicas indicando infiltración linfocitaria peribronquial, aislamiento de *M. hyopneumoniae* y Prueba de Inmunofluorescencia.

Días de sacrificio	1	4	8	12	16	20
Cerdos inoculados	2	2	2	2	2	2
Lesiones macroscópicas	0	2.4	7.4	8.1	13.3	17.2
Lesiones microscópicas	+	+	+	+	+	+
Aislamiento de <i>M. hyopneumoniae</i>	-	10⁻³	10⁻³	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁴
Inmunofluorescencia	-	+	+	+	+	+

Tabla3. Resultados de las lesiones microscópicas, macroscópicas, aislamiento e inmunofluorescencia de los animales infectados experimentalmente.

6.2.1 Resultados de la prueba de ELISA

Día	# Cerdo	Título
0	1	a. 1:16 b. 1:16
4	2	a. 1:128 b. 1:128
8	3	a. 1:128 b. 1:128
12	4	a. *1:3144 b. *1:2096
16	5	a. *1:2096 b. *1:2096
20	6	a. *1:2096 b. *1:4012

Tabla 4. Resultados de la prueba de ELISA realizada a los cerdos inoculados experimentalmente
*Para la prueba de inmunotransferencia se usaron los sueros que mostraron mayor título, referidos como los sueros de los cerdos a y b del grupo 4, 5 y 6

FASE III. INMUNOTRANSFERENCIA CON PROTEINAS SECRETADAS Y SUEROS PORCINOS

6.3 Inmunotransferencia

La inmunotransferencia mostró que seis componentes antigénicos fueron reconocidos por los sueros de *M. hyopneumoniae* provenientes de animales infectados en forma experimental. Los pesos moleculares de estos seis antígenos fueron calculados en 102, 79, 69, 63, 57 y 52 kd y su reactividad se observa en la Figura 10.

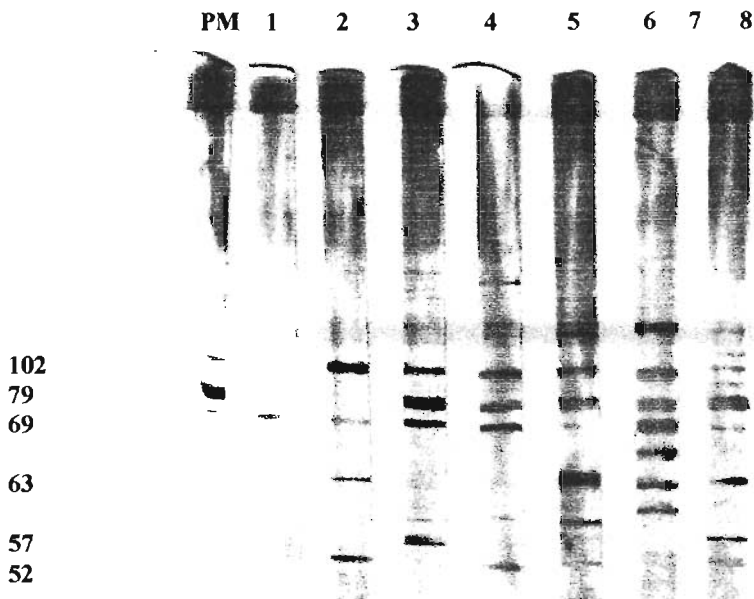


Figura 10. Perfiles de inmunotransferencia de sueros de animales infectados experimentalmente, después de la separación de proteínas a través de la electroforesis SDS-PAGE.

Cuando los antígenos de sobrenadante fueron desafiados con los sueros de animales vacunados se mostró que estos reaccionaron básicamente con las mismas proteínas que los cerdos infectados experimentalmente como se observa en la Figura 11. Sin embargo, la proteína 22 kd mostró una notoria reactividad positiva en contra de 20 sueros de los 27 de animales vacunados probados. Tras la purificación de la proteína en Sephacryl HR- 300

(Ver Figura 12.), se realizó un nuevo desafío utilizando otros 8 sueros de animales vacunados, siendo su reacción del 100% como se denota en la Figura13.

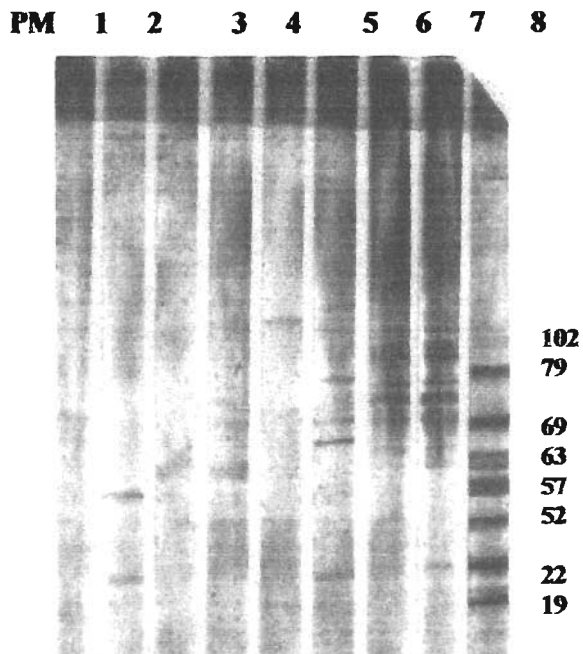
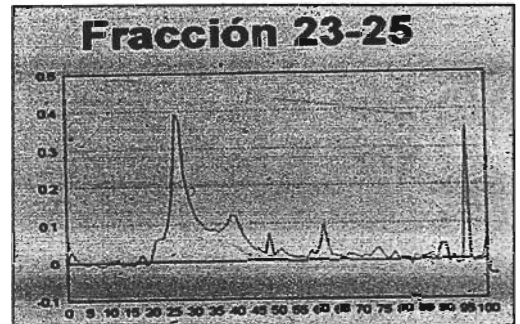
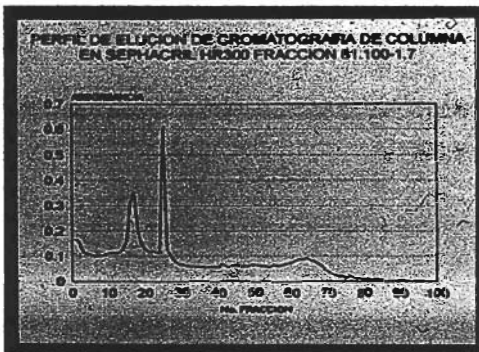
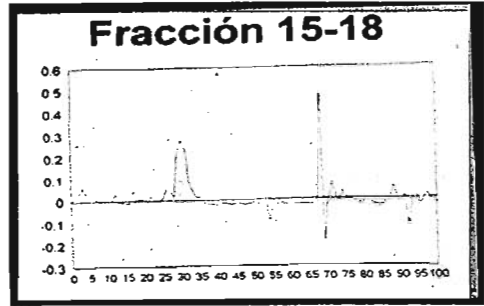
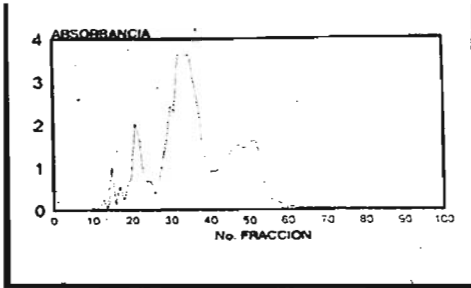


