

13  
2EJ



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**“DESARROLLO DE UNA PRUEBA ELISA-DOT  
TWEEN 20 H-H PARA EL DIAGNOSTICO DE  
Mycoplasma hyopneumoniae EN CERDOS”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**HILDA CORDOVA REYEROS**

**ASESORES: M. EN C. EDGAR AGUILERA CERON  
M. EN C. TONATIUH A. CRUZ SANCHEZ  
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.**

**1999.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

271681



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS  
U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Desarrollo de una prueba ELISA-DOT Tween 20 H-H para el  
diagnóstico de Mycoplasma hyopneumoniae en cerdos"

qué presenta la pasante: Hilda Córdova Reyeros

con número de cuenta: 9256265-9 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga.

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

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 11 de Diciembre de 1998

PRESIDENTE M. en C. Clara Ines Alvarez Manriquez. *Clara Ines Alvarez*

VOCAL Q.F.B. Martha P. Campos Peón *MP*

SECRETARIO M. en C. Edgar Aguilera Cerón *EA*

PRIMER SUPLENTE Dra. Susana E. Mendoza Elvira *Susana E. Mendoza Elvira*

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Angel G. Martínez Sosa *Angel G. Martínez Sosa*

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS por estar presente en los momentos  
más difíciles de mi vida y por permitirme existir.  
Siempre me cuidas.  
TE AMO.

A mis padres Alfredo e Hilda por su amor  
y apoyo incondicional, gracias por hacer  
de mí la mujer que soy; este es resultado  
de su herencia.  
LOS AMO

A mis hermanos Fredy y Jorge por su compañía  
y comprensión; este trabajo les pertenece.  
LOS AMO.

A mi prima Jessy por su apoyo en la realización  
de este trabajo y por alentarme a seguir adelante.  
TE QUIERO MUCHO.

A mi amiga Heidi Amezcua por su amistad y compañía  
durante toda la carrera y más.  
TE QUIERO MUCHO.

A mi amiga Miroslava Barrera por sus consejos y buenos  
deseos para con mi vida.  
TE QUIERO MUCHO

Amis abuelitas Dulce y Lupita por ser la semilla de mi  
familia.  
LAS QUIERO MUCHO

A mis abuelos Alfredo y Cudberto que aunque no tube el  
placer de conocerlos, les vivo agradecida.  
LOS EXTRAÑO

A las familias Córdova, Reyerros, López, Martínez, Hernández  
y Fragoso por ser testigos de mi sueño hecho realidad.

A mi asesor Edgar Aguilera Cerón por tener siempre una respuesta a todas mis dudas.

Al maestro Tonatiuh Cruz por su apoyo, interés y ganas por que este trabajo resultara.  
Gracias de todo corazón.

Al Dr. Abel Ciprián Carrasco por permitirme pertenecer al grupo de posgrado y proporcionarme todo lo necesario para la realización de este trabajo.

A la Dra. Susana E. Mensoza Eivira por ser un claro ejemplo de lo que una mujer puede lograr, la admiro muchísimo.

Al maestro Frank Díaz por su apoyo y consejos.

Al maestro Oscar por su disposición y optimismo de resolver Todos los problemas por más difíciles que estos sean.

A mis compañeros Rogelio Montoya, Carlos Quezada,  
Erika Rodríguez, Teresa Pichardo, Edgar Romero,  
Guillermo Montoya y Cesar Díaz por compartir momentos  
muy agradables en mi vida.  
NUNCA LOS OLVIDARE.

A mi amigo Jesús Herrera Barbosa por presionarme para  
cumplir este objetivo.  
INTERNET ES EL CULPABLE DE HABERTE CONOCIDO.

A Juan Camarena Navarro por impulsarme y permitirme  
crecer; aunque el precio haya sido perderte.  
Te .....

INDICE	Pág.
RESUMEN .....	1
I INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Clasificación de los Mollicutes .....	3
1.1.1 Características generales de los Mollicutes .....	4
1.2 Neumonía enzoótica .....	5
1.2.1 Definición .....	6
1.2.2 Patogenia .....	7
1.2.3 Importancia económica .....	8
1.3 Estructura de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	9
1.3.1 Cultivo e identificación de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	10
1.3.2 Diagnóstico de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	11
1.4 Enzimoimmunoensayo (DOT-ELISA) .....	13
1.5 Dot-Enzimoimmunoensayo (DOT-ELISA).....	15
II OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo general .....	17
2.2 Objetivos particulares .....	17
III METODOLOGIA .....	18
3.1 Cultivo de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> y obtención del Antígeno Tween 20	18
3.2 Estandarización de la Técnica RLISA-Dot Tween 20 H-H para la determina- ción de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	18
3.3 Determinación de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> en 100 sueros de campo por el método ELISA-Dot Tween 20 H-H.....	21
3.4 Determinación de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> en 100 sueros de campo por el método (Chekid Hyoptest), prueba comercial .....	22
3.5 Identificación de la proteínas del Antígeno Tween 20 y de la prueba comercial en geles de poliacrilamida.....	24
IV RESULTADOS Y OBSERVACIONES .....	27
V DISCUSION .....	40
VI CONCLUSIONES .....	46
ANEXO .....	47
GLOSARIO .....	49
VII BIBLIOGRAFIA .....	50



## RESUMEN

La Neumonía Enzootica es una enfermedad infecciosa producida por el *Mycoplasma hyopneumoniae* que es un microorganismo que afecta el tracto respiratorio de los cerdos, esta infección se caracteriza por tos, pérdida de peso y baja mortalidad. Es una de las enfermedades que mas dinero cuestan al porcicultor, y no solo por los animales que se mueren, sino además por los que quedan como enfermos crónicos ya que la pérdida de peso en estos es muy significativa; así como el gasto de medicinas, alimento, etc.

El *Mycoplasma hyopneumoniae* penetra por el aire inspirado y coloniza el epitelio ciliado del área traqueobronquial; entre cerdo y cerdo se puede transmitir por contacto de narices. Todo esto se ve favorecido por factores predisponentes como son el destete, el transporte de los animales, los cambios de corral, la falta de agua y alimento, humedad del piso, cambios de temperatura y un diagnóstico inoportuno (33).

Este trabajo tiene la finalidad de ensayar una prueba serológica de ELISA-DOT para el diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*, la cual sea sensible, específica, rápida, económica y fácil de utilizar. Para esto se obtuvo el Antígeno Tween 20 a partir de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae*; se fijó a membranas de nitrocelulosa, se estandarizaron las condiciones de trabajo por el método de ajedrez y se nombró como método de ELISA-DOT Tween 20 H-H. Posteriormente se evaluaron 100 sueros de cerdos provenientes de los estados de Tabasco, Michoacán y Yucatán. Los resultados fueron comparados con una prueba comercial obteniéndose una correlación del 41%, una sensibilidad y especificidad comparativa del 100% y 8.3% respectivamente.

En base a estos resultados se observa que existen diferencias entre ambas pruebas; estas diferencias se atribuyen a reacciones inespecíficas causadas por el tipo de proteínas que presenta el Antígeno Tween 20, estas proteínas fueron identificadas por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida.

De tal manera se concluye que la prueba ELISA-DOT Tween 20 requiere de una purificación del Antígeno Tween 20; así como de más ensayos para ofrecerla como método de diagnóstico rutinario.

## I.- INTRODUCCION

Las neumonías son una de las enfermedades que más dinero le cuestan al porcicultor, y no solo por los animales que se mueren, sino además por los que quedan como enfermos crónicos, debido a la baja ganancia de peso el gasto en medicinas curativas, tanto inyectadas como en el agua de bebida, la mano de obra, el costo del veterinario, etc. (33,38)

Entre las diversas etiologías que provocan trastornos respiratorios; *Mycoplasma hyopneumoniae*, es el principal factor de inmunosupresión para el tracto respiratorio en cerdos y se encuentra prácticamente en todas las granjas del país; es el responsable de la Neumonía Enzoótica, que si bien no provoca muertes, si una baja en el crecimiento de los animales hasta en 37.5 gr diarios por cada 10% de pulmón afectado. (11,33)

Existen una gran variedad de métodos de diagnóstico para *Mycoplasma hyopneumoniae* sin embargo es importante implantar un método de diagnóstico que cubra las siguientes características: rápido, específico, sensible, económico y fácil de utilizar. Esto con el objetivo de que el mismo porcicultor tenga la capacidad de diagnosticar la enfermedad y proporcionar un tratamiento adecuado y oportuno para evitar grandes pérdidas económicas en la granja. (8,11)

Recientemente se han elaborado los conjugados para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en pulmón como son los de fluorescencia y peroxidasa; en la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M. (9)

Así mismo fue desarrollada una prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra el *Mycoplasma*, mediante el uso de un antígeno específico como es el Antígeno Tween 20, mostrando su utilidad. (21)

Sin embargo estas pruebas son de uso de laboratorio. En otras enfermedades como pleuroneumonía contagiosa porcina o micotoxinas se pueden diagnosticar en condiciones de campo mediante el empleo del método de ELISA-DOT, teniendo las ventajas de ser rápida, confiable y fácil de realizar. Es por ello que el presente trabajo es un ensayo para la aplicación de la prueba ELISA-DOT en el Diagnóstico de la Neumonía Enzootica, la cual no existe hasta el momento.

### 1.1.- CLASIFICACIÓN DE LOS MOLLICUTES

La clasificación más común de los Mollicutes fue establecida por Edward y Freundt en 1956 (14), ésta consistió en una sola familia *Mycoplasmataceae*, con un solo género *Mycoplasma* y 15 especies. En la actualidad ésta clasificación fue gradualmente expandida por la adición de nuevos Géneros, Familias y una sola clase de Mollicutes que proviene del latín mollis (suave) y cutis (piel).

