

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 374**

51 Int. Cl.:

C07K 14/30 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2015 PCT/US2015/064342**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16090383**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2015 E 15819940 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3227314**

54 Título: **Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de IgG anti-Mycoplasma Hyorhinitis en suero porcino**

30 Prioridad:

05.12.2014 US 201462088417 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.04.2020

73 Titular/es:

BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA INC. (100.0%)

**3239 Satellite Boulevard, Bldg. 500
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**LAWRENCE, PAULRAJ;
BEY, RUSSELL F.;
STOLL, MIKE;
BUMGARDNER, ERIC y
STINE, DOUGLAS**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 754 374 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de IgG anti-Mycoplasma Hyorhinis en suero porcino

5

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 62/088.417 presentada el 5 de diciembre de 2014.

10

Antecedentes de la invención

Mycoplasma hyorhinis es un importante patógeno de la especie porcina que a menudo puede aparecer como coinfección respiratoria con patógenos virales^{2,3}, pero también se ha demostrado que causa la artritis y poliserositis en animales infectados. El impacto económico de la enfermedad asociada con *M. hyorhinis* en la industria porcina de Estados Unidos no ha sido evaluado previamente. No obstante, este organismo sigue siendo una fuente importante de enfermedades infecciosas en cerdos criados para la venta^{2,3,4}. Actualmente, no hay un ensayo de diagnóstico disponible para evaluar el grado de exposición a este patógeno en el campo, ni existe actualmente un procedimiento que permitiría a los investigadores la capacidad de monitorizar la respuesta serológica de los cerdos a las vacunas administradas contra este patógeno.

Mycoplasma hyorhinis es un patógeno importante en la industria porcina de Estados Unidos. Cada año las infecciones causadas por este patógeno impactan en la productividad de la industria porcina mediante el aumento de los costes veterinarios, disminución de la productividad y mortalidad. El género *Mycoplasma* consiste en pequeños organismos fastidiosos de aproximadamente 0,1 µm de tamaño y carecen de pared celular⁶. Un número de especies patógenas de *Mycoplasma* que se han observado que infectan cerdos e inducen lesiones significativas tras la infección, incluyen *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, y *M. hyosynoviae*^{7,8}. *M. hyopneumoniae* es una causa importante de enfermedades respiratorias en cerdos, especialmente como una infección secundaria con circovirus porcino tipo 2² y virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino³. *M. hyosynoviae* se ha demostrado que causa artritis grave en las articulaciones de los animales infectados y también induce un estado de portador en las amígdalas de los cerdos^{9,10}. *M. hyorhinis* es patógeno para los cerdos y los seres humanos^{7,11}. En los seres humanos, *M. hyorhinis* ha sido implicado como agente causal en el carcinoma gástrico¹¹ y el cáncer de próstata^{1,12}, aunque no es una causa común de enfermedad infecciosa clásica.

En los cerdos, el organismo puede encontrarse como residente comensal de la cavidad nasal y el tracto respiratorio¹⁴ y se ha observado que la virulencia y patogenicidad varían entre las cepas¹³. Cuando una cepa patógena infecta un animal, los signos clínicos más comunes son la artritis severa y poliserositis. De vez en cuando los animales pueden desarrollar otitis y conjuntivitis como resultado de la infección también¹³. Las opciones de tratamiento incluyen antibióticos de tetraciclina, fluoroquinolona y macrólidos, así como tilosina y un conjunto de otros antimicrobianos⁸.

Se ha realizado muy poca investigación para determinar qué factores específicos hacen que algunas cepas de *M. hyorhinis* sean virulentas, mientras que otras permanecen no patógenas. Una importante fuente de variabilidad en las cepas de *M. hyorhinis* con las lipoproteínas variables (VLP) que constituyen las principales proteínas de membrana expresadas por el organismo^{16,17}. Las VLP pueden cambiar durante el transcurso de una infección a través de un mecanismo que implica la variación de fase, la regulación diferencial en la expresión de múltiples VLP, y cambios en el tamaño de VLP debido a la ganancia o pérdida de secuencias repetitivas que codifican grupos de 12-13 residuos de aminoácidos de longitud¹⁸. Estos mecanismos pueden ser utilizados como un medio de escape continuo del sistema inmune del huésped, ya que la inmunidad dirigida contra estas proteínas puede resultar irrelevante cuando la población se desplaza a la utilización de una nueva VLP¹⁹. Otra fuente potencial de virulencia en cepas de *M. hyorhinis* es la capacidad de al menos algunas cepas para modular la respuesta inmunitaria. Los estudios anteriores han demostrado que *M. hyorhinis* tiene la capacidad de suprimir la producción de IL-2 en células T murinas²¹ y la activación de células T por células madre mesenquimales en ratas²².

p37 de *M. hyorhinis* es una proteína que abarca la membrana de 43,5 kD que se piensa que funciona en la unión de pirofosfato de tiamina²³ y en la adherencia a las células huésped (cite). Su papel en cánceres gástricos humanos agravantes se cree que es resultado de su activación de la metaloproteasa de matriz 2 (MMP2) y la activación de la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico²⁰. p37 de *M. hyorhinis* se cree que se une al ácido siálico en la superficie de células a través de un motivo en "brazo de gitano" carboxi-terminal²⁴ y la unión de p37 a las células cancerosas se ha demostrado que facilita el aumento de la invasividad y la metástasis^{24,20}. Un ensayo relevante utiliza sueros humanos para determinar si existe un vínculo entre *M. hyorhinis* y cáncer de próstata,¹ pero antes de la presente descripción, no se sabía si p37 de *M. hyorhinis* podría utilizarse para diagnosticar la exposición a *M. hyorhinis* a través de la vacunación o infección natural.

65 Características de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido p37 de *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*) purificado, recombinante, de origen no natural, no modificado post-traducción, que tiene una secuencia con una identidad de al menos el 98% con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5; donde el polipéptido es útil para la detección selectiva de anticuerpos contra *M. hyorhinis*.

5

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas que comprende el polipéptido del primer aspecto de la invención.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar una placa de ELISA, para usar como un componente del kit del segundo aspecto de la invención, que comprende las siguientes etapas:

- 10 a) suspender el polipéptido del primer aspecto de la invención en tampón de carbonato/bicarbonato hasta una concentración de aproximadamente 80 µg/ml a aproximadamente 120 µg/ml, para producir una solución de recubrimiento;
- b) añadir de aproximadamente 80 µl a aproximadamente 120 µl de la solución de recubrimiento a cada pocillo;
- 15 c) incubar la placa durante al menos aproximadamente 12 horas a aproximadamente 4 °C;
- d) extraer la solución de recubrimiento;
- e) bloquear la placa;
- f) lavar la placa; preparando de este modo la placa de ensayo ELISA.