Figura 11. Reactividad de que la proteína 22 Kd con los sueros de animales vacunados se observa como un hallazgo de interés.



Figuras 12. Elución de proteínas de sobrenadante del medio de cultivo de *M. hyopneumoniae* en Sephacryl HR-300 usando el sobrenadante del día 9. Obtención de las proteínas más representativas a partir de los picos más altos de producción mostrados en los gráficos. Después de su purificación se utilizaron en la prueba de hemólisis.

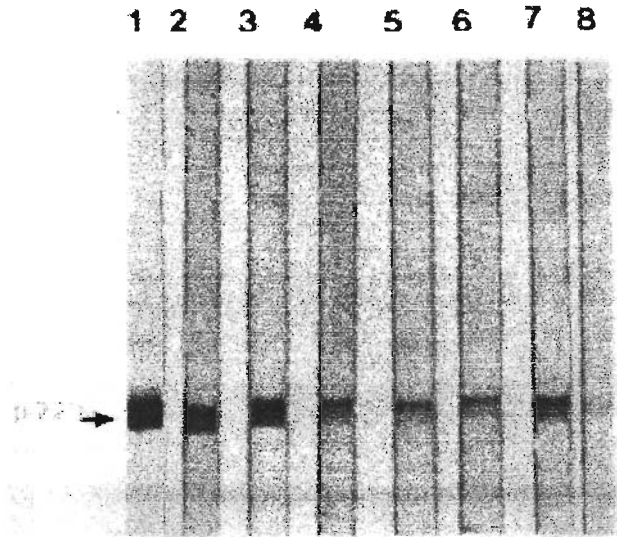


Figura 13. La proteína 22 Kd purificada fue desafiada contra siete sueros de animales vacunados para constatar su intensa reactividad. Tirilla 1-7, detección de reactividad positiva. La tirilla 8 muestra el suero de cerdo número 6 b. infectado experimentalmente presentando una reacción negativa.

FASE IV. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LAS PROTEINAS

6.4 Prueba de hemólisis

En los resultados de la prueba de hemólisis evaluando las 17 proteínas purificadas en la elución final, solo tres de los antígenos probados mostraron efecto hemolítico, siendo las proteínas de 102, 79, 57 Kd. El efecto hemolítico se determinó evaluando la turbidez de la suspensión en relación a los blancos. Sin embargo, fue evidente el efecto que pudo observarse a simple vista.

7. DISCUSIÓN

Los mecanismos de patogenicidad de *M. hyopneumoniae* no han sido determinados en su totalidad. Las investigaciones para determinar que elementos están involucrados en el proceso infeccioso se han enfocado básicamente sobre las estructuras que conforman la membrana celular (Wise, S.K., 1987, Klinkert, M., 1985) y la cápsula (Tajima, M., 1982)

Se ha realizado una extensa investigación sobre los antígenos que pueden generar una respuesta inmunológica por parte del hospedador, mostrando la existencia de antígenos de origen proteico, glicolipídico y polisacárido. (Tirón, 1992). Sin embargo el mayor énfasis de investigación se ha centralizado sobre las proteínas de membrana.

Han sido investigadas algunas de estas proteínas constitutivas de la membrana que mostraron reactividad humoral específica. Se han tenido grandes avances en relación a la determinación de proteínas de membrana, encontrando aún antígenos comunes entre especies como son las proteínas 110, 64, 50, 41 y 36 kd observadas en *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare* y *M. hyorhinis* (Young y Ross, 1977). También se han logrado establecer algunas fracciones proteicas vinculadas a la invasividad de *M. hyopneumoniae* a los cilios bronquiales como la proteína 97 kd. (Young et al, 1990). Asimismo, se han detectado proteínas vinculadas con el daño celular provocado al tejido pulmonar durante la infección como son las proteínas 33, 47, 53 kd (Strasser et al, 1992) y 54 kd (Geary y Walczak, 1985). Se han logrado establecer proteínas que inmunológicamente hablando ayudarían al desarrollo de biológicos para la prevención de la enfermedad, por su gran capacidad antigénica como son las lipoproteínas 65, 50 y 44 kd (Tacker, 1988)

La mayoría de los estudios realizados sobre la antigenicidad y patogenia se han centralizado sobre los antígenos estructurales de *M. hyopneumoniae*, olvidando el efecto de factores propios del metabolismo como parte del proceso de patogenicidad del microorganismo.

Este trabajo mostró que existen proteínas que son vertidas al medio y que pudieran formar parte importante durante el proceso de infección de *M. hyopneumoniae*.

Como se observó en la Tabla 1, es posible determinar la producción de proteínas que fueron liberadas al medio de cultivo durante el crecimiento de *M. hyopneumoniae* en una cinética de 11 días. Estas proteínas fueron determinadas por medio de la técnica de electroforesis y tinción con nitrato de plata. Las proteínas que fueron detectadas durante

el desarrollo de este trabajo no han sido reportadas hasta el momento. La forma de aparición de las proteínas durante la cinética de crecimiento in vitro hace palpable que el microorganismo requiere un tiempo de adaptación antes de iniciar con mayor producción de proteínas, extendiéndose hasta el día 9 en donde alcanza su pico máximo. Esta determinación abre la posibilidad de un estudio con un enfoque diferente de investigación para establecer antígenos que pueden participar directamente durante el establecimiento de *M. hyopneumoniae*, así como en el proceso patológico observado en la Neumonía Enzoótica.