La clasificación más actual es la siguiente: (30,31)

ORDEN 1 <i>Mycoplasmatales</i>	Fam 1 <i>Mycoplasmataceae</i>	Género 1: <i>Mycoplasma</i> ( 92 especies) <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>  Género 2: <i>Ureoplasma</i>
ORDEN 2 <i>Acholeplasmatales</i>	Fam 2 <i>Spiroplasmataceae</i>	Género: <i>Spiroplasma</i>
ORDEN 3 <i>Anaeroplasmatales</i>		

### 1.1.1.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS MOLLICUTES

Existe cuatro características comunes generales que tienen lo Mollicutes:

1) carecen de maquinaria genética para formar una pared celular en un medio de cultivo, 2) las colonias tienen forma de huevo estrellado con un diámetro entre 0.01 a 1.0 mm en el medio con agar, 3) son filtrables y 4) se ha observado que en la superficie de los pulmones suelen revertir su pared celular . (3,30,50)

La morfología de los Mollicutes en medio líquido varía entre cocoide, pleomórfica y formas filamentosas dependido de su especie. Su reproducción es por fisión binaria. Su naturaleza flexible y su pequeño tamaño permite el paso através de membranas con un poro de 0.22-0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las colonias de *Mycoplasmas* tienen un rango entre 0.1 a 1.0 mm de diámetro.(3,30,40)

Los *Mollicutes* son gram negativos, pero se tiñen muy pobremente por lo que se recomiendan otros métodos de tinción como son por Giemsa o tinción de Rumanowsky. (3)

Los *Mollicutes* están encerrados en una membrana plasmal compuesta por proteínas , glicoproteínas, glucolípidos y fosfolípidos. Por microscopía electrónica se ha observado la presencia de un citoesqueleto y una estructura terminal especializada. Estas estructuras son las responsables de la motilidad y adherencia en la membrana de la célula blanco. (3,30)

Similar a otros procariotes los *Mollicutes* poseen un genoma de DNA de doble filamento. Los genomas de las especies de *Mycoplasma* son los más pequeños pesan sobre 500 a 750 kd. (3,30)

Muchos *Mollicutes* son organismos fastidiosos que requieren un complejo con suplementos basales como suero y extractos de levadura para su crecimiento. Acidos grasos insaturados y ácidos precursores son factores esenciales de crecimiento. (3,30)

Todos los *Mollicutes* del género *Mycoplasma* requieren colesterol para su crecimiento el cual es obtenido de sueros de caballo o de sueros con alto contenido de colesterol. El pH óptimo para el crecimiento de *Mycoplasma* es de 7.5, con una temperatura entre 37 y 39 °C. Los *Mollicutes* son aerobios facultativos o microaerofílicos.(3,30,40)

Muchos *Mollicutes* usan glucosa o arginina; o ambas como fuente de energía. Algunos obtienen su fuente de energía por la oxidación de ácidos grasos o por metabolismo de carbohidratos de cadena corta. Solo *Ureoplasma* metaboliza urea por vía de la ureasa.(3,40)

Los *Mollicutes* son sensibles a compuestos que bajan la tensión superficial como; jabones, amonios cuaternarios y Tween. El yodo y compuestos fenolados los destruyen completamente. Son generalmente resistentes al acetato de talio y a la clásica penicilina, (éste antibiótico interfiere en la síntesis de la pared celular) sin embargo son sensibles a antibióticos que interfieren con los aminoácidos, ácidos nucleicos y metabolismo de esteroides. Son altamente susceptibles a sueros inmunes in vitro.(3, 36, 40)

## 1.2.- NEUMONIA ENZOOTICA

### ANTECEDENTES

En la antigüedad se creía que el agente causal de la Neumonía Enzoótica era un virus, pero en 1965 fue aislado y demostrado que el *Mycoplasma* es una bacteria la cual causa la Neumonía en cerdos esto en E.U. (31)

Las pruebas de diferenciación fueron las siguientes (30) :

	Mycoplasma	Bacteria	Virus
PARED	NO	SI	NO
TAMAÑO	0.3 um	1-2 um	< 0.5 um
PROPAGACION EN MEDIO LIBRE DE CEL.	SI	SI	NO
REQUIERE ESTEROLES	SI	NO	NO
GAMA ESTRECHA DE ESPECIFICIDAD HOSPEDERO	NO	NO	SI
RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS QUE ACTUAN EN SINTESIS DE PROTEINAS	NO	NO	SI
RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS QUE ACTUAN CONTRA PARED	SI	NO	SI

El nombre *Mycoplasma* fue derivado por la combinación del griego mykes (hongo) y plasma (por algo formado o moldeado). (14)

El agente etiológico primario de la Neumonía Enzoótica es el *Mycoplasma hyopneumoniae*, en todo el mundo es una de las enfermedades asociadas a la pérdida de producción en cerdos.(23, 37)

### 1.2.1.- DEFINICION

La Neumonía Enzoótica es una enfermedad infectocontagiosa del tracto respiratorio de los cerdos, caracterizada por tos, pérdida de peso y alta morbilidad; debido a la asociación de *Mycoplasma hyopneumoniae* con otros microorganismos como son *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. (33,42)

### 1.2.2.- PATOGENIA

Los animales se pueden infectar mediante la inhalación, por aerosol, de partículas producidas por los animales que al toser dispersan grandes cantidades de células de *Mycoplasma hyopneumoniae*, o por contacto de narices. Las partículas pueden penetrar muy profundamente en el tracto respiratorio creando lesiones irreversibles. (20)

Se ha determinado que los Micoplasmas pueden provocar lesiones pulmonares como consecuencia de su acción directa sobre las células y la respuesta inmunológica producida por el hospedero (16). La modificación de las propiedades de la membrana de la célula blanco debido a la unión con receptores específicos y la liberación de metabolitos (peróxido de hidrógeno), pueden causar diversas alteraciones, como la inhibición de la actividad ciliar y la hiperplasia del epitelio; dando como resultado la exposición de antígenos que ya no son reconocidos como propios por el organismo. Este proceso de hipersensibilidad da origen a una reacción linfocitaria extensa, formación de complejos inmunes e inflamación. (57)

La colonización de la mucosa por el *Mycoplasma hyopneumoniae* se produce tempranamente y la adhesión a receptores, probablemente específicos, de las células ciliadas es el evento inicial en el desarrollo de la neumonía (11).

Luego de la infección, el *Mycoplasma hyopneumoniae* se aloja en las vías respiratorias a nivel de los epitelios traqueal, bronquial y bronquiolar; localizándose entre los cilios y el citoplasma apical de las células. La presencia de éste produce el aglutinamiento y la pérdida de cilios reflejando la intensa colonización que se produce. No se produce la penetración del microorganismo a los tejidos (24,25 ).

La ciliostasis e hipersecreción de moco contribuye al acúmulo de exudado mucopurulento en las vías aéreas bajas. (20)

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

Como respuesta a la infección se han determinado que se producen cambios en las propiedades fisicoquímicas del moco secretado por las células epiteliales, estos cambios al parecer incrementan la susceptibilidad y la infección bacteriana secundaria. (11,17)

El período de incubación de *Mycoplasma hyopneumoniae* está reportado entre 10-16 días bajo condiciones naturales. Sin embargo existen otros reportes que presentan variabilidad en el tiempo de incubación (2,30,31).

### **1.2.3.- IMPORTANCIA ECONOMICA**

La neumonía en el cerdo representa uno de los más graves problemas infecciosos de ésta especie animal. El tipo y la severidad de la neumonía es el resultado de la interacción dinámica entre los agentes infecciosos y el hospedero; que son fuertemente influenciados por las condiciones ambientales, prácticas de manejo y factores nutricionales; lo que favorece la invasión del tracto respiratorio por bacterias, micoplasma y virus. (38,42,49)

De esta manera se pone de manifiesto la complejidad del estudio de las enfermedades respiratorias en general; en donde los agentes infecciosos son potencialmente capaces de producir lesiones pulmonares y algunos factores predisponentes intervienen para que se manifieste su poder patógeno. Por otra parte la gran escala de la producción porcina se ha convertido en un factor que agrava y difunde la infección pulmonar (4).



El costo económico de esta enfermedad es enorme, debido al carácter crónico que usualmente presenta, lo que ocasiona severas pérdidas por deficientes ganancias de peso y retraso en el crecimiento; además, debe considerarse el enorme gasto por concepto de medicamentos, retraso en la comercialización (hasta de un mes), programa de prevención y control. (35,39)

La importancia de *Mycoplasma hyopneumoniae* no es sólo su efecto como patógeno primario, sino también por su capacidad de actuar sinérgicamente con otros microorganismos para causar una enfermedad respiratoria grave. (49)

Se ha determinado que entre el 30 y 60% de los cerdos de abasto presentan algún tipo de lesión neumónica, y por cada 10% de tejido pulmonar afectado, la ganancia diaria de peso se reduce en 37.5 gr. (39)

### 1.3.- ESTRUCTURA DEL *Mycoplasma hyopneumoniae*.

El tamaño y morfología del *Mycoplasma hyopneumoniae* no varía según la fase de crecimiento. Las células son cocoides con un diámetro de 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  tanto *in vitro* como *in vivo*. Está limitada por una membrana trilaminar asimétrica, contigua a ésta se observa una cubierta de apariencia rizada, que consiste en delgados y largos pelos o cerdas de 1 a 2 nm de diámetro y 30 a 100 nm de largo. (22)

En cortes de pulmón teñidos con rutenio rojo cultivados en presencia de suero hiperinmune, se observa una estructura capsular de 125 nm de espesor, y parecen estar constituidas por elementos fibrilares orientados radialmente (56). El material capsular se extiende entre el Micoplasma, las microvellosidades, cilios e interconectando otras células micoplasmiales ( 57 ). Está compuesta por proteínas y carbohidratos entremezclados, las primeras predominan en la capa intermedia; mientras que los segundos predominan en la capa más externa. Sin embargo ésta estructura capsular se pierde al ser aislado el Micoplasma *in vitro*, la cual nunca se vuelve a recuperar ( 5,10,30,31).

### 1.3.1.- CULTIVO E IDENTIFICACION DE *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Es uno de los microorganismos más exigentes del género; sin embargo, el desarrollo de medios de cultivo complejos como los descritos por Friis y Goodwin facilitan su aislamiento ( 16 ).

El medio de cultivo más usado en el cual es aislado el *Mycoplasma hyopneumoniae* es el medio de Friis (1971), contiene una fuente de esteroides la cual es proporcionada por el suero de equino, que contiene la proteína alfa-1 lipoproteína, ésta proteína contiene colesterol esterificado y fosfolípidos los cuales son esenciales para el crecimiento del *Mycoplasma hyopneumoniae*, ya que lo utiliza para la formación de su membrana celular (6,16 ).

Otro nutriente es el extracto de levadura, es esencial ya que es rico en magnesio y vitamina B lo cual es utilizado para mantener la integridad de la membrana.

La adición del PPLO es para obtener energía a partir de peptonas; es importante la presencia de un antibiótico ya sea penicilina, nistatina, anfotericina o metoxilina para hacer de éste un medio diferencial ( 6,16 ).

La mayoría de los Micoplasmas requieren de DNA para facilitar su crecimiento, el cual varía de 2 a 14 días en medio líquido a 37 °C en agitación ( 6,16 ).

La solución de Hanks tiene la función de mantener el pH del medio a 7.5 con la presencia del rojo de fenol como indicador , se puede saber la existencia del *Mycoplasma* ya que éste vira a color canela, obteniéndose un pH de 6.8 (6,16 ).