20 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar selectivamente la presencia de *M. hyorhinis* en una muestra que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar la placa de ELISA del tercer aspecto de la invención;
- b) proporcionar al menos una muestra experimental, al menos una muestra de control negativo y al menos una muestra que contiene anticuerpos específicos para al menos una especie de *Mycoplasma* distinta de *M. hyorhinis*;
- 25 c) diluir la muestra o muestras en tampón de bloqueo;
- d) añadir una cantidad de muestra o muestras diluidas en los pocillos de la placa;
- e) incubar las placas;
- f) lavar los pocillos de las placas para extraer la muestra o muestras diluidas;
- g) revelar las placas usando un cromógeno;
- 30 h) detener la reacción de cromógeno;
- i) leer la placa a una longitud de onda apropiada para el cromógeno utilizado;
- j) recoger y registrar los datos de absorbancia para los pocillos;
- k) determinar que *M. hyorhinis* está presente cuando la muestra tiene significativamente más absorbancia que las muestras de control negativo; detectando de este modo selectivamente la presencia de *M. hyorhinis* en la muestra o
- 35 muestras.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar selectivamente la presencia de anticuerpos contra P37 de *M. hyorhinis* en una muestra de ensayo, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una muestra de ensayo sospechosa de contener anticuerpos contra P37;
- 40 b) añadir una cantidad del polipéptido del primer aspecto de la invención a la muestra de ensayo, siendo la cantidad suficiente para producir un nivel detectable de actividad de unión por los anticuerpos anti-P37 en la muestra de ensayo; y
- c) detectar la presencia de anticuerpos contra P37 unidos a dicho polipéptido en la muestra de ensayo.

45 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un kit de diagnóstico para el diagnóstico selectivo de la presencia en una muestra biológica de anticuerpos contra P37 de *M. hyorhinis* que comprende el polipéptido del primer aspecto de la invención; en el que incluso si la muestra biológica contiene anticuerpos contra *M. hyosynoviae* y *M. hyopneumoniae* contra P37 ortólogo, homólogo o parólogo, el kit no producirá un resultado positivo a menos que los anticuerpos contra *M. hyorhinis* estén presentes.

50

Se describe en el presente documento un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección selectiva de IgG anti-*Mycoplasma hyorhinis* en suero porcino, que puede contener anticuerpos específicos a otros múltiples *Mycoplasma spp.*

55 Se describen en el presente documento procedimientos para detectar selectivamente la presencia de *Mycoplasma hyorhinis* en una muestra biológica, incluso cuando las especies biológicas también contienen anticuerpos específicos a otros múltiples *Mycoplasma spp.*

Se describe en el presente documento un procedimiento de producción de un kit de ELISA selectiva, lo que produce un resultado positivo para *Mycoplasma hyorhinis*, a pesar de la presencia de anticuerpos de otras *Mycoplasma spp.*

60

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 Transferencia Western y gel de SDS-PAGE de fracciones de proteína p37 recombinantes. L1: estándar; L2: lisado de células completas L3: extracto soluble de BPER L4: extracto soluble de urea L5: proteína purificada. Esta

figura muestra cómo la proteína p37 se divide durante la purificación y demuestra la pureza de la preparación final de antígeno;

la **figura 2** es un gráfico que muestra la relación S/P anti-p37 porcina en el día 35, para los siguientes grupos de vacuna de *M. hyorhinis* (aislado 10-1625-1): A) $3,715 \times 10^8$, TRIGEN™ al 10%; B) $3,715 \times 10^7$, TRIGEN™ al 10%; C) ningún tratamiento. Estos resultados muestran que el ensayo descrito fue capaz de diferenciar entre animales vacunados y no vacunados;

la **figura 3** es un gráfico que muestra la relación S/P media por grupo de estudio *M. hyosynoviae* en antígeno p37 de *M. hyorhinis*. Los grupos se vacunaron de la siguiente manera: A) $5,012 \times 10^8$, TRIGEN™ al 10%; B) $5,012 \times 10^8$, TS6 al 66%; C) $5,012 \times 10^7$, TRIGEN™ al 10%; D) $5,012 \times 10^7$, TS6 al 66%; y E) sin tratamiento. Este ensayo se llevó a cabo para verificar que los animales vacunados con *M. hyosynoviae* no experimentarían seroconversión contra el antígeno p37, que se utilizó en el ensayo de *M. hyorhinis*. Los resultados muestran que el suero de animales vacunados con el antígeno de *M. hyosynoviae* no reacciona positivamente en la prueba de *M. hyorhinis*;

la **figura 4** es un gráfico que muestra los animales vacunados/no vacunados con *M. hyopneumoniae* en ensayos con *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*. Para el grupo A, veinte animales recibieron una vacuna de *M. hyo* comercial (**NOMBRE DE LA VACUNA**); y para el Grupo B, diecinueve animales recibieron una vacuna de PCV2 comercial (CIRCOVAC®). Los resultados muestran que el suero de los animales vacunados con *M. hyopneumoniae* no reacciona positivamente en la prueba de *M. hyorhinis*;

la **figura 5** es un gráfico que muestra la respuesta S/P media para los animales vacunados con *M. hyorhinis* (aislado 10-1625-1), a niveles de dosis variadas y formulados con diversos adyuvantes. Grupos: A) $3,998 \times 10^8$, Trigen al 10%; B) $3,998 \times 10^7$, Trigen al 10%; C) $3,998 \times 10^6$, Trigen al 10%; D) $3,998 \times 10^8$, TS6 al 10%; E) $3,998 \times 10^7$, TS6 al 10%; F) $3,998 \times 10^6$, TS6 al 10%; G) $3,998 \times 10^8$, TS6 al 66%; H) $3,998 \times 10^7$, TS6 al 66%; I) $3,998 \times 10^6$, TS6 al 66%; W) $1,06 \times 10^8$ no concentrado, Trigen al 10%; X) $1,06 \times 10^7$ no concentrado, Trigen al 10%; Y) $1,06 \times 10^6$ no concentrado, Trigen al 10%; y J) Controles. Los resultados muestran que se obtiene una respuesta óptima usando TS6 a un volumen del 66%. Un ajuste de la dosis se puede ver claramente a través de nivel de dosis en cada conjunto de grupos de adyuvantes. Este resultado demuestra la capacidad de la prueba para medir la magnitud de la respuesta inmunitaria contra el antígeno.

Figura 6 Alineación ClustalW de secuencias de p37 de cepas de *M. hyorhinis* frente a la secuencia de la proteína recombinante p37-His. Esta alineación demuestra que el antígeno p37 se conserva entre diferentes cepas y comparte homología con la proteína recombinante descrita.