Cuando se analizó la respuesta inmune de los sueros de animales que fueron inoculados experimentalmente por vía intramuscular con *M. hyopneumoniae*, fue posible observar a través de la técnica de inmunotransferencia una reactividad en contra de proteínas de membrana tales como 96, 76, 70, 53, 46, 38 kd ^(Y. Mori, 1988) y 110, 64, 50, 41, 36 kd ^(Young and Ross, 1987.)

Sin embargo, la simple aparición de las proteínas no garantiza por si sola la importancia de estas en la respuesta inmune. Tras la realización de una inmunotransferencia con sobrenadante del día 9 se desafió su reactividad contra de sueros de animales infectados experimentalmente, así como animales vacunados. La respuesta que mostraron los sueros de animales infectados en forma experimental reaccionaron contra las proteínas 102, 79, 69, 63, 57 y 52 kd. Debido a su reactividad manifiesta, estas proteínas se convierten en prospectos serios para ser evaluados para su uso como antígenos en el desafío del sistema inmune de los cerdos. Dada la respuesta observada, cabe la posibilidad de un desafío utilizando los antígenos estructurales de *M. hyopneumoniae* en adición a estas proteínas de secreción buscando ampliar la protección en contra de la enfermedad.

El hallazgo de antígenos específicos que no presentan reacciones cruzadas con otras especies es de suma relevancia, ya que pueden ser utilizados como antígeno específico durante el diagnóstico. Antígenos reportados como la proteína de 64 kd de *M. hyopneumoniae* usando la cepa ATCC, es un claro ejemplo de esta especificidad. ^{(Young y Ross, 1987).}

En el presente trabajo los perfiles de inmunotransferencia de la respuesta inmune de los animales vacunados mostraron una reactividad similar en cuanto a las proteínas 102, 79, 69, 63, 57 y 52 kd, con los animales infectados experimental. Sin embargo, se observó

una fuerte reacción de los sueros de estos animales vacunados en contra de la proteína 22kD. El resultado mostró reactividad en 20 de los 27 sueros de animales vacunados. Tras su purificación, la proteína 22 kd mostró nuevamente una reactividad marcada en contra 7 sueros desafiados, dando una reactividad de 100%. Esto sugiere que existe una diferencia en la respuesta inmune cuando se trata de animales expuestos al microorganismo a través de la inoculación de un biológico comercial y cuando se trata de animales infectados. Esto puede definitivamente ayudar en la identificación de anticuerpos provenientes de animales vacunados, diferenciando las respuestas inmunes durante el desarrollo de los procesos infecciosos, facilitando así la interpretación durante el diagnóstico serológico.

Existen reportes acerca de procesos bioquímicos de los micoplasmas patógenos que generan citotoxicidad y están identificados en forma general como el efecto de las proteínas de la membrana plasmática (Geary, J., 1985), fosfolipasas (Bejar, R., 1981) y ATPs (Minino, C. 1993). El estudio de *M. pneumoniae* ha permitido determinar otros mecanismos de citotoxicidad definidos como hemolisinas no proteicas de bajo peso molecular y sistemas peróxido y superóxido (Somerson N. L., 1965).

Durante el presente estudio fue posible purificar 3 proteínas que mostraron un efecto hemolítico para glóbulos rojos de camero. Esto sugiere que existe una acción directa de estas proteínas sobre la estructura celular durante la infección con *M. hyopneumoniae*. Ya que esta característica solo se demostró únicamente en tres del total de las proteínas evaluadas y que son las proteínas p102, p79 y p57 detectadas durante la cinética de 11 días de crecimiento. Cabe denotar que la proteína 102 kd se detectó desde el primer día de cultivo, lo que nos sugiere la posibilidad de su participación durante la adaptación del microorganismo al nuevo medio ambiente y posiblemente su participación dentro de la capacidad patogénica mostrada por *M. hyopneumoniae*. Las proteínas de 57 kd y 79 kd se detectan también en la etapa inicial de crecimiento, desapareciendo en el segundo día y apareciendo en el 8º, 10º y 9º días respectivamente, siendo esta etapa en donde se observó la mayor actividad metabólica por parte de *M. hyopneumoniae*. Existe entonces la posibilidad de una relación directa entre la presencia de estas proteínas de secreción y el daño tisular observado en el parénquima pulmonar, esto de acuerdo con el efecto observado sobre los glóbulos rojos de camero durante este desafío.

Existen varias implicaciones a partir de los resultados observados en el presente trabajo. El proceso de adaptación, establecimiento y crecimiento de la bacteria, es un proceso

dinámico, este genera los elementos necesarios para que esto se lleve a cabo de una manera adecuada. La secreción de proteínas al medio de cultivo podrían ser el resultado del mecanismo de invasión y establecimiento del microorganismo in vitro, más que productos de desecho del metabolismo de la bacteria, ya se ha demostrado que inducen una respuesta por parte de sistema inmune del hospedador. Además, fue posible detectar un efecto de algunas de estas proteínas de exportación sobre la estructura celular de los glóbulos rojos de carnero. Este efecto sugiere un mecanismo diseñado para generar daño al tejido bronquial, posiblemente como una forma de obtención de nutrientes, una forma de facilitar la invasividad o la respuesta ante el ataque del sistema inmune celular o humoral. La posibilidad de que el daño observado sea una sinergia entre el efecto de la liberación de las proteínas de *M. hyopneumoniae* y la respuesta por parte del sistema inmune en relación a la presencia de la bacteria es una consideración para analizar dentro de la patogenia de la enfermedad.

8. CONCLUSIONES

1. *M. hyopneumoniae* es capaz de liberar un gran número de proteínas de secreción al medio de cultivo.

Las 17 proteínas observadas durante la cinética de 11 días fueron las siguientes de acuerdo a su peso molecular: 166, 127, 111, 102, 79, 78, 69, 63, 62, 57, 52, 50, 38, 27, 23, 22 y 19 kd.

2. La inmunotransferencia mostró reactividad de los sueros de cerdos inoculados experimentalmente a las proteínas secretas de peso molecular 102, 79, 69, 63, 57, 52 kd
3. Sueros de animales vacunados detectaron las mismas proteínas que los animales infectados experimentalmente, pero predominantemente los animales vacunados mostraron reactividad contra la proteína de 22 kd.
4. Se observó efecto hemolítico en glóbulos rojos de carnero solamente con las proteínas de 102, 79 y 57 kd.
5. La determinación de estas proteínas abre la posibilidad de estudiar su implicación en la patogenia de la enfermedad, además de permitir posiblemente su uso en el diagnóstico .