En medio sólido las colonias pueden ser detectadas después de 2 a 3 días de incubación y alcanzan su tamaño máximo después de 10 días. Se desarrollan en forma de pequeñas colonias redondas con un diámetro de 100 a 500 um, desprovistas de la protuberancia central ( dan la apariencia de gotas de rocío ).

Las placas se incuban a 37°C con la mayor cantidad de humedad posible y una atmósfera que contenga de un 5 a 10 % de CO<sub>2</sub>. (16,42)

La identificación se realiza por pruebas bioquímicas, que incluyen la prueba de dependencia de esteroides, fermentación de carbohidratos, reducción de azul de tetrazolio, a través de pruebas serológicas o pruebas de inhibición de crecimiento. (3)

El *Mycoplasma hyopneumoniae* solo puede ser aislado del tracto respiratorio. Se encuentra en el epitelio del pulmón, por lo general asociado a los cilios, donde puede ser detectado por la tinción de Giemsa, microscopía electrónica, inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. (12,42,47)

### 1.3.2.- DIAGNOSTICO DE *Mycoplasma hyopneumoniae*

La neumonía por *Mycoplasma hyopneumoniae* se diagnostica normalmente bajo condiciones prácticas, en base a la presencia de una neumonía crónica en la pira (tos no productiva y sin fiebre). Neumonía que se caracteriza por una tos bien demarcada y explosiva, con hallazgos histológicos de neumonía intersticial que produce crecimiento disparejo, conversión alimenticia deficiente y sin mortalidad. Sin embargo estos signos son sólo indicativos y la confirmación mediante pruebas de laboratorio es esencial para el diagnóstico cuando se van a introducir animales de otras piras a una granja no infectada. (11,27,51)

Las pruebas de laboratorio que se pueden utilizar para el diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* son:

1.-) Inmunofluorescencia, que consiste en el examen del pulmón utilizando un conjugado policlonal o poliespecífico anti-*Mycoplasma hyopneumoniae*. La especificidad de esta prueba (conocida también por sus iniciales IF) es ambigua puesto que *Mycoplasma hyopneumoniae* comparte propiedades antigénicas con *Mycoplasma flocculare* y *Mycoplasma hyorhinis*. (33,48)

2.-)Análisis mediante cultivo de muestras de pulmón con la identificación subsecuente de los aislamientos utilizando: epifluorescencia, inhibición del crecimiento, prueba de inmunotrasferencia (Western Blot) para detectar la proteína p36, prueba de la sonda de ADN, reacción de la polimerasa (PCR). El método del cultivo es tedioso y tardado debido a que *Mycoplasma hyopneumoniae* crece muy lentamente, además del efecto de confusión que producen otros mycoplasmas u otras bacterias presentes en el tracto respiratorio. (33,48)

Para la diferenciación de *Mycoplasma* de otros Géneros es necesaria la prueba de inhibición con digitonina, donde *Mycoplasma* y *Ureoplasma* son sensibles y *Acholeplasma* es resistente. Para diferenciar entre *Ureoplasma* y *Mycoplasma* se realiza la prueba de urea en donde solo el *Ureoplasma* es positivo y por el tamaño de las colonias. (40)

3.-) La detección de *Mycoplasma* con la sonda específica de ADN en muestras clínicas (en lavados traqueobronquiales o en pulmones).Este método es rápido pero no suficientemente sensible (hasta  $10^{-6}$  células de *Mycoplasma*). La técnica de PCR, desarrollada recientemente incrementó significativamente la sensibilidad. Al mismo tiempo, reveló heterogeneidad entre las cepas. Sin embargo, la prueba diagnóstica basada en la PCR no ha logrado convertirse en una prueba de rutina para el diagnóstico de la infección por *M. hyopneumoniae*. Además de algunas grandes ventajas que tiene esta prueba, incluyendo el hecho de evitar la necesidad del cultivo de *Mycoplasma* y de inhibir el efecto de los antibióticos y bacterias presentes en las muestras clínicas, de la obtención del resultado en poco tiempo, aun antes de que haya una respuesta serológica. Son también importantes las desventajas de la prueba, tales como la complejidad del examen, la presencia de algunos resultados falsos positivos y falsos negativos. (33,41,48)

4.-) La serología también se utiliza para el diagnóstico en piaras. Para estos propósitos, con frecuencia se utilizaban, en un principio, las técnicas de fijación de complemento y de hemaglutinación indirecta, las cuales no resultaron ser suficientemente sensibles. La prueba indirecta de ELISA utilizando un antígeno soluble Tween 20 es muy sensible; sin embargo a menudo se observan reacciones cruzadas con anticuerpos con *Mycoplasma flocculare* y *Mycoplasma hyorhinis*, debido a que tienen las proteínas comunes p73 y p41. Son más específicas las pruebas basadas en el bloqueo con anticuerpos monoclonales para la técnica de ELISA, utilizando anticuerpos anti-p40 o anti-p70. Los anticuerpos se pueden detectar no solo en el suero (IgG) sino también en el calostro (IgA e IgG) o en el tracto respiratorio (IgA). (1, 7, 12)

En algunos casos también resulta útil la prueba de Western Blot para detectar anticuerpos contra antígenos inmunodominantes de importancia. Es posible demostrar la inmunidad mediada por células mediante pruebas tales como la de transformación de los linfoblastos. (33,48)

#### 1.4.- ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA)

La técnica ELISA fue descrita casi al mismo tiempo, en 1971 por dos equipos de trabajo diferentes, el de Engvall y Perlmann en Suecia y el de Van Weemen y Schuurs en Holanda. Es una de las técnicas de mayor aplicación en el área de patología animal, obteniéndose en todos los casos resultados muy favorables. (21,32).

Esta técnica es un inmunoensayo que permite determinar la concentración de un antígeno o un anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación de un complejo antígeno-anticuerpo mediante un trazador enzimático. (32)

Existen diferentes modalidades o clasificaciones de la técnica ELISA, sin embargo se describirán las más usuales:

### 1.- Método del emparedado o sandwich

Consiste en inmovilizar un exceso de anticuerpo en una fase sólida el cual es incubado con un control o muestra en la que se presume existe el antígeno; después de lavar el complejo antígeno- anticuerpo inmovilizado, se incubaba con un exceso de anticuerpo conjugado con la enzima, que se une a los sitios antigénicos remanentes.

Este segundo anticuerpo se puede usar sin marca y en este caso se usaría un tercer anticuerpo marcado específico para el anterior complejo. (,32)

### 2.- Método indirecto

El antígeno es fijado o inmovilizado en un soporte de fase sólida, se incubaba con el suero que contiene el anticuerpo, se lava y se añade el conjugado, que consiste en una antiinmunoglobulina conjugada con la enzima, de tal manera que reaccione contra el anticuerpo del complejo primario; se lava y se adiciona el sustrato. (21, 29)

### 3.- Método directo

El anticuerpo es inmovilizado en un soporte de fase sólida. Se adiciona una solución que contenga antígeno y antígeno conjugado con la enzima, se incuban y se lavan; la cantidad de antígeno conjugado con la enzima que reaccionó con el anticuerpo es medido por la hidrólisis del sustrato. (21,29,32)

Los soportes en los cuales se puede fijar el antígeno o el anticuerpo pueden ser partículas de nitrocelulosa, poliacrilamida, silicón, goma y plástico (polivinil, poliestireno, etc.) (32)

### 1.5.- DOT-ENZIMOINMUNOENSAYO (DOT-ELISA)

Las membranas de nitrocelulosa tienen la propiedad de fijar en forma no covalente una gran variedad de macromoléculas (principalmente ácidos nucleicos y proteínas) por lo que pueden ser utilizadas como fase sólida en enzimoinmunoensayos. Poseen la ventaja de requerir pequeñas cantidades de inmunoreactivos y la facilidad de ensayar distintas especificidades simultáneamente. (32)

#### FUNDAMENTO

El Dot-inmunoensayo consiste en adsorber sobre membranas de nitrocelulosa, del tamaño adecuado, pequeñas gotas de solución de antígeno (entre 1 y 5 ul) con unos 100 a 500 pg de antígeno purificado, limitando la zona de interacción a una pequeña área (diámetro aprox. 1mm). Luego de evaporar el diluyente, los sitios de unión de la membrana que no fijaron antígeno deben ser bloqueados por incubación con una proteína inerte, no relacionada con el sistema en análisis. Posteriormente, se realiza sobre las membranas una reacción inmunoenzimática mediante una de las metodologías ya descritas, utilizando en la última etapa una enzima o conjugado que catalice una reacción con producción de una sustancia insoluble en el solvente utilizado. De esta forma, en la zona de sembrado de antígeno se produce una coloración debida a la precipitación del producto formado, la cual contrasta contra el fondo blanco de la membrana en donde no hay antígeno. (21,32)

Se ha demostrado que antígenos tales como proteínas, ácidos nucleicos, membranas celulares, organelos, células (hongos, protozoos y bacterias) y virus, son capaces de fijarse a las membranas de nitrocelulosa. Se puede facilitar su unión con la presencia de detergentes no iónicos (Tween 20, Tween 80, Tritón X-100, etc.), siempre y cuando la concentración del detergente no exceda del 0.1 %. (32,52)

La positividad de las reacciones es determinada generalmente a simple vista, aunque para algunos casos puede ser útil un reflectómetro para la cuantificación de los resultados. (33)



## II.-OBJETIVOS

### 2.1.- Objetivo General:

-Desarrollar una prueba ELISA - DOT Tween 20 H - H para el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica producida por *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos.

### 2.2.- Objetivos Particulares:

2.2.1.- Producir y obtener el Antígeno Tween 20 de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

2.2.2.- Estandarizar la prueba de ELISA - DOT Tween 20 H-H para el diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos.

2.2.3.- Realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos de la prueba ELISA - DOT Tween 20 H - H contra un Paquete Comercial específico para el diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos.

### III METODOLOGIA

#### 3.1.- CULTIVO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* Y OBTENCION DEL ANTIGENO TWEEN 20.

Para el cultivo se utilizaron 2.5 lts de medio de Friis (anexo 1), el cual se inoculo con *Mycoplasma hyopneumoniae* (cepa 194 donada por el Dr. Ross de la Universidad de Iowa, E.U, esta cepa se inoculó en 3 ml de medio de Friis y se incubó 7 días se incubó durante 12 días a 37°C con agitación de 70 r.p.m.

Posteriormente se concentraron las células por centrifugación a 15,000 g, obteniéndose solo 3 g del sedimento los cuales se lavaron con 3 ml de amortiguador de fosfatos 0.025M a pH=7.5, conteniendo 1% de Tween 20, se incubó a 37°C durante 90 minutos en agitación.