Descripción detallada de la invención

En el trabajo descrito en este documento se usó un enfoque relacionado para determinar si p37 podría ser utilizado como un marcador de diagnóstico para medir la exposición a *M. hyorhinis* a través de la vacunación y la exposición natural en cerdos. Estudios anteriores han demostrado que la proteína contiene cierta similitud con otras proteínas presentes en las especies de *Mycoplasma*¹⁵ y hemaglutinina del virus de gripe A²⁴ a nivel de aminoácido y estructural. En la presente descripción, la proteína p37 se utilizó como un medio para medir la respuesta de IgG de la especie porcina a la vacunación con vacunas de *M. hyorhinis* inactivadas de células completas derivadas de tres diferentes cepas del patógeno. El ensayo se validó adicionalmente para asegurar que los resultados de la prueba no se confundirían por la vacunación con *M. hyopneumoniae* o *M. hyosynoviae*. Por último, el ensayo se utilizó para estimar el grado de exposición que podría presentarse al probar los animales en el campo con el fin de tener una idea acerca de la prevalencia de este patógeno en una granja típica.

En particular, la proteína p37 de *M. hyorhinis* expresada de forma recombinante fue utilizada para controlar la exposición al patógeno en el campo, así como la magnitud de la respuesta de IgG en los animales vacunados. Los resultados indicaron que el ensayo tenía un alto grado de especificidad en términos de su capacidad para distinguir animales vacunados con *M. hyorhinis* frente a otras especies de *Mycoplasma* importantes, por ejemplo, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*. Las vacunas que se utilizan para proteger a los animales contra este patógeno parecen inducir una fuerte respuesta de anticuerpos contra la proteína p37. Además, el grado de prevalencia en campo determinada utilizando el ELISA en las pjaras probadas varió del 27% hasta como máximo el 67%.

Definiciones.

Por "antígeno" o "inmunógeno" se entiende una sustancia que induce una respuesta inmunitaria específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o parte de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una pieza o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmunitaria tras la presentación a un animal huésped; un polipéptido, un epítipo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina.

Los términos "proteína", "péptido", "polipéptido" y "fragmento de polipéptido" se usan indistintamente en este

documento para referirse a polímeros de residuos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos, y que puede estar interrumpido por restos químicos distintos de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo la formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje o bioactivo.

El término "polipéptido inmunogénico o antigénico", tal como se usa en el presente documento, incluye polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido de que una vez que se administra al huésped, es capaz de evocar una respuesta inmunitaria del tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. Preferiblemente, el fragmento de proteína es tal que tiene sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína total. Por lo tanto, un fragmento de proteína según la descripción comprende o consiste esencialmente en o consiste en al menos un epítipo o determinante antigénico. Una proteína o polipéptido "inmunogénico", tal como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína, análogos de la misma, o fragmentos inmunogénicos de la misma. Por "fragmento inmunogénico" se entiende un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y de este modo provoca la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Tales fragmentos pueden identificarse utilizando cualquier conjunto de técnicas de mapeo de epítopos, bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse mediante, por ejemplo, la síntesis simultánea de grandes conjuntos de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de proteína y la reacción de los péptidos con anticuerpos, mientras que los péptidos están todavía unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos. No. 4.708.871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. De manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos, tales como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, supra. Procedimientos especialmente aplicables a las proteínas de *T. parva* se describen completamente en el documento PCT/US2004/022605.

Como se discute en el presente documento, la descripción abarca fragmentos activos y variantes del polipéptido antigénico. Por lo tanto, el término "polipéptido inmunogénico o antigénico" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre que el polipéptido actúe para producir una respuesta inmunológica, tal como se define en este documento. El término "variación conservativa" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de tal manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservadora, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos - aspartato y glutamato; (2) básicos - lisina, arginina, histidina; (3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga - glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro residuo hidrófobo, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares; o una sustitución conservativa similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado que no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro de la definición del polipéptido de referencia. Todos los polipéptidos producidos por estas modificaciones se incluyen en el presente documento. El término "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido siempre que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido.

El término "epítipo" se refiere al sitio en un antígeno o hapteno al cual responden células B y/o células T específicos. El término también se usa indistintamente con "determinante antigénico" o "sitio determinante antigénico". Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos a una composición o vacuna de interés. Por lo general, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares, y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en el composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped mostrará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora, de manera que la resistencia a una nueva infección se verá reforzada y/o disminuirá la gravedad clínica de la enfermedad. Dicha protección se demostrará por una reducción o ausencia de síntomas y/o signos clínicos de la enfermedad normalmente mostrados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral disminuido en el huésped infectado.

Por "animal" se entiende mamíferos, aves y similares. Animal o huésped, tal como se usa en el presente documento, incluye mamíferos y humanos. El animal puede seleccionarse del grupo que consiste en equino (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felino (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros gatos grandes, y otros felinos incluyendo guepardos y lince), ovino (por ejemplo, ovejas), bovino (por ejemplo, ganado, terneros, novillos, toros), porcino (por ejemplo, cerdo), aviar (por ejemplo, pollo, pato, ganso, pavo, codorniz, faisán, loro, pinzones, halcón, cuervo, avestruz, emú y casuario), primate (por ejemplo, prosimio, tarsero, mono, gibón, simio), hurones, focas y peces. El término "animal" también incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo recién nacido, embrionario y etapas fetales.

10

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los términos singulares "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

15

Cabe indicar que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, los términos, tales como "comprende" "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que términos tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos por ejemplo, permiten elementos no citados de manera explícita, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

20

25 Realizaciones.

En una realización, la presente invención proporciona un polipéptido p37 de *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*) purificado, recombinante, de origen no natural, no modificado post-traducción, que tiene una secuencia con una identidad de al menos el 98% con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, donde el polipéptido es útil para la detección selectiva de anticuerpos contra *M. hyorhinis*.

30

En una realización, el polipéptido tiene la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 5.

En otra realización, la invención proporciona un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas que comprende el polipéptido de *M. hyorhinis* descrito en este documento.

35

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para producir una placa de ELISA, para usar como un componente del kit de ELISA descrito, que comprende las siguientes etapas:

40

- a) suspender el polipéptido en tampón de carbonato/bicarbonato hasta una concentración de aproximadamente 80 µg/ml a aproximadamente 120 µg/ml, para producir una solución de recubrimiento;
- b) añadir de aproximadamente 80 µl a aproximadamente 120 µl de la solución de recubrimiento a cada pocillo;
- c) incubar la placa durante al menos aproximadamente 12 horas a aproximadamente 4 °C;
- d) extraer la solución de recubrimiento;
- e) bloquear la placa;
- f) lavar la placa; preparando de este modo la placa de ensayo ELISA.