APENDICE 1.

Medios de Cultivo para *M. hyopneumoniae*

Medio HP " *M. hyopneumoniae*" modificado por Friis:

Sol. Salina balanceada modificada por Hank 's.....	152.0 ml
Extracto de levadura.....	18.0 ml
* Agua desionizada	225.0 ml
* Infusión cerebro corazón (BHI,Difco).....	2.5 g
* Caldo PPLO (Difco).....	2.5 g
*Rojo de fenol (sol. 0.2%)	3.5 g
*DNA (Sigma).....	0.02 g
Meticilina	75.0 mg
Sulfato de Kanamicina	1.0 mg/ml
Suero inactivado de caballo (56°C/30 min)	25.0 ml

Ajustar el pH a 7.4 con una solución al 7.5% de bicarbonato de sodio. El medio ya preparado se distribuye en tubos de 3 x 100 mm con tapón de baquelita a razón de 4.5 ml en cada uno (*) Estos deben ser esterilizados en autoclave.

Solución salina balanceada modificada por Hank:

(disolver en el orden que se presenta)

Solución "A"

Agua desionizada	400.00 ml
NaCl	80.00g
KCl	4.00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.00 g
MgC ₁₂ .6H ₂ O	1.00 g
CaCl ₂	1.40 g
Agua desionizada c.b.p.....	500.00 ml

Solución "B"

Agua desionizada	400.00 ml
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1.50 g
KH ₂ PO ₄	0.60 g
Agua desionizada c.b.p.....	500.00 ml

Al momento de su uso 25 ml de la solución "A" se mezclan con agua desionizada aforando hasta 400 ml, después se agregan 25 ml de la solución "B" y se afora con agua desionizada hasta 500 ml.

Extracto de levadura

Se suspenden 50 g de levadura fresca de panadería en 100 ml de KH₂PO₄ 0.2M. Calentar a 80-85 ° C durante 20 minutos y clarificar mediante la filtración con cartuchos Millipore "lifeguard" CP-15, ajustar el pH a 7.6 con una solución 1N de NaOH. Esterilizar por filtración (membranas Millipore, 0.22 um) y almacenar a -20° C hasta su uso.

Medios Sólidos.

Medio de Friis:

Infusión cerebro corazón (BHI,Difco)	5.00 g
PPLO caldo (Difco)	5.00 g
Rojo de fenol (sol. 0.2%) (Sigma).....	7.00 ml
Agar noble (Difco)	4.90 g
DNA (Sigma).....	0.02 g
Agua desionizada	450.00 ml

Ajustar el pH a 7 con una solución 0.1 N de NaOH y esterilizar en el autoclave manteniéndose a 45-50 °C en baño maría para agregarle en forma aséptica los siguientes compuestos:

Sol. Salina balanceada mod. de Hank	304.00 ml
Extracto de levadura	36.00 ml
Suero inactivado de caballo	250.00 ml
Meticilina	150.00 mg
Sulfato de kanamicina	1.00 mg/ml

Mezclar y distribuir en cajas de Petri de 100 mm de diámetro

Medios Líquidos para Caracterización Bioquímica

Medio de Arginina (hidrólisis):

PLO caldo (Difco)	10.0 g
L-Arginina HCl (Sigma)	5.0 g
Rojo de fenol (Sigma).....	6.3 ml
Agua desionizada c.b.p.....	250.0 ml

Ajustar el pH a 7.0 con una solución 0.1 N de NaOH y esterilizar por filtración (membranas Millipore de 0.22 μ m), agregar en forma aséptica los siguientes compuestos, previamente esterilizados:

Suero inactivado de caballo	100.0 ml
Extracto de levadura	50.0 ml
Sulfato de kanamicina	1.0 mg/ml

Medio de Glucosa (fermentación):

Este medio se prepara tomando como base el medio de Friis y solo se le adiciona glucosa en una proporción de 1g por 1000 ml de medio líquido.

Tanto el medio de arginina como el medio de glucosa se distribuyen en tubos de 13 X 100 mm con tapón de baquelita a razón de 4.5 ml por tubo y se almacenan a 4° C

Se prepara una serie de soluciones que se emplea para realizar las pruebas bioquímicas bacteriológicas así como para realizar las pruebas serológicas de inhibición de crecimiento de micoplasmas.

Solución para la prueba de dependencia de esteroides.

La solución de digitonina al 1.5% (Friis, 1975) se esteriliza por filtración (membranas Millipore de 0.22 μm), se humedecen discos de papel filtro previamente esterilizados, secar a 37 °C y se almacenan a 4 °C.

Solución de azul de metileno para la prueba de producción de peróxido de hidrógeno.

Se prepara una solución al 0.1% de azul de metileno en agua destilada, esterilizar en autoclave y almacenar a 4° C.

Solución modificada de Alsever´s.

Glucosa	20.05 g
NaCl	4.2 g
Citrato de sodio	8.0 g
Ácido cítrico	0.55 g
Agua destilada c.b.p.....	1000.0 ml

Esterilizar por filtración (membranas Millipore de 0.22 μm) y se almacena a 4° C

APENDICE 2

Solución de monómeros, acrilamida-bis acrilamida (30.8% y 2.5%).

Acrilamida.....30.0 g
Bis-acrilamida.....0.8 g
H₂O desionizada c.b.p.....100.0 ml

Se filtra en papel Whatman 1 y se guarda a oscuridad a 4 C.

Regulador del gel de separación Tris-HCl 1.5 M pH 8.8.

Trizma base.....9.08 g
H₂O desionizada.....45.0 ml

Se ajusta el pH (8.8) con HCl 6N,

Aforar a50.0 ml

Se filtra en papel Whatman y se guarda a 4 C.

Regulador del gel concentrador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.

Trizma base.....3.03 g
H₂O desionizada.....45.0 ml

Se ajusta en pH a 7 con HCl 6N,

Aforar a50.0 ml

Se filtra en papel Whatman y se guarda a 4 C.

Lauril Sulfato de Sodio (Dodecil sulfato de sodio, SDS) al 10%.

SDS.....1.0 g
H₂O desionizada.....10.0 ml

Persulfato de amonio al 10%.