Una vez transcurrido el tiempo, el sedimento con el Tween 20 se centrifugó a 20,000 g durante 60 minutos a 4 °C y se separó solo el sobrenadante; éste fue filtrado en una membrana Millipore de 0.22 u y se conservó a -70°C.

Esta preparación final es la determinada como Antígeno Tween 20 y su concentración de proteínas fue evaluado por el método de Bradford (1976).

#### 3.2.- ESTANDARIZACION DE LA TECNICA ELISA-DOT Tween 20 H-H PARA LA DETERMINACION DE *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La dilución óptima del Antígeno fue determinada por el empleo del método de diluciones dobles dimensionales (método de ajedrez).

1.-) Cortar tiras de papel inmovilón (Millipore) aproximadamente de 10 cm de largo y 0.5 cm de ancho (aproximadamente 20)

2.-) Hacer en tubos diluciones dobles del Antígeno Tween 20 de 1:2 hasta 1:60000 con amortiguador de carbonatos a pH= 8.5

3.-) Colocar las tiras en los carriles de las placas previamente sensibilizadas con metanol y marcar los carriles del 1 al 20 tanto en la parte superior como lateral para identificar las diluciones del Antígeno y las del Anticuerpo primario.

4.-) Una vez secas las tiras colocar las diluciones del Antígeno Tween 20 de arriba hacia abajo, dejar secar a 37°C en una incubadora aprox. 45 min. y realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno con solución de lavado (Caseinato de calcio al 0.1 % p/v en TBS)

5.-) Una vez secas, guardarlas en refrigeración durante 24 hrs.

6.-) Bloquear las tiras (Caseinato de Ca al 3% (p/v) en TBS), durante 30 min. en agitación.

7.-) Realizar 3 lavados de 5 min. c/u con solución de lavado (Caseinato de Ca al 0.1 % p/v en TBS).

8.-) Preparar diluciones dobles de 1:2 hasta 1:60000 del Anticuerpo secundario utilizando suero Hiperinmune de cerdo con *Mycoplasma hyopneumoniae* (proporcionado por el M.C Tonatiuh Cruz. FES-C, U.N.A.M.) con solución de anticuerpos (Caseinato de Ca 1% p/v , con 0.05% v/v Tween 20 en TBS).

9.-) Colocar 1 ml de cada dilución en su carril correspondiente durante 60 min. en agitación constante.

10.-) Realizar lavados como se indica en el paso 7.-)

- 11.-) Preparar el Anticuerpo secundario utilizando Anti-IgG de cerdo peroxidado obtenido de conejo; adsorbiéndolo con Antígeno Tween 20 1:2000 volumen a volumen durante 30 min. en baño María a 37° C (para eliminar reacciones inespecíficas).
- 12.-) Diluir el Anticuerpo Secundario 1:250 con solución de anticuerpos.
- 13.-) Colocar en cada carril 800 ul del Anticuerpo Secundario durante 60 min. en agitación constante.
- 14.-) Realizar lavados como se indica en el paso 7.-)
- 15.-) Revelar las tiras con solución de revelado preparada en el momento (cloronaftol 30 mg, metanol 10 ml, TBS 50 ml y peróxido de hidrógeno 50 ul (añadir 3 segundos antes del momento de revelar)).
- 16.-) Agregar 1 ml de la solución de revelado a todas las tiras, agitar durante no más de 20 minutos.
- 17.-) Lavar las tiras con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente.
- 18.-) Pegar las tiras en un papel y elegir la dilución óptima de Antígeno y Anticuerpo de la siguiente manera; elegir el último punto en donde se observe reacción positiva (morado) ; tanto en el antígeno como en el anticuerpo.
- 19.-) Con las condiciones obtenidas por el método de ajedrez correr la prueba con sueros controles.

### **3.3.- DETERMINACION DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EN 100 SUEROS DE CAMPO POR EL METODO ELISA - DOT Tween 20 H-H.**

Los 100 sueros de campo se eligieron al azar, provienen de diferentes granjas porcinas de los Estados de Yucatán, Tabasco y Michoacán.

- 1.-) Sensibilizar 100 tiras de inmobilon con el Antígeno Tween-20 1:4096 (10 ul por duplicado).
- 2.-) Bloquear con Caseinato de Calcio al 3% (p/v) en TBS, durante 1 hr en agitación.
- 3.-) Realizar 3 lavados de 5 min. c/u con solución de lavado (Caseinato de Ca al 0.1 % (p/v) en TBS)
- 4.-) Agregar 1 ml de cada uno de los sueros previamente diluidos 1:64 en solución de anticuerpos, durante 60 min. en agitación. (anticuerpo primario).
- 5.-) Realizar 3 lavados de 5 min. c/u con solución de lavado (Caseinato de Ca al 0.1 % (p/v) en TBS)
- 6.-) Preparar el Anticuerpo secundario utilizando suero de conejo Anti-IgG de cerdo peroxidado ; adsorbiéndolo con Antígeno Tween 20 1:2000 volumen a volumen durante 30 min. en baño María a 37° C (para eliminar reacciones inespecíficas).
- 7.-) Diluir el Anticuerpo Secundario 1:250 con solución de anticuerpos.
- 8.-) Colocar en cada carril 800 ul del Anticuerpo Secundario durante 60 min. en agitación constante.
- 9.-) Realizar 3 lavados de 5 min. c/u con solución de lavado (Caseinato de Ca al 0.1 % (p/v) en TBS)

10.-) Revelar las tiras con solución de revelado preparada en el momento (cloronaftol 30 mg, metanol 10 ml, TBS 50 ml y peróxido de hidrógeno 50 ul (añadir 3 segundos antes del momento de revelar)).

11.-) Agregar 1 ml de la solución de revelado a todas las tiras, agitar durante no más de 20 minutos.

12.-) Lavar las tiras con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente.

### **3.4.- DETERMINACION DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EN 100 SUEROS DE CAMPO POR EL METODO DE ELISA (CHEKIT-HYOPTST), PRUEBA COMERCIAL.**

La prueba comercial llamada Chekit hyoptest, fue elaborada por el Dr. Bommeli AG, Suiza, es una prueba rápida, simple y específica para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en suero, plasma o calostro, se fundamenta en el método de ELISA.

1.-) Realizar una predilución a cada suero y controles 1:100 en un tubo, usando solución dilutora de la prueba comercial.

Colocar 200 ul de los sueros y controles prediluidos en el pozo correspondiente por duplicado.

2.-) Cubrir la placa con una tapa e incubar por 90 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda.

3.-) Lavado de la placa.

-Después de la incubación, sacudir la placa y agregar a cada pozo aproximadamente 300 ul (solución de lavado) evitando la formación de burbujas.

-Repetir este procedimiento 2 veces.

- Sacudir la placa, vaciando los pozos.

- Golpear suavemente sobre un papel absorbente.

4.-) Dilución, distribución e incubación del conjugado.

- Diluir el Chekit-Peroxidasa (Conjugado) 1:200 usando solución de lavado-dilución.
- Colocar 200 ul de esta dilución dentro de cada pozo, cubrir e incubar 60 min. a temperatura de ambiente en una cámara húmeda.

5.-) Lavar como en el paso 3.

6.-) Adición del Chekit-cromógeno.

- Adicionar 200 ul del chekit-cromógeno precalentado a 25° C a cada pozo.

7.-) Lectura de los resultados.

- Leer los resultados con un fotómetro a una longitud de onda de 405 nm.
- La diferencia entre la D.O. del control (-) y control (+) es mayor o igual a 0.3 (ocurriendo esto dentro de 15 a 30 min. después de adicionar el cromógeno), la reacción se puede parar adicionando 50 ul de solución-stop a temperatura ambiente.

8.-) Interpretación de resultados.

- Sacar la media de la D.O de cada muestra, control (+) y control(-)
- Corregir todo con la D.O del control (-).

$$\text{Valor (\%)} = \frac{\text{D.O muestra} - \text{D.O negativo}}{\text{D.O positivo} - \text{D.O negativo}} \times 100$$

Valor	< 50%	50-70%	>70%
Interpretación	negativo	ambiguo	positivo

### **3.5.- IDENTIFICACION DE PROTEINAS DEL Antígeno Tween 20 H-H Y DE LA PRUEBA COMERCIAL EN GELES DE POLIACRILAMIDA.**

#### **1.-) Preparación de los Geles de poliacrilamida**

##### **TAPON**

**1 ml de poliacrilamida 30% en Tris-glicina pH= 8.8**

**6 ul de persulfato de amonio**

**3 ul de TEMED**

**Agregar 200 ul a la placa de corrimiento previamente tapada con cinta adhesiva para evitar la salida del tapon .**

##### **GEL SEPARADOR**

**5.9 ml de Trisma pH 8.8**

**4.2 ml de Bis-Acrilamida. Hacer vacío.**

**4 ul de TEMED**

**40 ul persulfato de amonio**

**Agregar 3.7 ml de la mezcla anterior y rellenar con alcohol isopropilico y esperar aproximadamente 20 minutos.**

**Enjuagar con agua desionizada.**



## GEL CONCENTRADOR

5.3 ml de Trisma pH=6.8

0.8 ml de Bis-Acrilamida. Hacer vacío.

8 ul de TEMED

80 ul de persulfato de amonio

Agregar lo necesario para colocar el peine contenedor de muestras.

2.-) Quitar los peines después de 20 min.

3.-) Quitar la cinta adhesiva

4.-) Realizar una precorrida con Tris-glicina (Glicina 0.192 M - Tris 0.125 M) a pH 8.3 durante 30 min a 15 miliampers, tirar la solución y agregar nueva.

5.-) Digerir los antígenos a una concentración de 1 ug/ul durante 1 minuto en ebullición al igual que los marcadores de pesos moleculares en solución digestora.

6.-) Colocar en los pozos 15 ul del marcador de peso molecular, 15 ul del antígeno Tween 20 y 15 ul del antígeno de la prueba comercial (este se obtuvo con varios lavados de la placa con solución digestora ) respectivamente.

7.-) Realizar la corrida a 15 miliampers durante 2 horas o hasta observar que las muestras llegan a la parte final del gel.

8.-) Sacar el gel y fijarlo con metanol al 50% durante 2 horas

9.-) Revelar el gel con nitrato de plata.