45

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar selectivamente la presencia de *M. hyorhinis* en una muestra que comprende las siguientes etapas:

50

- a) proporcionar la placa de ELISA de la reivindicación 4;
- b) proporcionar al menos una muestra experimental, al menos una muestra de control negativo y al menos una muestra que contiene anticuerpos específicos para al menos una especie de *Mycoplasma* distinta de *M. hyorhinis*;
- c) diluir la muestra o muestras en tampón de bloqueo;
- d) añadir una cantidad de muestra o muestras diluidas en los pocillos de la placa;
- e) incubar las placas;
- f) lavar los pocillos de las placas para extraer la muestra o muestras diluidas;
- g) revelar las placas usando un cromógeno;
- h) detener la reacción de cromógeno;
- i) leer la placa a una longitud de onda apropiada para el cromógeno utilizado;
- j) recoger y registrar los datos de absorbancia para los pocillos;
- k) determinar que *M. hyorhinis* está presente cuando la muestra tiene significativamente más absorbancia que las muestras de control negativo; detectando de este modo selectivamente la presencia de *M. hyorhinis* en la muestra o muestras.

60

En aún otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar selectivamente la presencia de anticuerpos contra P37 de *M. hyorhinis* en una muestra de ensayo, que comprende las etapas de:

65

- a) proporcionar una muestra de ensayo sospechosa de contener anticuerpos contra P37;

- b) añadir una cantidad del polipéptido a la muestra de ensayo, siendo la cantidad suficiente para producir un nivel detectable de actividad de unión por los anticuerpos anti-P37 en la muestra de ensayo; y
 c) detectar la presencia de anticuerpos contra P37 unidos a dicho polipéptido en la muestra de ensayo.

- 5 En el presente documento se describe un procedimiento para detectar selectivamente la presencia de anticuerpos contra P37 contra *M. hyorhinis* en una muestra de ensayo, que comprende las etapas de:
 a) proporcionar una muestra de ensayo sospechosa de contener anticuerpos contra P37;
 b) añadir una cantidad de un fragmento inmunogénico de polipéptido a la muestra de ensayo, siendo la cantidad suficiente para producir un nivel detectable de actividad de unión por los anticuerpos anti-P37 en la muestra de
 10 ensayo; y
 c) detectar la presencia de anticuerpos contra P37 unidos a dicho polipéptido en la muestra de ensayo.

- Un kit de diagnóstico para el diagnóstico selectivo de la presencia en una muestra biológica de anticuerpos de P37 contra *M. hyorhini*; en el que incluso si la muestra biológica contiene anticuerpos contra *M. hyosynoviae* y *M.*
 15 *hyopneumoniae* contra P37 ortólogo, homólogo o parólogo, el kit no producirá un resultado positivo a menos que los anticuerpos contra *M. hyorhinis* estén presentes. En una realización, este kit contiene el polipéptido que tiene la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 5.

- Se describe en el presente documento un procedimiento de detección de la exposición a *M. hyorhinis* en un animal o
 20 en una muestra biológica de dicho animal, que comprende la etapa de detectar la presencia o ausencia de una respuesta inmunitaria al polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 5.

Ejemplos

- 25 **Ejemplo 1.**

Materiales y procedimientos

Análisis de secuencias del gen de p37:

- 30 La secuencia del gen de p37 de *M. hyorhinis* se tradujo en Clone Manager y se realizó una búsqueda BLASTP²⁶ contra la base de datos "nr" de NCBI. Todas las proteínas con una identidad máxima mayor que o igual a 35% se presentan en la Tabla 1.

35 **Tabla 1**

Mycoplasma sp.	Nombre de la proteína	Cubrimiento	Identidad máxima	Acceso NCBI
<i>M. conjunctivae</i>	Transportador ABC similar a P37	98%	44%	YP 002960563.1
<i>M. ovipneumoniae</i>	Proteína reparadora de ADN HhH-GDP	98%	38%	WP 010321138.1
<i>M. flocculare</i>	Proteína de unión a sustrato transportadora ABC similar a P37	95%	39%	WP 002557691.1
<i>M. pulmonis</i>	Proteína de unión a sustrato transportadora ABC similar a P37	98%	39%	NP 326056.1
<i>M. hyopneumoniae</i>	Lipoproteína de unión a sustrato transportadora ABC similar a P37	93%	40%	YP 287754.1
<i>M. genitalium</i>	Proteína de unión a sustrato transportadora ABC de alquilfosfato	64%	39%	YP 006600321.1
<i>M. arginini</i>	Componente de unión a sustrato transportadora ABC de alquilfosfato	65%	40%	WP 004416279.1
<i>M. penetrans</i>	proteína del sistema de transporte de alta afinidad	80%	35%	NP 0758050.1

<i>M. hominis</i>	Lipoproteína de unión a sustrato transportadora ABC	82%	38%	YP 003302899.1
<i>M. gallisepticum</i>	HatA	63%	41%	YP 006581118.1
<i>M. anatis</i>	proteína del sistema de transporte de alta afinidad p37	61%	40%	WP 006886440.1
<i>M. pneumoniae</i>	proteína del sistema de transporte de alta afinidad p37	63%	37%	YP 005175657.1
<i>M. iowae</i>	proteína del sistema de transporte de alta afinidad p37	72%	36%	WP 004025038.1
<i>M. alkalescens</i>	Lipoproteína de unión a sustrato transportadora ABC similar a P37	64%	36%	WP 002881335.1

Secuenciación de genes de P37 de aislados de *M. hyorhinis*:

Se inocularon cepas de *M. hyorhinis* en medio de cultivo de Mycoplasma y se cultivaron durante tres días a 37 °C. A continuación, un volumen de 10 ml de cada cultivo se centrifugó a 7500xG durante 20 minutos con el fin de sedimentar las células. Después de esta centrifugación, se desechó el sobrenadante y se obtuvo ADN genómico a partir del sedimento celular mediante extracción con fenol:cloroformo y precipitación con etanol. Brevemente, los sedimentos celulares se resuspendieron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato y se añadió 1 ml de una mezcla 1:1 de fenol:cloroformo. A continuación, las muestras se homogeneizaron mediante mezclado vigoroso. A continuación, la separación de fases se consiguió mediante centrifugación de las muestras a 19000xG durante un minuto. La fase acuosa se extrajo de cada muestra y se colocó en un tubo nuevo. A continuación, se añadió un volumen igual de cloroformo a cada tubo y las muestras se mezclaron a mano. Las muestras se centrifugaron a continuación de nuevo durante 1 minuto a 19000xG y la fase acuosa se extrajo a un nuevo tubo. A cada muestra, se añadió un 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M. A continuación, se añadieron tres volúmenes de etanol al 100% a cada muestra y se dejó que las muestras se incubaran en hielo durante quince minutos. A continuación, las muestras se centrifugaron a 14000xG durante treinta minutos a 4 °C para sedimentar el ADN. Se extrajo el sobrenadante de cada tubo y los sedimentos se resuspendieron en 1 ml de etanol al 70% v/v para eliminar cualquier contaminante restante. Las muestras se centrifugaron a continuación de nuevo a 14000xG durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente, los gránulos se resuspendieron en tampón Tris 10 mM y se congelaron a -20 °C hasta que fueron enviados para la secuenciación de PCR. Las secuencias de genes de p37 de diversos aislados listados en la tabla 2 se amplificaron usando el siguiente conjunto de cebadores directo e inverso; directo 5' GGGATTGAAGTGGTTGTCTGATTTAAG 3' (SEQ ID NO: 1), inverso 5' CAATGAACCAGATGCAGAACCAATC (SEQ ID NO: 2). Los ensayos de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl con GoTaqH PCR SuperMix (Promega Inc., Madison, WI, EE.UU.) con 0,2 mM de cada cebador y 10 ng de ADN genómico de cada aislado, respectivamente. Las condiciones del ciclado de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 68 °C durante 90 segundos y una elongación final a 72 °C durante 5 min. Todos los productos de PCR se visualizaron después de la electroforesis en geles de agarosa al 1,0% desarrollada a 7,0 V/cm mediante tinción con bromuro de etidio (EtBr) y se secuenciaron mediante el procedimiento de terminación de la cadena didesoxi Sanger.