Persulfato de amonio.....0.1 g
H₂O desionizada.....1.0 ml
Se prepara al momento de usarse.

TEMED (N', N', N' Tetrametilendiamina)

Solución comercial lista para su uso

Solución amortiguadora de corrida (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M-SDS al 0.1%, pH 8.3).

Trizma base.....12.108 g
Glicina.....57.600 g
SDS al 10%.....4.g
Aforar con H₂O desionizada.....4000.00 ml
No debe ajustarse el pH. El regulador no debe ser reutilizado, debe desecharse.

Solución Digestora

Tris 0.5 M, pH 6.8.....4.375 ml
SDS.....0.1 g
Glicerol.....0.5 ml
2-Mercaotoetanol.....0.25 ml
Azul de bromofenol.....0.002%

Preparación del Gel

a) Gel para Tampón.

Sol. Acril-Bis (Amor pH 8.8).....1.0 ml
TEMED.....7.0 ul
Persulfato de amonio.....13.0 ul

b) **Gel separación de 7.5%**

En un matraz kitasato colocar:

Amortiguador pH 8.8.....7.5 ml

Sol. Acril-Bis (Amort pH 8.8)..... 2.5 ml

NOTA: Se hace vacío durante 10 minutos.

TEMED..... 25.0 ul

Persulfato de amonio..... 50.0 ul

c) **Gel separación de 12.5%**

En un matraz kitasato colocar:

Amortiguador pH 8.8.....5.9 ml

Sol. Acril-Bis (Amort pH 8.8).....4.2 ml

NOTA: Se hace vacío durante 10 minutos.

TEMED.....50.0 ul

Persulfato de amonio.....100.0 ul

d) **Gel concentrador para el peine**

En un matraz de kitasato colocar:

Amortiguador pH 6.8.....5.2 ml

Sol. Acril-Bis (Amort pH 6.8).....0.8 ml

NOTA: Se hace vacío durante 10 minutos.

TEMED.....20.0 ul

Persulfato de amonio.....40.0 ul

APENDICE #3

Tinción de geles de Poliacrilamida-Dodecilsulfato de sodio PAGE con azul de Comassie R-250.

- Solución stock del colorante

Azul de Comassie.....	2.0 g
H ₂ O desionizada.....	200.0 ml

1. Colorante de trabajo para tinción de proteínas Comassie al 0.125% en metanol: acético: agua.

Solución stock.....	62.5 ml
Metanol absoluto.....	250.0 ml
Ácido acético glacial.....	50.0 ml
H ₂ O desionizada.....	137.0 ml

Se filtra en papel Whatman No. 1.

2. Solución desteñidora I.

Metanol.....	250.0 ml
Ac. Acético.....	50.0 ml
H ₂ O desionizada.....	200.0 ml

3. Solución desteñidora II.

Metanol.....	25.0 ml
Ac. Acético.....	35.0 ml
H ₂ O desionizada.....	440.0 ml

APENDICE #4

Tinción con Negro Amido

Negro amido.....	0.1 %
Met-OH.....	45.0 ml
Ac. acético.....	10.0 ml
Agua destilada.....	45.0 ml

APENDICE #5

Soluciones para la técnica de inmunotransferencia

1. Solución amortiguada de Trietanolamina (TBS) pH 7.2

NaCl.....	7.5 g
Trietanolamina.....	2.8 ml
HCl 1N.....	17.0 ml
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	0.1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.02 g
H ₂ O destilada.....	980.2 ml

2. Solución de leche descremada al 5% en TBS

Skim-Milk.....	5.0 g
TBS.....	100.0 ml

3. Solución reveladora (Substrato)

Alfa-Cloronaftol.....	30.0 mg
Metanol.....	10.0 ml
TBS.....	50.0 ml
H ₂ O ₂	50.0 µl

4. Solución del Kit Elisamate (KPL)^R

- Solución de lavado
Concentrada 20X/200 ml
- Solución bloqueadora /BSA
Concentrada 100 ml
- Solución para parar la reacción.
Concentrada (5X) 5% SDS
- Solución "Coating"
Concentrada 10x/25 ml.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adegboye D.S..(1978) A review of mycoplasma induced immunosupresion Brit. Vet. J. 134:536-556.
- Amanfu, W., Weng, C.N., Ross, R.F. and Barnes, H.J. (1984). Diagnosis of mycoplasma pneumonia of swine: Sequential study by direct immunofluorescence. Am. J. Vet. Res. 45:1349-1352.
- Armstrong, C.H. (1982). Mycoplasmal pneumonia of swine International Swine Update (Squibb) Issue One P. 1, 6 y 8.
- Armstrong, C.H., Freeman,J., Sands-Freeman, L., Lopez-Osuna, M., Young, T. and Runnels, L.J. (1983). Comparison of the enzyme linked immunosorbent assay and the indirect hemagglutination and complement fixation test for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Can. J. Comp. Íed. 47:464 - 470.
- Artiushin, S., Stipkovits, L. and Minion, F.C. (1993). Development of polymerasa chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. Mol. Cell Probes 7:381-385.
- Bereiter, M., Young, T.F., Joo, H.S. and Ross, R.F. (1990). Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. Vet. Microbiol. 25:177-192.
- Blanchard, B., Vena, M.M., Cavallier, A., Lelannie, J., Gouranton, J. and Kobish, M. (1992). Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 30:329-341.
- Bommeli, W.R. and Nicolet, J. (1983). A method for the evaluation of enzyme linked immunoassay results for diagnosing enzootic neumonia in pig herds. Proc. Int. Symp. World Assoc. Vet. Lab. Diag. 3(2):439-442.

- Boughton, E, and Thors, C. (1976). *Mycoplasma Laboratory Handbook*; Ministry of agriculture, Fisheries and Food; Central Veterinary Laboratory; New Haw, Weybridge, Surrey, England.
- Brooks, E. and Faulds, D. (1989). The *Mycoplasma hyopneumoniae* 74.5-kD antigen elicits neutralizing antibodies and shares sequence similarity with heat-shock proteins. *Vaccines* 89:265-269.
- Burch, D. (1982). In: Thomas, P. The influence of housing desing and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia. *Pig News and Information*, Vol. 5, (4); 343-349.
- Calsamiglia, M., Pjoan, C. and Trigo, A. (1999) Application of a nested polymerasa chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J. Vet. Díagn. Invest* 11:246-251.
- Choi, Y.K. (2003) Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can. Vet. J.* 44 (9): 735-737
- Ciprián, C (1979). Aislamiento y caracterización de micoplasmas a partir de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos de México Tesis de Maestra ENEP - INIP.
- Ciprián, A., Cruz, T. and Pijoan, C. (1982) Specific fluorescence against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pneumonic lungs of pig in México. *Proceeding Int. Pig Vet. Soc Congress 1982, México*, p. 90.
- Ciprián C.A. (1987) Interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en las neumonías de los cerdos . Tesis Doctoral FESC UNAM.