## REVELADO DEL GEL

- 1.-) Hidratar el gel con agua destilada durante 30 minutos.
- 2.-) Preparar en un vaso de precipitados de 250 ml la siguiente mezcla:
  - 30 ml de hidróxido de sodio 0.1M
  - 2 ml de hidróxido de amonio
- 3.-) Agregar gota a gota 1 g de nitrato de plata disuelta en 5 ml de agua, más 115 ml de agua destilada.
- 4.-) Agregar la mezcla anterior al gel y agitar vigorosamente durante 10 minutos.
- 5.-) Realizar dos lavados de 1 minuto con agua destilada
- 6.-) Agregar el revelador preparado de la siguiente manera:
  - En un matríz aforado de 1 litro agregar:
    - 50 mg de ácido cítrico monohidratado (disolver)
    - 1 ml de formaldehído
    - aforar con agua destilada.
- 7.-) Agregar 400 ml del revelador al gel y agitar hasta aparición de bandas.
- 8.-) Parar la reacción con 10 ml de ácido acético en 200 ml de agua desionizada.

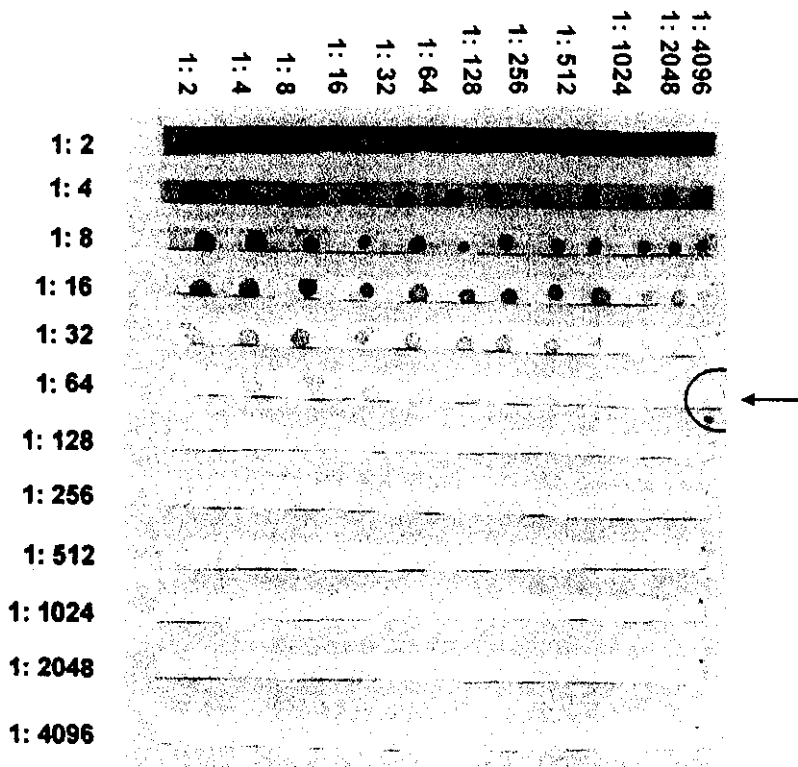
#### IV RESULTADOS Y OBSERVACIONES

Al determinar la concentración de proteínas presentes en el Antígeno Tween 20 por el método de Bradford (1976), se obtuvieron 556 ug/ml.

En la figura 3.0 se puede observar el tablero de ajedrez para estandarizar el método de ELISA-DOT Tween 20 H-H de donde se establecieron las siguientes condiciones de trabajo representados en la siguiente tabla.

Concentración del Antígeno Tween 20 :	1:4096
Concentración del Anticuerpo primario:	1:64
Concentración del Anticuerpo secundario:	1:250
Sensibilización del Antígeno Tween 20:	30 min a 37° y 24 hrs a 8°C
Tiempo de bloqueo:	1 hr.
Tiempo de Anticuerpo primario:	1 hr.
Tiempo de Anticuerpo secundario:	1 hr.
Lavados:	3 lavados de 5 minutos cada uno.
Revelado:	20 min.

## Tablero de Ajedrez



Dilución de Anticuerpo Primario (Suero Hiperimmune)  
Dilución de Antígeno (Tween 20)

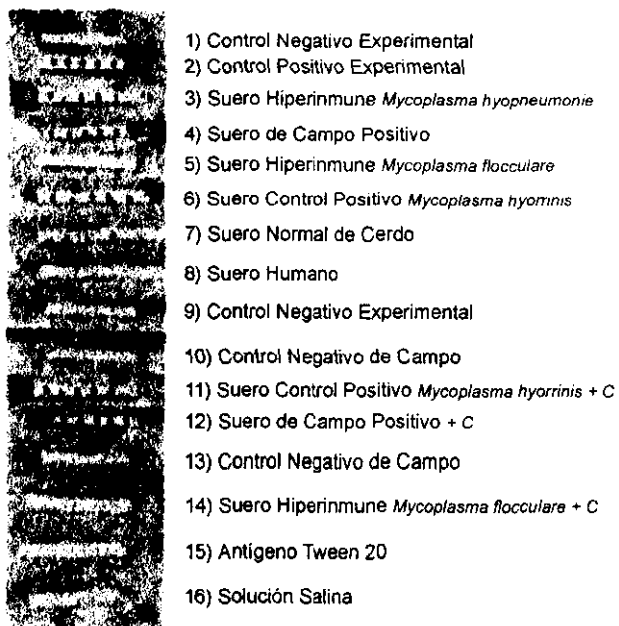
**Figura 3.0.** Estandarización de la prueba ELISA-DOT Tween 20 H-H por el método de Ajedrez. Los números azules indican las diluciones del Anticuerpo primario (suero Hiperimmune de cerdo con *Mycoplasma hyopneumoniae*). Las letras rojas indican las diluciones del Antígeno Tween 20. La flecha indica las diluciones óptimas; del Anticuerpo primario es 1:64 y del Antígeno Tween 20 es 1: 4096.

## RESULTADOS DE SUEROS CONTROLES

Se evaluaron 8 sueros controles por el Método de ELISA-DOT Tween 20 H-H, los cuales fueron obtenidos e identificados de la siguiente manera: 1) suero control experimental negativo proporcionado por el M.C. Tonatiuh Cruz, 2) Suero control experimental negativo proporcionado por el M.C. Tonatiuh Cruz, 3) Suero hiperinmune de *Mycoplasma hyopneumoniae* de cerdo; animales inoculados con la cepa 194 que resultaron positivos con aislamiento e inmunofluorescencia, proporcionado por el Dr. Abel Ciprian y M.C Tonatiuh Cruz, 4) Suero de campo positivo con aislamiento e inmunofluorescencia positiva, 5) Suero hiperinmune de *Mycoplasma flocculare* a partir de un cerdo inoculado con un lisado de bacterina proporcionado por la Coordinación de Posgrado, 6) Control positivo de *Mycoplasma hyorhinis* en aislamiento y aglutinación proporcionado por M.V.Z Horacio Lara, 7) Suero Normal de Cerdo (suero comercial), 8) Suero Humano de una persona sin contacto con los cerdos. Apartir del suero 9 al 14 fueron tratados con caolín para quitar inespecificidades ; la muestra 15) Antígeno Tween 20 a 1:4096, y 16) Solución salina.

Los resultados se observan en la Figura 3.1 en donde la presencia de cualquier punto violeta es indicación de positividad, cada prueba se realizó 5 veces, cada tira de inmobilón tiene 10 ul de antígeno Tween 20.

Solo 5 de los sueros controles se evaluaron por la prueba comercial estos fueron el suero Hiperinmune de *Mycoplasma hyopneumoniae* el cual resulto positivo, el suero Hiperinmune de *Mycoplasma flocculare* el cual resultó negativo, el suero control positivo de *Mycoplasma hyorhinis* el cual resultó negativo, suero normal de cerdo el cual resultó positivo y suero humano el cual resultó negativo.



**Fig. 3.1.** Evaluación de la prueba ELISA-DOT Tween 20 H-H con diferentes sueros controles.

## RESULTADOS DE LOS 100 SUEROS DE CAMPO PROVENIENTES DE LOS ESTADOS DE YUCATAN, TABASCO Y MICHOACÁN

En la determinación de Anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* por el método de ELISA-DOT Tween 20 H-H en los 100 sueros de campo, se obtuvo un 95% de sueros positivos los cuales se observan con la formación de un punto violeta y un 5% de sueros negativos en los cuales no se observa presencia de coloración; esto se muestra en la figura 3.2. y tablas 4.1 a,b y c .

Los mismos 100 sueros de campo se evaluaron con una prueba comercial para el diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Chekit hyoptest) y se obtuvo un 36% de sueros positivos, un 61% de sueros negativos y un 3 % de sueros dudosos. (ver figura 3.3).

La correlación entre ambas pruebas es de un 41%, esto significa que solo 38 de los 100 sueros coinciden con el mismo resultado en ambas pruebas y esto se representa en la tabla 4.0.

	ELISA-DOT H-H	PRUEBA COMERCIAL
Positivos	95%	36%
Negativos	5%	61%
Dudosos	0%	3%

Correlación entre ambas pruebas: 41%

Tabla 4.0 Porcentaje de correlación entre ambas pruebas.

RESULTADOS		
SUERO	ELISA-DOT H-H	Pbe. comercial
1	+	+
2	+	-
3	+	-
4	+	-
5	+	+
6	+	+
7	+	-
8	+	-
9	+	-
10	+	+
11	+	-
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	-
18	+	-
19	+	-
20	+	-
21	+	-
22	+	+
23	+	-
24	+	-
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	+	+
29	+	+
30	+	+
31	+	-
32	-	-
33	+	-
34	+	+
35	+	-
36	-	-
37	+	-
38	+	-

Tabla 4.1 a Correlación entre ambas pruebas en 100 sueros de campo



RESULTADOS		
SUERO	ELISA-DOT H-H	Pba. comercial
39	+	+
40	+	+
41	+	-
42	+	-
43	+	-
44	+	-
45	+	+/-
46	+	-
47	+	+/-
48	+	-
49	+	-
50	+	-
51	+	-
52	+	-
53	+	-
54	+	-
55	+	-
56	+	-
57	+	-
58	+	-
59	+	+/-
60	+	+
61	+	-
62	+	+
63	+	-
64	+	-
65	+	-
66	+	-
67	-	-
68	-	-
69	+	-
70	+	-
71	-	-
72	+	-
73	+	-
74	+	-
75	+	-
76	+	-
77	+	+
78	+	+
79	+	+
80	+	+

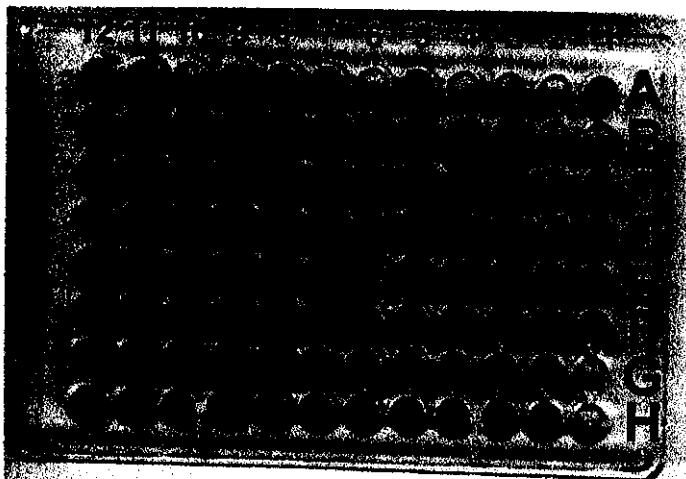
Tabla 4.1 b Correlación entre ambas pruebas en 100 sueros de campo

RESULTADOS		
SUERO	ELISA-DOT-H	Pbs. comercial
81	+	+
82	+	+
83	+	+
84	+	+
85	+	-
86	+	-
87	+	+
88	+	-
89	+	+
90	+	-
91	+	+
92	+	-
93	+	-
94	+	+
95	+	-
96	+	+
97	+	+
98	+	+
99	+	-
100	+	-

Tabla 4.1 e Correlación de ambas pruebas en 100 sueros de campo.