Tabla 2. Origen de los aislados usados para el análisis de secuencia de gen de p37. Los aislados se seleccionaron de todos los Estados Unidos

Aislado	SEQ ID NO (aminoácido de p37)	Localización
9-4107-1	6	Owatonna, MN
12-1973-2	6	Laurel, NE
12-2665-1	6	Guymon, OK
13-00490-1	6	Dodge Center, MN
10-1625-1	6	Storm Lake, IA
10-2286-1	6	Wesley, IA
10-3162-1	6	Rose Hill, NC
11-0731-1	6	Guymon, OK
11-3945-1	6	Owatonna, MN
12-1416-1	6	Waldorf, MN
12-3129-1	6	Trimont, MN
12-4130-1	6	Albin, WY
12-1276-1	7	Guymon, OK

11-4503-1	7	Faribault, MN
12-4153-1	6	Steen, MN

Clonación molecular de la proteína p37:

La información de secuencia para p37 de *M. hyorhinis* derivó de la secuencia de Genbank M37339.1. A continuación, esta secuencia se optimizó en los codones para la expresión en *E. coli* cambiando el codón de inicio a ATG, los codones de triptófano a TGG, de manera que el gen resultante se podrían expresar de manera eficiente en un huésped de *E. coli*. A continuación, se sintetizó un gen sintético en Genscript (how to site them) y la secuencia resultante se obtuvo en un vector pUC57. El gen se amplificó a partir del vector usando los cebadores p37 F (GACGACGACAAGATGCAGGCCTCTGCAGTCGAC) (SEQ ID NO: 3) y p37 R (GAGGAGAAGCCCGGTTATTTAATCGCCTTTTCGTAG) (SEQ ID NO: 4) usando un protocolo de PCR estándar. Una vez amplificado, el gen se purificó a partir de la mezcla de reacción usando un kit de limpieza de PCR de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, el gen purificado se ligó en un vector pET30-LIC de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, el vector ligado se transformó en células electrocompetentes One Shot-Top 10 (Invitrogen) y las células transformadas se sembraron en medio de selección (agar LB con KAN 50 µg/ml). A continuación, los clones se desarrollaron durante la noche en medio selectivo (caldo LB con KAN 50 µg/ml) y el plásmido se recogió utilizando un kit de extracción de plásmido de Qiagen. A continuación, el plásmido purificado de cada clon se cribó por la presencia de un inserto usando (cebadores de inserción específicos para el vector). Se seleccionaron los clones positivos y se enviaron para la secuenciación (Operon). A continuación, el plásmido se transformó en células de *E. coli* BL-21 (DE3) mediante electroporación y los transformantes fueron seleccionados por incubación durante la noche en medio selectivo (agar LB con Kan 50 µg/ml)

Expresión y purificación de la proteína p37:

Se inoculó un único clon de BL-21 en 200 ml de medio de autoinducción (T-BONE necesita obtener el nombre comercial) y se desarrolló durante la noche en un matraz de agitación a 37 °C con agitación a 250 rpm. El día siguiente, las células se centrifugaron a 5000xg durante 25 minutos y los sobrenadantes se desecharon. A continuación, el sedimento se resuspendió en 20 ml de un tampón de lisis comercial (BPER Thermo Pierce) y se homogeneizó suavemente pipeteando la suspensión arriba y abajo sobre el sedimento. A continuación, se añadió DNasa (Sigma) a una concentración de 20 U/ml y se dejó que la mezcla resultante se incubara durante dos horas a temperatura ambiente en un dispositivo de mezcla Nutator. A continuación, la extracción se centrifugó a 7500xG durante 30 minutos. El sobrenadante se retuvo para el análisis por SDS-PAGE y transferencia Western. El sedimento se resuspendió en urea 8 M y se dejó incubar durante dos horas a temperatura ambiente en un dispositivo de mezcla Nutator. Esta suspensión se centrifugó a continuación a 7500xG y se pasó a través de un filtro 0,2 µm para eliminar cualquier sólido insoluble. Antes de la purificación de una muestra de la urea y el tampón de lisis, las fracciones se ensayaron mediante SDS-PAGE y transferencia Western para determinar qué fracción de la proteína se había dividido. La fracción de urea fue seleccionada en base a los resultados de este análisis. A continuación, se preparó una columna de afinidad de níquel de 2 ml de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante usando (insertar resina de afinidad y columnas desechables Pierce). A continuación, se pasaron 10 ml de tampón de equilibración (insertar fórmula para tampón B) a través de la columna. A continuación, toda la fracción soluble de urea pasó a través de la columna. A continuación, la columna se lavó usando 20 ml de tampón de lavado (insertar fórmula para el tampón C). Finalmente, la columna se eluyó usando 5 ml de tampón de elución (insertar fórmula para tampón E). La concentración de proteína de la solución resultante se determinó mediante ensayo BCA (Thermo Pierce) según las instrucciones del kit.