- Ciprián, A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tortora, J., Colmenares, G., Lopez-Revilla, R. and Garza de la, M. (1988). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. Can. J. Vet. Res., 52: 434-438.
- Ciprián, A., Palacios, J.M., Cruz, S.T., Romero, R.A. y Colmenares, V.G. (2001). Efecto clínico de la combinación florfenicol-tilosina adicionada en alimento en lechones inoculados experimentalmente con una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. Querétaro, Qro. pp. 52.
- Dayalu, K.I. and Ross, R.F. (1990). Evaluation of experimental vaccines for control of porcine pneumonia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae*. Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc. 11:83
- Debey, M.C. and Ross, R.F. (1994). Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine traqueal organ cultures. Infect. Immun. 62 (12):5312-5318.
- Etheridge J.R. Cottew G.S and Lloyd L.C. (1979a). Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from lesions of experimentally in infected pigs Aust Vet J. 55:356 - 359
- Etheridge J.R and Lloyd L.C. (1979b). A complement fixation test for Enzootic Pneumonia of pigs using a complement dilution method. Aust Vet J. 56:101-105
- Feld, N.C., Qvits, P., Ahrens, P., Friis, N.F. and Meyling, A. (1992). A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 30:35-46.
- Friis, N. F. (1969). *Mycoplasma suis pneumoniae* isolated in Denmark *Acta Ve.t Scand* 10:295-297

- Friis, N.F. (1971a). Mycoplasmas cultivated from the respiratory tract of danish pigs. Acta Vet Scand 12:116 –119.
- Friis N.F. (1971b). A selective medium for *Mycoplasma suis pneumoniae*. Acta Vet Scand. 12: 454 - 456
- Friis N.F. (1973). Resistance of porcine mycoplasmas to drying. Acta Vet. Scand. 14:489-491.
- Friis N.F. (1975). The SPS and Digitonina test applied to porcine mycoplasmas. Acta Vet. Scand. 16:474-476.
- Friis, N.F. (1977). *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* in the growth precipitation test. Acta Vet Scand 18: 168 – 175.
- Freeman M.J. Armstrong C.H and Sands L.L. 1982 Evaluation of the ELISA for diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine (MPS). II. Antigenic relations between *M. flocculare* of reference antisera and sera of MPS affected swine Int Pig Vet Soc Congress México p. 92.
- Frey, J., Haldimann, A., Kobisch, M. and Nicolet, J. (1994). Immune response against the L-lactate dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine. Microb. Pathog. 17:313-322 .
- Gabridge, M.G., Brigh, M.J., Richards, H.N. (1982). Scanning electron microscopy of *Mycoplasma hyopneumoniae* on the membrane of individual ciliated tracheal cells. In Vitro 1:55-62.
- Geary, S.J and Walczak, E.M. (1985a): Cytophatic of whole cells and purified membranes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Infect Immun. 41:132 -136

- Geary S and Walczak E.M. (1985b). Isolation of a cytophatic factor from *Mycoplasma hyopneumoniae*. Infect Immun. 48:576-578
- Giger T., Bruggman S., Nicolet J (1977). Immunological methods for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in frozen sections and bronchial smears. Asweizer Archiv. Fur tennelkunde. 119 : 125-134
- González, R.N., Cruz, S.T., Mendoza, E.S., Hernández-Baumgarten, E., Colmenares, V.G., Romero, R.A. Tórtora, P.J. y Ciprián, C.A. (1999). Evidencia por microscopía electrónica de barrido del daño al epitelio mucociliar producido por la interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en el pulmón del cerdo. Tec. Pecuaria en México 37 (3): 31-42.
- Goodwin, R.F.W., Pomeroy, A.P. and Whittlestone, P. (1967). Characterization of *Mycoplasma suis pneumoniae*: a mycoplasma causing enzootic pneumoniae of pigs. J. Hyg. Camb. 65:85-97.
- Goodwin, R.F.W. (1971). In Thomas, P. (1984). The influence of housing desing and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia. Pig News and Information, 5 (4); 343-349.
- Goodwing, R.F.W. (1972). Isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* from the nasal cavities and lungs of pigs affected with enzootic pneumonia or exposed to this infection; Res. Vet. Sci. 13; (3); 262-267.
- Goodwin, R.F.W. and Whittlestone, P. (1973). Enzootic pneumonia of pigs: Immunization attempts inoculating *Mycoplasma suis pneumoniae* antigen by various routes and with different adjuvants. Br. Vet. 129:456-464.

- Hannan, P.T.C.; Banks, R.M.; Bhogal, B.S.; Blanchflower, S.E.; Donald, A.C.; Fish, J. P. and Smith, D. (1984). Reproducible pneumonia in gnotobiotic piglets induced with broth cultures of *Mycoplasma hyopneumoniae* and the effect of animal passage on virulence; Res. Vet. Sci. 36; 153-163.
- Haldimann, A., Nicolet, J. and Frey, J. (1993). DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein p36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Gen. Microbiol. 139:317-323.
- Higushi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 11:1026-1030.
- Hodges, R.T.; Bett, A.O. and Jennings, A.R. (1969). Production of pneumonia in gnotobiotic pigs with pure cultures of *Mycoplasma hyopneumoniae*; Vet. Rec. 84; 268-273.
- Hopfe M., Hoffmann, R. Henrich, B. (2004). P80, the HinT interacting membrane protein is a secreted antigen of *M. Hominis*. BMC Microb. 4:46
- Hsin-Hin, Chen (2003). Serum acute phase proteins and health status. Can. J. Vet Res 64(4): 283-290
- Iglesias, G.; Pijoan, C. and Hernández, E. (1982). Characterization of a substance in tracheal exudates with activity against *Pasteurella multocida*. Proceedings Int. Pig Vet. Soc. Congress, México, p. 86.
- Hsu, T. and Minion, F.C. (1998). Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* p97 adhesin. Infect. Immun. 66 (10):4762-4766.
- Klinkert M., Herman R. and Schaller H. (1985). Surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* identified from an *Escherichia coli* expression plasmid library Infect Immun 49:329-335.