**Figura 3.2.** Determinación de *Mycoplasma hyopneumoniae* en 100 sueros de campo provenientes de Yucatán, Tabasco y Michoacán, por el método ELISA-Dot Tween 20 H-H. Cada tira se encuentra impregnada con 10  $\mu$ l de Antígeno Tween 20, la presencia de cualquier mancha violeta indica que la muestra es positivo.



**Figura 3.3.** Determinación de *Mycoplasma hyopneumoniae* en 100 sueros de campo provenientes de Yucatán, Tabasco y Michoacán con una prueba comercial (Chekit hyoptest). Los sueros positivos aparecen de color más intenso. En los carriles 1A y 1B se encuentra el control positivo. En el resto de los carriles se encuentran los sueros de campo evaluados por duplicado.

## DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD.

Se determinó la sensibilidad que existe entre ambas pruebas; se obtuvo un 100% de sensibilidad y un 8.3% de especificidad, lo que indica que la prueba ELISA-DOT Tween 20 H-H es sumamente sensible, pero altamente inespecífica.

Los resultados se obtuvieron con la correlación positiva como negativa de ambas pruebas; por ejemplo entre la prueba ELISA-DOT Tween 20 H-H y la prueba comercial coinciden 35 muestras positivas y 5 negativas, y no coinciden 60 muestras. (ver tabla 4.2)

ELISA-Dot Tween 20 H-H	PRUEBA COMERCIAL	
	POSITIVOS	NEGATIVOS
POSITIVOS	A 36	B 55
NEGATIVOS	C 0	D 5

DUDOSOS= 4

Tabla 4.2 Determinación de la sensibilidad y especificidad comparativa

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

Sensibilidad comparada=  $A/A + C \times 100$

Sensibilidad comparada=  $36 / 36 + 0 \times 100 = 100\%$

Especificidad comparada=  $D/B + D \times 100$

Especificidad comparada  $5 / 55 + 5 \times 100 = 8.3 \%$

=

**SENSIBILIDAD:** (+) posibles enfermos entre (+) posibles enfermos más (-) posibles enfermos por 100.

**ESPECIFICIDAD:** (-) posibles sanos entre (+) posibles sanos más (-) posibles sanos por 100.

## DETERMINACION DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE AMBAS PRUEBAS

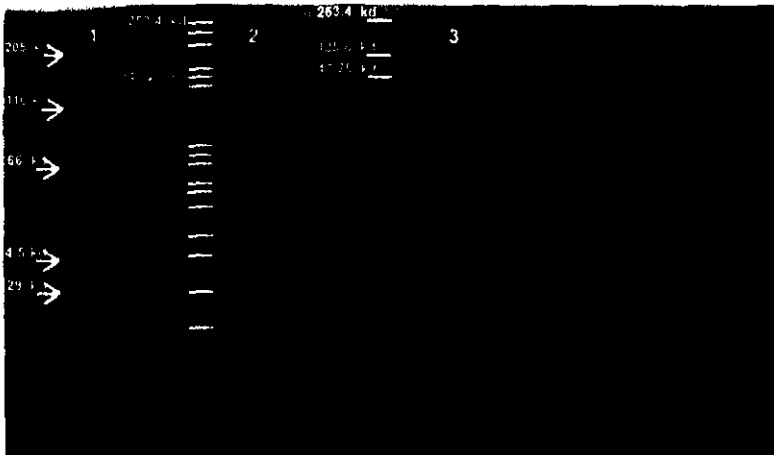
Por medio de una electroforesis en gel se identificaron las proteínas presentes en el Antígeno Tween 20 H-H y en el Antígeno de la prueba comercial; en el Antígeno Tween 20 se observaron 16 bandas proteicas, sin embargo en el Antígeno de la prueba comercial solo se observan 3 bandas proteicas.

En la Tabla 4.3 se muestran los pesos moleculares de las proteínas de ambos Antígenos, en los cuales se presentan 2 bandas proteicas del mismo peso molecular la de 253.48 kd y la de 147.24 kd esto se observa en la figura 3.4.

PESOS MOLECULARES	
PBA. COMERCIAL	Tween 20 H-H
253.48	253.48
185.84	234.56
147.26	200.83
	159.13
	147.24
	136.27
	92.43
	79.16
	73.23
	58.02
	53.86
	45.96
	36.41
	33.7
	26.7
	21.15

**Tabla 4.3** Pesos moleculares presentes en el Antígeno Tween 20 H-H y en el Antígeno de la prueba comercial

# Gel de Poliacrilamida



**Figura 3.4.** Gel de poliacrilamida donde se muestran 1) pesos moleculares, 2) 16 bandas proteicas presentes en el Antígeno Tween 20, 3) 3 bandas proteicas presentes en el Antígeno de la prueba comercial.

## V DISCUSION

En la actualidad existen una gran cantidad de factores que facilitan el desarrollo de la Neumonía Enzoótica como son: el diagnóstico, tratamiento y una vacunación inoportuna. Esta falta de información se debe; en parte, a la escasez de pruebas suficientemente sensibles y específicas para detectar la presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos vivos. (43)

Existe una gran serie de métodos de diagnóstico para *Mycoplasma hyopneumoniae* como es la fijación de complemento, aglutinación en tubo, hemaglutinación indirecta, aglutinación en látex, ELISA, etc.; sin embargo los resultados obtenidos por estas pruebas a menudo son difíciles de interpretar y además no se tiene la seguridad sobre su sensibilidad y especificidad; por lo que el médico veterinario o porcicultor limita el diagnóstico en los signos o síntomas que el cerdo presente. (1,15,28,44,46)

Ante este problema la Coordinación de Estudios de Posgrado en la FES- Cuautitlán creó el programa de "Inmunodiagnóstico de la Neumonía Enzoótica". Como parte de este proyecto se desarrolló la prueba de ELISA-DOT Tween 20 H-H, la cual intentó plantearse como una alternativa viable para el diagnóstico rutinario de esta enfermedad.

Bruggman (1977) propuso una prueba de ELISA, que ofrece mayor sensibilidad y que puede ser una posibilidad para monitorear el desarrollo de la infección, midiendo la respuesta inmune en animales. Sin embargo, la sensibilidad del método depende en el 100% del uso de antígenos de buena calidad los cuales no deben revelar dudas u originar reacciones inespecíficas. (5)

El uso de un ensayo inmunoabsorbente para la investigación serológica de Neumonía Enzoótica, ciertamente contribuye a una mejor comprensión de la zootiología y ofrece una herramienta para el control de esta enfermedad, la base de este ensayo es tratar al *Mycoplasma* con agentes tensoactivos como Tween 20 para



obtener el antígeno de la membrana celular (proteínas solubilizadas selectivamente) el cual, supuestamente es el más inmunogénico en el curso de una infección. (36) Para elegir el tensoactivo adecuado se deben considerar dos puntos para la solubilización de proteínas de membrana, 1) Las proteínas de superficie de membrana las cuales tienen que ser separadas y absorbidas, 2) Las proteínas de superficie de la membrana que tienen que ser extraídas de la bicapa lipídica y que están más o menos profundas ligadas por un enlace covalente. (30)

Bruggman y Armstrong (1977) describen una prueba de ELISA, en la que utilizan antígeno solubilizado con SDS, por su parte Nicolet (1980) describe la preparación de un antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* que contiene proteínas seleccionadas, después del tratamiento de las células con un agente tensoactivo no iónico, Tween 20 el cual es comparado con un preparado antigénico de células completas. El antígeno Tween 20, tiene la capacidad de solubilizar las proteínas de membrana selectivamente, es un derivado del óxido de etileno y puede reaccionar con cualquier compuesto que contenga hidrógeno, es prácticamente infinita la variedad de compuestos de diferente hidrofobicidad que pueden obtenerse. Los agentes tensoactivos se absorben fuertemente a las proteínas y superficies cargadas negativamente (52), en especial aquellas que están expuestas sobre la superficie de la célula; en comparación con el SDS que es menos selectivo ya que se obtienen estructuras celulares de manera general. El tratamiento de las células con el Tween 20 dio los mejores resultados, pero las reacciones inespecíficas no se eliminaron por completo. (36,37)

Estas reacciones se ven reflejadas en el análisis comparativo entre la prueba ELISA-DOT Tween 20 H-H y la prueba comercial; ambas evaluaron a 100 sueros de cerdo, algunos de ellos provenientes de cerdos que mostraban signos y síntomas de Neumonía Enzoótica, presentaron una especificidad comparativa del 8.1 %, esto significa que el 55% de los sueros dan resultados falsos positivos. En cuanto a la sensibilidad comparativa, se muestra un 100%, esto indica que la prueba es altamente sensible pero inespecífica. La correlación que existe entre ambas pruebas es del 41%; esto significa que solo 41 muestras de los 100 sueros coinciden en las

dos pruebas. Es importante mencionar que el método de ELISA-DOT solo requiere 100 pg de antígeno purificado para la reacción antígeno - anticuerpo, la prueba comercial se fundamenta por el método ELISA-plate la cual requiere 0.1 ng de antígeno purificado para la reacción antígeno-anticuerpo; lo que hace mucho más sensible al método ELISA-DOT. (54)

Así mismo al analizar los sueros controles, se observa que el antígeno Tween 20 muestra reacción cruzada con el suero control positivo de *Mycoplasma hyorhinis* al igual que con el suero normal de cerdo; ambos sueros se evaluaron con la prueba comercial, únicamente el suero normal de cerdo es positivo en ambas pruebas, esto significa que existen anticuerpos naturales del cerdo que se unen inespecíficamente a los antígenos de las pruebas dándonos falsos positivos. (ver tabla 5.0) En 1994 Levonen probó la especificidad de una prueba comercial en la cual utilizan como base el antígeno Tween 20 fijado en placas y encontró reacción cruzada con *Mycoplasma hyorhinis*. (1,29)

SUEROS CONTROLES		
Suero	ELISA DOT H-H	Plta comercial
H.M.h.	+	+
H.M.f	-	-
S.H	-	-
S.N.C	+	+
S.C.M.h	+	-

Clave:

H.M.h Suero Hiperinmune de *Mycoplasma hyopneumoniae*

H.M.f Suero Hiperinmune de *Mycoplasma flocculare*

S.H Suero humano

S.N.C Suero normal de cerdo.