SDS-PAGE y transferencia de western:

Se realizó un análisis SDS-PAGE y transferencia Western de p37 en dos geles separados en paralelo. Se mezclaron muestras de 100 µl con 20 µl de tampón de carga (insertar información Pierce) y se pusieron a ebullición durante 5 minutos para reducir y desnaturalizar las proteínas. A continuación, se cargaron 10 µl de patrones de proteína (insertar información Pierce) y 20 µl de la muestra a ebullición en un gel de SDS-PAGE en gradiente del 4-20% (insertar información Pierce). El gel se sometió a electroforesis bajo una corriente constante de 85V durante 90 minutos. Después de la electroforesis, los geles se lavaron en agua destilada durante 10 minutos para eliminar el SDS residual. Uno de los dos geles, a continuación, se tiñó utilizando una tinción de proteínas a base de Coomassie comercial (insertar información Pierce) durante una hora en un mezclador de mesa. A continuación, el gel se lavó brevemente en agua destilada para eliminar la tinción residual y a continuación se dejó incubar en agua destilada con mezclado durante la noche para eliminación la tinción del gel antes de la visualización. El otro gel se utilizó para el análisis de transferencia western y se empapó en tampón de desarrollo (insertar tampón tris-glicina) durante diez minutos antes de transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa mediante electroforesis. El protocolo de la electroforesis para la transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana consistía en una transferencia de una hora a 85V. Después de la transferencia, la membrana se extrajo del gel y se permitió el bloqueo durante la noche a 4 °C en un tampón de bloqueo comercial (Pierce). Después del bloqueo, la membrana se incubó a continuación con un conjugado Ni:HRP (insertar KPL) a una dilución 1/2000 con agitación suave a 37 °C durante

una hora. A continuación, la transferencia se enjuagó dos veces en PBS-T a cinco minutos por lavado con agitación suave antes de que un enjuague final en PBS. A continuación, se dejó revelar la membrana durante aproximadamente tres minutos usando un sustrato de DAB mejorado con metal (insertar información Pierce aquí) antes de detener la reacción mediante lavado de la transferencia con agua destilada.

5

Ensayo de ELISA:

La proteína p37 de *M. hyorhinis* purificada se suspendió en tampón carbonato/bicarbonato (Sigma) y se recubrieron 100 µl/pocillo sobre la superficie de placas Immulon 2HB a una concentración de 100 µg/ml. Las placas se dejaron 10 incubar durante la noche a 4 °C y la solución de recubrimiento se extrajo antes de bloquear las placas. Las placas se bloquearon con 300 µl/pocillo de bloque de Neptuno (Immunochemistry Technologies LLC) y se dejaron incubar durante dos horas a 37 °C. Las placas se lavaron a continuación una vez en PBS-T usando un conjunto de lavadores de placa para aspirar el tampón de bloqueo, se añadieron 300 µl/pocillo de tampón de lavado a la placa y a continuación se aspiró el tampón de lavado. A continuación, las muestras, diluidas 1/1000 en Superblock, se 15 añadieron a la placa por duplicado en volúmenes de 100 µl y se dejaron incubar durante una hora a 37 °C. A continuación, las placas se lavaron tres veces en PBS-T usando la misma configuración de volumen que el primer lavado. Se añadió conjugado (IgG anti-cerdo de cabra marcado con peroxidasa H&L de KPL) a la placa a una dilución 1/5000 y se dejó incubar durante una hora a 37 °C. Después de la incubación del conjugado, las placas se lavaron cuatro veces en PBS-T y se revelaron usando cromógeno TMB (KPL). El cromógeno se añadió a 100 20 µl/pocillo y se dejó revelar durante diez minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 1 N de ácido sulfúrico añadido a la placa a 100 µl/pocillo. A continuación, las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm y los datos de absorbancia se exportaron a Excel. En Excel, se determinó la absorbancia media de los dos pocillos Superblock y se restó de la de cualquier otro pocillo en la placa. A continuación, se determinó la absorbancia media de las muestras duplicadas y controles. Por último, la absorbancia media de cada muestra y el 25 control negativo se dividió por la de los sueros de control positivo para obtener las relaciones muestra/positivos utilizadas para determinar el estado positivo/negativo de los animales.

Ejemplo 2.

30 **ELISA de *M. hyosynoviae* y *M. hyopneumoniae*:**

ELISA de optimización:

Se establecieron diluciones óptimas para el recubrimiento de antígenos sobre placas y para antisueros para utilizar 35 en el ensayo a través de un procedimiento en damero estándar. A continuación, se usó antisuero de la prueba 1 en el ensayo para el desarrollo de los controles positivos y negativos y para establecer un umbral positivo/negativo para su uso en una prueba adicional. Basándose en los valores S/P descritos de los animales vacunados que recibieron la vacuna sin diluir, y de los animales no vacunados, se estableció un punto de corte de 0,15 S/P que describió el número mínimo de falsos positivos (1 animal) y no falsos negativos. Un falso positivo se definió como un no 40 vacunado que reaccionó en el ensayo con un S/P mayor que el punto de corte. Un falso negativo se definió como un vacunado que no reaccionó en el ensayo a un nivel más elevado que el punto de corte. Los valores de corte fueron probados entre 1,0 y 0,1 utilizando datos del conjunto de suero de la prueba 1.

Ejemplo 3. Pruebas con animales

45

Prueba 1: Estudio con *M. hyorhinis*

Se obtuvieron veinticuatro animales con buena salud de un proveedor comercial y se colocaron en una instalación limpia hasta que llegaron a ocho semanas de vida. Los animales de ensayo recibieron dos vacunaciones de vacuna 50 con *M. hyorhinis* inactivado formulada a diferentes niveles de dosis utilizando, tal como se muestra en la Tabla 3. Las vacunas se administraron en los días 0 y 21. Vacuna se administró IM en una dosis de 2 cc. Las muestras de suero se obtuvieron de los animales en el día 35 para las pruebas en el ELISA.

Tabla 3. *M. hyorhinis* – prueba 1 (resultados mostrados en la figura 2)

Grupo	Tratamiento	No. de animales
A	3,715x10 ¹⁰ , Trigen al 10%	10
B	3,715x10 ⁷ , Trigen al 10%	10
C	Sin tratamiento	4

Se utilizó el aislado 10-1625-1

55

Prueba 2: Estudio con *M. hyosynoviae*

Se obtuvieron cincuenta animales con buena salud de un proveedor comercial y se colocaron en una instalación limpia hasta que llegaron a diez semanas de vida. Estos animales recibieron dos vacunaciones de vacuna con *M. 60 hyosynoviae* inactivado formulada a diferentes niveles de dosis utilizando dos adyuvantes diferentes, tal como se

muestra en la Tabla 4. Las vacunas se administraron en los días 0 y 21. La vacuna se administró IM en una dosis de 2 cc. Se obtuvieron muestras de suero de animales en el día 35 para las pruebas en el ELISA de *M. hyorhinis*, así como un ELISA de *M. hyosynoviae* similar a uno publicado por Nielsen et al.²⁸.