- Kishima M., Ross R.F and Kuniyasu C. (1985). Cell mediated and humoral response to *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs enhanced by dextran sulfate Am Vet Res 46: 456 - 461
- Kishima M and Ross R.F. (1985). Suppressive effect of nonviable *Mycoplasma hyopneumoniae* of phytohemagglutinin induced transformation of swine lymphocytes. Am Vet Res 46: 2366- 2368
- Kobisch, M., Quillien, L., Tillon, J.P. *et al.* (1987). The *Mycoplasma hyopneumoniae* plasma membrane as a vaccine against porcine enzootic pneumonia. Ann. Inst. Past/Immunol 138:693-705.
- Kobisch, M., Milward, F., Desmettre, Ph. *et al.* (1990). Prevention of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimental infection by vaccination: active and passive protection. IOM Letters Vol. 1, 8:w6/6.
- Kristensen, B. Paros Ph., Nicolet, J., Wanner, M. and Deweck, A.L. (1981). Cell mediated and humoral immune response in swine after vaccination and natural infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am J Vet Res 42:784 -788.
- Kim, M.F., Heidari, M.B., Stull, S.J., McIntosh, M.A. and Wise, K.S. (1990). Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. Infect. Immun. 58:2637-2643.
- Lam K.M and Switzer W.P. (1971 a). Mycoplasmal Pneumonia of Swine Development of and indirect hemoagglutination test. Am. J. Vet. Res. 32:1737-1741
- Lam K.M and Switzer W.P. (1971 b) Mycoplasmal Pneumonia on Swine Active and Passive immunizations. Am J Vet Res. 32:1731-1736

- Livingstone, C.W.; Stair, E.L.; Underdahl, N.R. and Mebus, C.A. (1972). Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. *Am. J. Vet. Res.* 33 (11):2249-2258.
- Maqueda, J.J. (1977). Incidencia de Neumonía Enzoótica en varios estados productores de cerdos en la República Mexicana (Estudio preliminar) Memorias del I Congreso Latinoamericano de Veterinarios Especialistas en Cerdos UAM-Xochimilco, México (XIII Convención AMVEC).
- Mebus CA, Underdahl NR. (1977). Scanning electron microscopy of trachean an d brouchi from pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res*;(38): 1249-1254.
- Mendoza, E.S. y Pijoan, C. (2001). El estudio del PCR y las enfermedades respiratorias. Tercer Ciclo Nacional de Enfermedades Respiratorias del Cerdo. Editores: Susana Mendoza Elvira y Abel Ciprián Carrasco. Tercera Edición 2001. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM y Fort Dodge Animal Health. P. 193-196.
- Mendoza, E.S., Pijoan, C., Torremorrel, M., Oliveira, S., y Cuartero, L. (2001). La PCR como una herramienta para detectar microorganismos respiratorios en cerdos. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. Querétaro, Qro. 2001. Pp. 130
- Minion, F.C., Adams, C. and Hsu, T. (2000). R1 region of p97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect. Immun.* 68 (5):3056-3060.
- Mori, Y., Hamaoka, T., Sato, S., and Takeuchi, S. (1988). Immunobloting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Immunol. Immunopathol.* 19:239-250.

- Mori, Y., Hamaoka, T., and Sato, S. (1987). Use of monoclonal antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Isr. J. Med. Sci.* 23:657-662.
- Morrison R.B. Pijoan C and Leman A.D. (1986). Association between enzootic pneumonia and performance. *Pig News and Information* 7: 23 - 31
- Morrison, R.B.; Pijoan, C.; Hilley, H.D. and Rapp, V. (1985). Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine; *Can. J. Comp. Med.* 49; 129-137.
- Morrison, R.B.; Pijoan, C. and Leman, A.D. (1986). Association between enzootic pneumonia and performance. *Pig News and information* vol. 7 (1); 23-31.
- Nava, NE., Trujano, CM., Iglesias, SJG. (2001). Análisis serológico en granjas porcinas ubicadas en 3 estados de la Republica Mexicana a *Mycoplasma hyopneumoniae*. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. Querétaro, Qro 2001. pp. 132.
- Nicolet, J. and Paroz P. (1980) Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme-linked immunoabsorbent assay. *Res. Vet. Scie.* 29:305-309.
- Ose, E.E., Bobbitt, J.L. Muth, W.L. et al: (1990). Effectiveness of experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) vaccines. I. Synergen proteins. *IOM Letters* Vol.1, 8:P70.
- Petersen G. Weiss D. Egan J., Korshus J. Peters R and Miron H (1990). Response to *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in nursing piglets *Proc Int Pig Vet Soc* 11: 84

- Piffer, I.A. and Ross, R.F. (1984). Efect of age on susceptibility of pgs to *Mycoplasma hyopneumoniae*, Am. J. Vet. Res. 45; (3) 478-481.
- Pijoan, C. and Ochoa, G. (1978). A bactericidal substance against *Pasteurella multocida* a produce by pig embryo tracheal explants. Rev. Lat. Microbiol. 20(1): 1-3.
- Pijoan, C. (1985). Neumonía del cerdo. En encuentro sobre enfermedades Infecciosas del Cerdo. Editado por Correa, G.P. y Morilla, G.A.; Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC). P. 85-99.
- Pointon, A.M.; Bryt, D. and Heap, P. (1985). Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. Aust. Vet. J. 62; 13-18.
- Razin, S. (1992). Mycoplasma Taxonomy and Ecology. In: Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis. Edts. Maniloff, J., McElhaney, R.N., Finch, L.R. and Baseman, J.B. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Pp. 3-22.
- Roberts, D.H. and Pijoan, C. (1977). Identification of *Mycoplasma hyorhinis*, Brit. Vet. 127; 582-587.
- Ro L.H and Ross R.F. (1983). Comparison of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by serologic methods. Am J Vet Res. 44:2087-2094
- Roberts D.H. (1972). Inhibition of lymphocyte transformation induced by phytohemagglutinin with porcine mycoplasma. Br. Vet. 128:585-590.
- Rose, D.L., Tully, J.C. and Wittler, R.G. (1979). Taxonomy of some swine mycoplasmas: *Mycoplasma suis* pneumoniae, Goodwin et al., 1965, a later objective synonym of *Mycoplasma hyopneumoniae*, Mare and Switzer, 1965 and the status of *Mycoplasma flocculare*, Meyling and Friis, 1972. Int. J. Syst. Bacteriol. 29:83-91.