S.C.M.H. Suero control positivo de *Mycoplasma hyorhinis*

Tabla 5.0 Evaluación de 5 sueros controles en ambas pruebas

En 1989 Kazama, describe un método para la obtención de antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* más purificados para ser utilizados en la prueba de ELISA, con el fin de detectar anticuerpos específicos contra *Mycoplasma*

*hyopneumoniae*; así como las propiedades de estos. Determinó que el antígeno obtenido a partir de células tratadas con Tween-20 (Nicolet 1980) y sometido a columna de cromatografía con Sephacril S-300, fue superior en cuanto a su reactividad en comparación con los antígenos obtenidos con SDS y Tween 20 pero sometidos en cromatografía de columna con Sephadex G-25. (26) Esto fue evaluado por medio de una electroforesis SDS-PAGE en donde cada una de las proteínas de los antígenos Tween 20 y SDS fueron cuantificados; se obtuvieron 6 proteínas del antígeno Tween 20 purificado con Sephacril S-300, sin embargo se encontraron 14 y 24 proteínas de los antígenos Tween 20 y SDS purificados por Sephadex G-25 respectivamente (26).

Por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida se evaluó el antígeno Tween 20 del método ELISA-DOT y el antígeno de la prueba comercial. En el antígeno Tween 20 se obtuvieron 16 bandas proteicas de las cuales la de 253 kd, 234 kd y 200 kd corresponden a enzimas de la membrana, las bandas proteicas de 159 kd, 136 kd y 147 corresponden a adhesinas o lectinas; pesos moleculares entre 44 y 65 kd se tratan de proteínas con ácidos grasos incorporados del suero de caballo como es el ácido palmítico y ácido oleico ( 19,30, 45,53)

En estudios anteriores se demostró por medio de una inmunoelectrotransferencia la respuesta de anticuerpos contra células de *Mycoplasma hyopneumoniae* solubilizadas con Tween 20, se detectaron anticuerpos para 5 antígenos cuyos pesos moleculares se estimaron entre 110 kd, 74 kd, 64 kd, 50 kd, 41 kd y 37 kd. Estas proteínas se enfrentaron con suero hiperinmune de *Mycoplasma flocculare* y *Mycoplasma hyorhinis*. El *Mycoplasma flocculare* mostró reacción cruzada con las proteínas de 110kd, 64kd y 41 kd., en el antígeno Tween 20 no se presentan proteínas con estos pesos moleculares, lo que justifica el porque no hay reacción cruzada con el suero hiperinmune de *Mycoplasma flocculare*. El suero hiperinmune de *Mycoplasma hyorhinis* mostró reacción cruzada con la proteína de 37 kd; la cual si está presente en el antígeno Tween 20 lo que justifica la reacción cruzada con el suero control positivo de *Mycoplasma hyorhinis*. La proteína de 37 kd forma parte del

sistema de transporte de proteínas de alta afinidad de *Mycoplasma hyorhinis* (13,19,30, 50).

Una de las proteínas más importantes que se identificó a partir del antígeno Tween 20 fue la de 54 kd, ya que en estudios anteriores esta proteína fue identificada como un factor citopático del *Mycoplasma hyopneumoniae*; ésta proteína se ha purificado a partir de la membrana del *Mycoplasma* aislado de células con fibrosarcoma en ratones (18,30), es solo específica de *Mycoplasma hyopneumoniae* y es una alternativa para purificación y utilización de diagnóstico.

Se sabe que en la membrana de *Mycoplasma hyopneumoniae* y los *Ureoplasmas* se encuentran unas proteínas no enzimáticas que decifran la información contenida en la estructura de los carbohidratos, estas proteínas de pesos moleculares por arriba de los 100 kd se denominan lectinas. Las lectinas tienen la capacidad de ligar carbohidratos del suero de caballo del medio de cultivo, creando una contaminación, ésta adsorción de proteínas se debe a la baja del pH por la fermentación que ocurre en el medio de cultivo para el desarrollo del *Mycoplasma*. Algunas de estas proteínas exógenas se confunden con las verdaderas proteínas de membrana dando origen a reacciones cruzadas. In vivo éstas lectinas son utilizadas por el *Mycoplasma* para evadir la respuesta inmune en los cerdos ya que pueden ligar anticuerpos propios del animal de manera inespecífica.(30,34,45).

Todo método de diagnóstico serológico debe cumplir con los siguientes parámetros; específico, sensible, rápido, económico y fácil de utilizar. No cabe duda que el método de ELISA - DOT es ampliamente utilizado en el diagnóstico de enfermedades veterinarias y en el caso de la Neumonía Enzootica es posible establecer este método siempre y cuando el antígeno Tween - 20 de *Mycoplasma hyopneumoniae* este purificado totalmente y que no presente reacción cruzada con otros *Micoplasmas*. Esto es posible identificando y purificando la proteína de 54 kd que solo esta presente en el *Mycoplasma hyopneumoniae* y no en otras especies de *Micoplasmas* .

Se propone realizar una inmunoelectrotransferencia de las 16 proteínas y enfrentarlas con diferentes sueros hiperinmunes con anticuerpos de cerdos con *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma flocculare* al igual con sueros normales de cerdo, sueros de cerdos vacunados y con el alimento de los cerdos para descartar toda reacción cruzada y elegir la proteína específica.

En cuanto a costos es una prueba que a comparación a las del mercado es económica, la prueba comercial Chekit-hyoptest tiene un costo de 7,000 pesos para la determinación de 500 pruebas, y la realización de la prueba de ELISA-Dot Tween 20 H-H tubo un costo de aproximadamente 3,500 pesos para la determinación de más de 1500 pruebas.

Lo anterior es un trabajo de investigación que ya se está realizando en Posgrado de FES-Cuautitán, solo queda esperar el resultado y estandarizar nuevamente la técnica para que pueda ser enfrentado con diferentes muestras y así sea utilizado como un método de diagnóstico rutinario que el mismo porcicultor o veterinario lo utilice en la granja.

## VI CONCLUSIONES

El uso de la prueba ELISA-DOT Tween 20 H-H puede ciertamente contribuir a la investigación serológica de la Neumonía Enzoótica ya que es rápida, económica y fácil de utilizar; pero requiere una valoración más completa del antígeno antes de ofrecerla como prueba de diagnóstico, sin embargo, tiene la ventaja de ser desarrollada en el país, lo que la hace prometedora.

Con base a los resultados obtenidos y el análisis de los mismos se concluye lo siguiente:

- El análisis comparativo demuestra que existe una gran diferencia entre los resultados de ambas pruebas; debido a que el Antígeno Tween 20 requiere de una valoración completa, proponiéndose un proceso de purificación adicional por medio de Sephacril S-300 .

- Se obtuvo una sensibilidad y especificidad comparativa del 100% y 8.3 % respectivamente. La diferencia entre los resultados se atribuye a reacciones inespecíficas, incluyendo reacciones cruzadas con el antígeno Tween 20.

- La purificación de la proteína de 54 kd es una excelente opción para el diagnóstico específico de la Neumonía Enzoótica, con ella se puede nuevamente estandarizar el método ELISA-DOT y crear una prueba comercial con una alta sensibilidad y especificidad.

## ANEXO

### 1.- PREPARACION DE MEDIO DE FRIIS para el crecimiento de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

1.- Preparar la base del medio para esterilizar en autoclave a 115 lb de presión durante 15 minutos.

PARA	1000ml
Solución de Hanks pH7.5 (ml)	304
Agua desionizada	450
Infusión de cerebro-corazón	5 g
PPLO Caldo	5 g
Rojo de fenol al 22%	7ml
DNA	1 g
Lactoalbúmina 1 g por 1000 ml de medio	
Agar (medio sólido)	10g
Penicilina	2000 unidades /ml de medio

2.- Previamente esterilizar por filtración usando papel Millipore 0.22, suero inactivado de caballo (inactivar 56°C durante 15 min.) y extracto de levadura.

PARA 1000ml

Extracto de levadura (ml) 36

Suero inactivo de equino (ml) 200

3.-) Colocar todo en prueba de esterilidad a 37°C , durante 24 hrs.

4.-) Una vez aprobada la prueba de esterilidad, en una campana de flujo laminar con todas las condiciones de esterilidad, mezclar el medio base, el extracto de levadura y el suero inactivado de equino.



**GLOSARIO (58)**

**D.O.-** Densidad óptica.

**ELISA.-** Ensayo inmunológico ligado a una enzima

**Enzoótica.-** Enfermedad específica de una especie.

**Especificidad diagnóstica.-** Capacidad de la prueba para ser negativa en individuos sanos.

**Especificidad analítica.-** Es la capacidad de la prueba para reaccionar solo con la sustancia de interés.

**H-H.-** Término personal de la autora del trabajo.

**Morbilidad.-** Es el número de individuos o animales enfermos en determinada zona.

**Mortalidad.-** Es el número de individuos o animales que mueren en determinada zona a causa de una enfermedad común.

**ng:** Nanogramos  $1 \times 10^{-9}$  mg.

**pg.-** Picogramos  $1 \times 10^{-12}$  mg.

**Sensibilidad diagnóstica.-** Capacidad de la prueba para ser positiva en individuos enfermos.

**Sensibilidad analítica.-** Es la capacidad de la prueba para detectar pequeñas cantidades de una sustancia o pequeños cambios en su concentración.