5 Tabla 4. *M. hyosynoviae* – prueba 2 (resultados mostrados en la figura 3)

Grupo	Tratamiento	No. de animales	No. de animales ensayados
A	5,012x10 ⁸ , Trigen al 10%	10	8
B	5,02x10 ⁸ , TS6 al 66%	10	10
C	5,012x10 ⁷ , Trigen al 10%	10	9
D	5,012x10 ⁷ , TS6 al 66%	10	8
E	Sin tratamiento	10	9

Prueba 3: Estudio con *M. hyopneumoniae*:

10 En este ensayo se utilizó un conjunto de muestras de suero que contenían 40 sueros de animales que recibieron una vacuna contra PCV2 o una vacuna contra *M. hyopneumoniae*. Los animales se obtuvieron de un grupo con buena salud y se vacunaron IM en los días 0 y 21 utilizando una dosis de 2 cc. Los animales que habían recibido la vacuna contra PCV2 fueron considerados no vacunados con el fin de recopilar los resultados. Los animales que recibieron la vacuna contra *M. hyopneumoniae* se consideraron como vacunados. Los sueros tomados cuando los animales tenían 8 semanas de vida en el día 35 del protocolo de estudio se probaron usando un ELISA de *M.*
15 *hyopneumoniae* y un ELISA de *M. hyorhinis* disponibles comercialmente.

Tabla 5. *M. hyopneumoniae* – prueba 3 (resultados mostrados en la figura 4)

Grupo	Tratamiento	No. de animales
A	Vacuna comercial de <i>M. hyo</i>	20
B	Vacuna comercial de PCV2	19

Prueba 4: Estudio con *M. hyorhinis* 2 (conjunto de pruebas)

20 Se obtuvieron ciento diecinueve animales con buena salud de un proveedor comercial y se colocaron en una instalación limpia hasta que llegaron a diez semanas de vida. Estos animales recibieron dos vacunaciones de vacuna de *M. hyorhinis* inactivado formulada a diferentes niveles de dosis utilizando dos adyuvantes diferentes, tal como se muestra en la Tabla 6. Las vacunas se administraron en los días 0 y 21. La vacuna se administró IM en una
25 dosis de 2 cc. Las muestras de suero se obtuvieron de los animales en los días 0, 21 y 35 para la prueba en ELISA.

Tabla 6. *M. hyorhinis* – prueba 4 (resultados mostrados en la figura 5)

Grupo	Tratamiento	No. de animales
A	3,998x10 ⁸ , Trigen al 10%	10
B	3,998x10 ⁷ , Trigen al 10%	10
C	3,998x10 ⁶ , Trigen al 10%	10
D	3,998x10 ⁸ , TS6 al 10%	10
E	3,998x10 ⁷ , TS6 al 10%	10
F	3,998x10 ⁶ , TS6 al 10%	10
G	3,998x10 ⁸ , TS6 al 66%	9
H	3,998x10 ⁷ , TS6 al 66%	9
I	3,998x10 ⁶ , TS6 al 66%	9
W	1,06x10 ⁸ no concentrado, Trigen al 10%	9
X	1,06x10 ⁷ no concentrado, Trigen al 10%	9
Y	1,06x10 ⁶ no concentrado, Trigen al 10%	9
J	Controles	5

Prueba 5: Prevalencia en el campo

30 Se utilizaron doscientos cincuenta muestras de suero que se habían enviado a nuestro laboratorio para pruebas de diagnóstico no relacionadas para estimar la seroprevalencia de anticuerpos contra el antígeno p37. Estas muestras se obtuvieron a partir de una variedad de animales de múltiples localizaciones en los Estados Unidos. Las muestras se sometieron a las pruebas de ELISA, tal como se describe anteriormente, y los resultados se compilaron en
35 términos del número de animales que dieron positivo para el anticuerpo en el ensayo.

Resultados

Una búsqueda BLAST de proteínas con homología a la proteína p37 utilizada en este estudio muestra que están altamente conservadas en las cepas de *M. hyorhinis*. Entre los homólogos identificados durante el análisis BLAST, uno originado de *M. conjunctivae* y uno de *M. ovipneumoniae* que no han sido aislados previamente de cerdos. Sin

embargo, una *M. conjunctivae* parece estar genéticamente relacionada con otras especies de *Mycoplasma* que infectan a los cerdos²⁵. Una proteína homóloga de *M. flocculare*, una cepa comensal que encuentra comúnmente en los cerdos²⁷ también se encontró en la búsqueda. Debido a la práctica común de la vacunación de cerdos contra *M. hyopneumoniae*, se evaluó la interferencia de la vacunación contra este patógeno en el ensayo (Tabla 1).

5 Los aislados de *M. hyorhinis* analizados en este estudio se tomaron de ubicaciones geográficamente dispersas y durante un período de cuatro años, lo que indica que ha habido poca deriva temporal en la secuencia de p37 y que, incluso a grandes distancias geográficas, hay muy poca diferencia en la secuencia de proteínas entre cepas. La secuencia de la proteína recombinante que se utilizó para el ELISA contiene siete diferencias en la secuencia de aminoácidos cuando se compara con las secuencias aisladas. Sin embargo, es evidente a partir de la reactividad en el ELISA que éstas no impiden la unión del anticuerpo al antígeno.

15 El gel SDS-PAGE y la transferencia Western muestran el fraccionamiento del antígeno en cuerpos de inclusión durante la expresión en el huésped de *E. coli*. Esto no fue sorprendente ya que p37 es una proteína unida a la membrana y habría sido difícil de expresar en una forma soluble. Además, la purificación de la fase de cuerpo de inclusión dio lugar a una preparación muy pura, que es importante con el fin de evitar la interferencia en el ensayo de anticuerpos producidos contra *E. coli* que es probable que esté presente en el cerdo, en particular en animales más viejos.

20 La prueba inicial del estudio de concepto que se realizó para determinar si el ensayo de p37 podría detectar anticuerpos contra *M. hyorhinis* demostró con éxito que se podía detectar una respuesta inmunitaria en animales vacunados que no estaban presentes en los controles. Un estudio posterior realizado usando un ajuste de la dosis de *M. hyorhinis* inactivado en dos adyuvantes diferentes demostró que podíamos obtener una respuesta más potente cuando se utiliza un adyuvante diferente que el utilizado en nuestro estudio inicial. Además, fuimos capaces de ver que la respuesta en el ELISA disminuye a medida que se disminuyó la dosis del antígeno, lo que indica que este ensayo puede tener valor también como un medio de medición semicuantitativa de la respuesta inmunitaria.

30 Los dos ensayos restantes se realizaron con el fin de determinar si anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación con otras especies de *Mycoplasma* que se sabe que infectan a los cerdos podrían interferir con el ensayo. Los resultados de estas dos pruebas demuestran que los animales que habían sido vacunados con *M. hyosynoviae* y *M. hyopneumoniae* no reaccionaron positivamente en el ensayo, lo que indica que el ensayo tiene la suficiente especificidad para medir el anticuerpo producido contra *M. hyorhinis* y no detectará el anticuerpo contra cualquiera de *M. hyosynoviae* o *M. hyopneumoniae*.