- Ross R.F. (1984). Chronic pneumonia of swine with emphasis of mycoplasmal pneumonia Proceeding American Association of Practitioners U.S.Á
- Ross R.F (1990) Use of conventional and molecular biological methods in diagnosis and prevention of swine mycoplasmosis Compendio de las enfermedades del Cerdo y su relacion con la Biología Molecular. *Edit Ciprián C y Mendoza S* Septiembre Mex D.F. p. 46-54).
- Ross, R.R., Zimmerman, W. Erickson, B.J. and Young, F.T. (1984). Characteristics of protective activity of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Am.J.Vet.Res* 45:1899-1904.
- Ross, R.F. (1999). Mycoplasmal Diseases. In: Diseases of Swine. Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L. and Taylor, D.J. Edts. 8th Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. Pp. 495-509.
- Ruiz, Alvaro, Galina, L, Pijoan Carlos (2002). *Micoplasma hyopneumoniae* colonization of pigs sired by different boars. *Can J Vet Res* 66 (2) 79-85
- Simecka, J.W., Davis, J.K., Maureen, Davidson, M.K., Roos, S.E. Stadtfänder, C.T.K-H. and Cassell, G.H. (1992). Mycoplasma Disease of animals. In: Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis. Edts. Maniloff, J., McElhane, R.N., Finch, L.R. and Baseman, J.B. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Pp. 391-415.
- Schuller W. Swoboda R. Baumgarten W (1977): Comparison of various laboratory methods for the diagnosis of enzootic pneumonia in swine. *Wiener Tierärztliche Monoteschrift* .64: 236 - 241
- Slavik M.F.(1976). Adaptation of a latex agglutination tube test for diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* swine pneumonia. *Diss. Abst. Int.* 378: 2703 - 2704

- Strasser, M., Nicolet, J., and Frey, J. (1990). Cloning and expression of a 36 Kd species specific immunogenic protein from *Mycoplasma hyopneumoniae* in *E. coli*. IOM Letters Vol. 1, 8:P15.
- Strasser, M., Frey, J., Bestetti, G., Kobisch, M. and Nicolet, J. (1991). Cloning and expression of a novel species-specific early immunogenic 36-kilodalton of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 59:1217-1222.
- Stärk, K.D.C., Nicolet, J. and Frey, J. (1998). Detection fo *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with Nested PCR assay. Appl. Environ. Microbiol. 64 (2):543-548.
- Stipkovits, L., Nicolet, J., Haldimann, A. and Frey, J. (1991). Use of antibodies against the p36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of *M. hyopneumoniae* strains. Mol. Cell. Probes 5:451-457.
- Suter M.Kobisch M anä Nicolet J (1985). Stimulation of immunoglobulin containinig cells and isotype specific antibody response in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in specific pathogen free pigs. Infect. Immun. 49:615-620
- Switzer, W.P. (1967). Swine mycoplasmosis. Annals New York Academy of Sciences 143:281-286.
- Tajimá M. Yagihashi T.Nunoyá T(1985). Ultraestructure of mycoplasmal capsules of revealed by stabilization with antiserum and staining with ruthenium red. Jpn. J. Vet. Sci. 47:2 21- 223.
- Tajimá M. Yagihashi T., Nunoyá T., Takeuchia Ohashi F. (1983). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs immunosupressed by thymectomy and treatment with antithimocyte serum. Am. J. Vet. Res. 45:1928-1932

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Thacker E.L. Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuwech, R. and Thacker, B.J. (1999). *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus-induced pneumonia. J. Clin. Microbiol. 37 (3):620-627.
- Thomas, P. (1984). The influence of housing design and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia. Pig News and Information 5 (4):343-349.
- Topp, C. and Faulds, D.H. (1990). Cloning and nucleotide sequence of the gene for the 74.5 kd antigen, an Hsp70 homologue in *Mycoplasma hyopneumoniae*. IOM Letters Vol. 1, 8:P18.
- Underdahl, N.R., Kennedy, G.A., Ramos, A.S. Jr. (1980). Duration *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in gnotobiotic pigs. Can Vet J 21:258-262.
- Young, F.T., Ciang Yu-Wei and Ross, R.F. (1990) Evaluation of local and systemic humoral responses to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Proceeding Int Pig Vet Soc. p.97
- Young F.T. and Ross F.R. (1987). Assesment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. Am J Vet Res 48:651-656 .
- Whittlestone, P. (1972). Pathogenic mycoplasma, CIBA Foun. Symp. Pp. 263-283.
- Whittlestone, P. (1973). Enzootic pneumonia of pigs (EPP). Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 17; 1-55.
- Whittlestone, P. (1976). Immunity to *Mycoplasma* causing respiratory diseases in man and animal. Ad. Vet. Scien. Comp. Med. 20: 277- 307.

- Wittlestone, P. (1979). Porcine Mycoplasmas en: The Mycoplasmas vol. II Human and Animal Mycoplasmas; Ed. Tully, J.G. and Whitcomb, R.F.; Academic Press. 133-176.
- Williams, P.P. and Gallagher, J. E (1978). Cytopathogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal ring and lung explant organ cultures alone and in combination with monolayer cultures of fetal lung fibroblast. Infect. Immun. 20 (2):495-502.
- Wise, K.S. and M.F. Kim (1987). Major membrane surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* selectively modified by covalently bound lipid. J. Bacteriol. 169: 5546-5555
- Young, F.T. and Ross, R.F. (1987). Assessment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. Am. J. Vet. Res. 48:651-656.
- Zhang, Q., Young, T.F. and Ross, R.F. (1994). Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. Infect. Immun. 62 (5):1616-1622.
- Zhang, Q., Young, T. and Ross, R.F. (1995). Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. Infect. Immun. 63:1013-1019.
- Zimmermann, W., Tschudi, P. and Nicolet, J. (1986). ELISA serologie in blut und kolostralmilch: Eine Moglichkeit zur uberwachung der enzootischen pneumonie (EP) in schweine-bestanden. Schweiz Arch Tierheilkd 128:299-306.
- Zielinski, G.C. and Ross, R.F. (1993). Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. Am. J. Vet. Res. 54 (8):1262-1269.