**TBS.-** Solución Buffer de Trietanolamida.

**Zootiología.-** Enfermedad que afecta a una población de animales en determinada zona y se propaga rápidamente.

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

## VII BIBLIOGRAFIA

1. Armstrong, C.H., Freeman, M.J. (1983) *Comparison of the ELISA and indirect hemagglutination and complement fixation test for detecting antibodies to Mycoplasma hyopneumoniae*. Can.J.Com. Med. 47:464-470.
2. Betts, A.O., 1982, *Respiratory diseases of pigs, some clinical and epidemiological aspects of virus pneumonia of pigs*. Vet. Rec. 64:283-288.
3. Biberstein Ernest L., D.V.M., (1990), *Review of Veterinary Microbiology*, Edit. Blackwell Scientific, Calif. U.S.A, p.p. 213-221.
4. Blood, D.C. (1987) *Medicina Veterinaria*. 6ª. Edición, Edit. Interamerica, Mex. p.p. 765-770.
5. Bruggman, H.K., Bertschinger, B.E. (1977) *Quantitative detection of antibodies to Mycoplasma hyopneumoniae in SPF pigs, sero by an enzyme-linked immunoabsorbent assay*. Vet. Record. 109-11.
6. Cassell, G.H., Clyder Jr., Davis, J.K. (1985). *The Mycoplasmas*. Vol. IV. Academic Press. Inc. U.S.A. p.p. 4 y 65-105.
7. Gatty, D., Raykundalia, C. (1990). *Antibodies*. Vol 2. (Antibodies a practical approach). Oirl Press. Oxford USA. pag. 97-153.
8. Ciprián, A., T. Cruz, M. de la Garza. (1993) *Mycoplasma hyopneumoniae: Experimental Intersection with Pasteurella multocida In Pneumonia and Evaluation of the immunogenos*. Simposium: Immunity, vaccines of Infections Diseases. CINVESSTAV-CUBAN. Academy of Sciences. 11 al 15 de Octubre.
9. Cruz, S.T. (1994) *Neumonía Enzootica en México*, Nuestro acontecer porcino. 8:22-32.
10. Cruz, S.T (1994). *Desarrollo de las técnicas de Inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa para detección de Mycoplasma hyopneumoniae en tejido pulmonar*. Memorias del 1er. Ciclo Nacional de afecciones respiratorias del cerdo. Edit. Abel Ciprian, Susana Mendoza y Claudia Garcia. Mérida Yucatán. Mex. p.p 38-45.
11. DeBe y, M.C, Jacobson, D.C, Ross R.F (1992) *Histochemical and morphologic changes of porcine air way epithelial cells in response to infection with Mycoplasma hyopneumoniae*. Am.J. Vet. Res 53(9):1705-1710.
12. Doster, R. A., Changlin, B. (1988) *Identification of Mycoplasma hyopneumoniae in formalin fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method*. Am.J.Vet.Res. 49(10): 1719-1721.

- 13.- Dudler, R., C. Schmidhauser, R.W. Parish,(1988) ***Mycoplasmas high-affinity transport sistem and the in vitro invasiveness of mouse sarcomm.cells.*** EMBO.J. 7:3963-3970.
14. Edward,D.G y E.A. Freundt,1956. ***The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group,*** J. Gen. Microbiology 14:197-207 .
15. Falk,K, Hoje. Lium.B.M (1991).***An abotoir survey of pneumonia an pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. II Enzootic pneumonia for pigs: Microbiolical findings and their relationship to pathomorphology.*** Ac. Vet. Scan. 32: 67-77.
16. Friis N. F. (1973). ***Some recomendations concerning primary isolation of Mycoplasma hyopneumoniae and Mycoplasma flocculare.*** Nord.Vet.Med. 27:337-339.
17. García R.O. (1988) ***Enfermedades de los cerdos.*** Edit. Trillas, Mex. p.p 100-104.
18. Geary, S.J. and E. Mwalezak (1985). ***Isolation of a cytopathic factor from Mycoplasma hyopneumoniae.*** Infect. Immunology. 48:576-578.
19. Gilson, E., G. Ailoing, T. Schmidt, (1988) ***Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in Gram positive bacteria and Mycoplasma,*** EMBO j. 7:3971-3974
20. Goodwin,Rf.W. (1972). ***Isolation of Mycoplasma sulpneumoniae from the nasal cavities and lungs of pigs affected whit enzootic pneumonia or exposed to this infecton.*** Res.Vet. Sci, 13:262-267.
21. Hernández Froilan,(1997) ***Determinación de Neumonía Enzoótica por el método ELISA indirecto,*** Tesis, FES-Cuautitán campo 4, p.p 25-37.
22. Hovind Hougen K., Friis, F. N. (1991) ***Morfophogical and ultraestructural studies of Mycoplasma flocculare and Mycoplasma hyopneumoniae.*** Res.Vet.Sci, 51:155-163.
23. Ilgen D. Leman, (1987), ***Diseases of swine,*** 7ª Edición, Editorial Press/ames, Iowa E:U. p.p. 537-551
24. Jericho, K,w.f. (1986) ***Pathogenesis of Mycoplasma hyopneumoniae swine.*** Can J. Vet. Res. 50:136-137.
25. Jubb, k, Kenedy,C.P (1990) ***Pathology of domestic Animals.*** Vol 4 Tird Edition. Academic press Inc. USA. Pag. 511-531.

26. Kazama,S.,Yagihashi. T., Seto, K (1989). *Preparation of Mycoplasma hyopneumoniae antigen for the enzyme-linked immunoabsorbent assay* Can J. Vet.Res. 53 (176-181).
27. Lium, B.M, Falk. (1991) *An abattoir survey of pneumonia an pleuritis in slaughter weight swine from a selected herds. Prevalence an morphological description of gross lung lessions.* Act. Vet. Scand 32:55-66.
28. Lloyd,L.C., Badman,R.T., Etherdge,J.R., (1984) *Assessment of a complement fixation rest to detect Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs.* Aus.Vet.J. 61(7): 216-218.
29. Levonen, K. (1994). *Detection of Enzootic Pneumonia In pigs herds using an enzyme linked Inmunosorben assay in sow calostrum.* Res. Vet. Sci. 56:111-113.
30. Maniloff Jack,(1992), *Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis*, Edit. American Society form Microbiology, Washington, D.C, p.p. 4-15.
31. Maré,C.J. and Switer, W.P. 1965. New species, *Mycoplasma hyopneumoniae* a causative agent virus pig pneumonia. Vet. Med. 60:841-846.
32. Margini A Ricardo (1990) . *Inmunologia e Inmunoquimica.* 4ta Ed., Editorial Panamericana, Arg. Pag, 571-586.
33. Morilla González Antonio. *Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos*, Edit. Inifap Sagar, México 1997, p.p. 58-63
34. Mouches C., J. C. Vighautt (1982), *Characterizacion of Mycoplasmas by one-and two dimensional protein analysis on polyacrilamide slab gels.* Curr. Mycobiol. 2:69-74.
35. Necochea R.R, Piojan C, (1987). *Enfermedades de los cerdos.* De. Diana Técnico. Pag. 290-296.
36. Nicolet, J.,Paroz, P. (1980) *Tween 20 soluble protein o Mycoplasma hyopneumoniae as antigen for an enzyme linked inmunosorben assay.* Res. Vet. Sci. 29:305-309.
37. Nicolet, J. (1985) *Compendio de bacteriología veterinaria* . Acribia España. Pag 225-241.
38. Piojan C. (1985). *Avances en las enfermedades del cerdo.* Edit. Asociacion Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos, Mex. Pag: 85-96.
39. Poiton, Am.,Byrt, D an Heap,P. (1985). *Effect of Enzootic Pneumonia of pigs on growth performace.* Aus.Vet.J. 62(1): 13-18.

40. Quinn P,J.,M.E. Carter,(1994), *Clinical Veterinary Microbiology*, Editorial Wofe, Virginia E.U., p.p.320-326.
41. Sanchez-Vizcamino J.M., Alvarez, M. (1987). *Técnicas inmunoenzimáticas en Patología animal y Vegetal* . Office International Epozootes-Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias Paris Francia.
42. Scalan. M.C. (1988) *Introduction to Veterinary Bacteriology*. Iowa State University Press/Ames. P.p. 170-175 y 325-327.
43. Sheldrake.R.F., Romalis, L.F. (1992). *Evaluation of an ELISA for detection of Mycoplasma hyopneumoniae antibody in porcine serum*. Aust.Vet. J. 69(10) : 255-258.
44. Slavik. F.M, Switzer, W.P (1981). *Comparison of microfiltration complement-fixation test and tube latex agglutination test for diagnosis of Mycoplasma hyopneumoniae swine pneumonia*. Am. J.Vet. Res 42 (5) 862-864.
45. Smith, P.F. (1990), *Diversity and similarities of lipid metabolism among the mollicutes*. Int. J. Med. Microbiol. Suppl. 20:155-161.
46. Sorensen,V.,Barfod,K., Feld,N.C. (1992) *Evaluation of monoclonal blocking ELISA and IHA for antibodies to Mycoplasma hyopneumoniae In SPF pig herds*. Vet Rec. 130:488-490.
47. Stainer, R. Y. (1986) *The microbial world* . 1a. Edición, Edit. Prentice-hall. New Jersey. U.S.A. p.p 520-524.
48. Stipkouist L.(1995), *Neumonía por Micoplasma en el cerdo*, Pigs-Misset, Enf. Resp, sep, p.p 16-18.
49. Straw, E. B, Tuovinen, K.V., Bigras-Poulin, M (1989) *Estimation of the cost of pneumonia in swine heds*. JAUMA. 195(12):1702-1706.
50. Tajima M; Yagihashi, Nunoya,T. (1987). *Ultraestructure of micoplasmaal capsules as revealed by stabilizacion with ruthenium red*. J. Vet. Sci: 47(2): 217-223.
51. Taylor, D. J. (1987) *Enfermedades de los cerdos*. Editorial. Manual Moderno. Mex. p.p. 116-127.
52. Tener,A.M. (1988) Wilkinson J.B, Moore R.J *Cosmetología de Harry*, Editorial Díaz Santos, España 1990, p.p. 701-710.
53. Wise, K.S., and M.F. Kim (1987) *Major membrane surface proteins of Mycoplasma hyopneumoniae selectively modified by covalently bound lipid*. J. Bacteriol. 169 :5546-55550

54. Wood, W.G. and Gadouu (1983) *Inmovillitation of antibodies and antigens on macrosolid phases. A comparison between adsorption and covalent binding. A critical study of macrosolid phases for use in immunoassay systems. Part I.* J. Clinic. Chem. Biochem. 21:789-803.
55. Young, F. T., Ross, R.F (1987). *Assessment of antibody response of swine infected with Mycoplasma hyopneumoniae by immunoblotting.* Am. J. Vet. Res. 48(4): 651-656.
56. Zielinski, C. G, Ross, R. F. (1992). *Morphologic, estructures and hydrophobicity of the cell surface of Mycoplasma hyopneumoniae.* Am.J.Vet.Res. 53(7): 1087-1091.
57. Zielinski, C. G., Ross, R. F. (1993) *Adherence at Mycoplasma hyopneumoniae to ciliated respiratory tract cells.* Am. J. Vet. Res. 53(7):1087-1091.
58. Tood -Sandford (1991) *Diagnóstico y tratamientos clínicos por el Laboratorio.* Tomo 1,8ava Edición, Editorial Salvat, México, p.p 1645-1648.