35 En resumen, el antígeno p37 puede usarse como un medio para controlar la respuesta a la vacunación con *M. hyorhinis* inactivado. La prueba muestra un alto grado de selectividad hacia anticuerpos producidos contra esta especie y la proteína p37 está bien conservada, lo que debería permitir el control de la respuesta frente a muchas, si no todas, las cepas que circulan actualmente en los Estados Unidos. También hemos sido capaces de medir la magnitud de la respuesta inmunitaria utilizando este ensayo que dio lugar a una mejora en nuestra vacuna inactivada mediante el uso de un nuevo sistema de adyuvantes.

Fuentes y fabricantes

- 45 a) Thermo Pierce-3747 N Meridian Rd, Rockford, IL 61101
 b) Sigma-Aldrich-3050 Spruce St, St. Louis, MO 63103
 c) fabricante de T-BONE
 d) Kirkegaard & Perry Laboratories- 910 Clopper Road, Gaithersburg, MD 20878
 e) Immunochemistry Technologies LLC- 9401 James Avenue South, Suite 155, Bloomington, MN 55431
 f) IDEXX- One IDEXX Drive, Westbrook, ME 04092

Referencias

1. Urbanek C, Goodison S, Chang M, et al.: 2011, Detection of antibodies directed at *M. hyorhinis* p37 in the serum of men with newly diagnosed prostate cancer. *BMC Cancer* 11: 233-238.
- 55 2. Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, et al.: 2010, An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J Comp Pathol* 143: 120-131.
3. Palzer A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritz K: 2008, Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Vet Rec* 162:267-271.
4. Kim B, Lee K, Han K, et al.: 2010, Development of in situ hybridization for the detection of *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from naturally infected pigs with polyserositis. *J Vet Med Sci* 72: 1225-1227.
- 60 5. Dudler R, Schmidhauser C, Parish RW, et al.: 1988, A mycoplasma high-affinity transport system and the in vitro invasiveness of mouse sarcoma cells. *EMBO J* 7: 3963-3970.
6. Razin S, Hayflick L: 2010, Highlights of mycoplasma research- An historical perspective. *Biologicals* 38: 183-190.
7. Minion FC: 2002, Molecular pathogenesis of mycoplasma animal respiratory pathogens. *Front Biosci* 7: 1410-1422.
- 65 8. Kobisch M, Friis NF: 1996, Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech* 15: 1569-1605.

9. Hagedorn-Olsen T, Nielsen NC, Friis NF, Nielsen J: 1999, Progression of *Mycoplasma hyosynoviae* infection in three pig herds. Development of tonsillar carrier state, arthritis, and antibodies in serum and synovial fluid in pigs from birth to slaughter. *Zentralbl Veterinarmed A* 46: 555-564.
10. Friis NF, Ahrens P, Larsen H: 1991, *Mycoplasma hyosynoviae* isolation from the upper respiratory tract and tonsils of pigs. *Acta Vet Scand* 32: 425-429.
11. Yang H, Qu L, Chen L, et al.: 2010, *Mycoplasma hyorhinis* infection in gastric carcinoma and its effects on the malignant phenotypes of gastric cancer cells. *BMC Gastroenterol* 10: 132-139.
12. Namiki K, Goodison S, Porvasnik S, et al.: 2009, Persistent exposure to *Mycoplasma* induces malignant transformation of human prostate cells. *PLoS One* 4: e6872.
13. Gois M, Kuksa F: 1974, Intranasal infection of gnotobiotic piglets with *Mycoplasma hyorhinis*: Differences in virulence of the strains and influence of age on the development of infection. *Zentralbl Veterinarmed B* 21: 352-361.
14. Gomes Neto JC, Gauger PC, Strait EL, et al.: 2012, *Mycoplasma*-associated arthritis: Critical points for diagnosis. *J Swine Health Prod* 20: 82-86.
15. Sippel KH, Robbins AH, Reutzel R, et al.: 2009, Structural insights into the extracytoplasmic thiamine-binding lipoprotein p37 of *Mycoplasma hyorhinis*. *J Bacteriol* 191: 2585-2592.
16. Yogev D, Rosengarten R, Watson-McKown R, Wise KS: 1991, Molecular basis of *Mycoplasma* surface antigenic variation: a novel set of divergent genes undergo spontaneous mutation of periodic coding regions and 5' regulatory sequences. *EMBO J* 10: 4069-4079.
17. Rosengarten R, Wise KS: 1990, Phenotypic switching in mycoplasmas: phase variation of diverse surface lipoproteins. *Science* 247: 315-318.
18. Rosengarten R, Wise KS: 1991, The VLP system of *Mycoplasma hyorhinis*: Combinatorial expression of distinct size variant lipoproteins generating highfrequency surface antigenic variation. *J Bacteriol* 173: 4782-4793.
19. Citti C, Kim MF, Wise KS: 1997, Elongated versions of VLP surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. *Infect Immun* 65: 1773-1785.
20. Gong M, Meng L, Beihai J, et al.: 2008, p37 from *Mycoplasma hyorhinis* promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR. *Mol Cancer Ther* 7: 530-537.
21. Teh HS, Ho M, Williams LD: 1988, Suppression of cytotoxic responses by a supernatant factor derived from *Mycoplasma hyorhinis*-infected mammalian cell lines. *Infect Immun* 56: 197-203.
22. Zinocker S, Wang M-Y, Gaustad P, et al.: 2011, *Mycoplasma* contamination revisited: Mesenchymal stromal cells harboring *Mycoplasma hyorhinis* potently inhibit lymphocyte proliferation *In Vitro*. *PLoS ONE* 6: e16005.
23. Sippel KH, Robbins AH, Reutzel R, et al.: 2009, Structural insights into the extracytoplasmic thiamine-binding lipoprotein p37 of *Mycoplasma hyorhinis*. *J Bacteriol* 191: 2585-2592.
24. Ketcham CM, Anai S, Reutzel R, et al.: 2005, p37 induces tumor invasiveness. *Mol Cancer Ther* 4: 1031-1038.
25. Liu W, Fang L, Li M, et al.: 2012, Comparative genomics of *Mycoplasma*: Analysis of conserved essential genes and diversity of the pan-genome. *PLoS ONE* 7: e35698.
26. Stephen F, Altschul TL, Madden AA, et al.: 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
27. Armstrong CH, Sands-Freeman L, Freeman MJ: 1987, Serological, pathological, and cultural evaluations of swine infected experimentally with *Mycoplasma flocculare*. *Can J Vet Res* 51: 185-188.
28. Nielsen EO, Lauritsen KT, Friis NF, et al.: 2005, Use of a novel serum ELISA method and the tonsil-carrier state for evaluation of *Mycoplasma hyosynoviae* distributions in pig herds with or without clinical arthritis. *Vet Microbiol* 111:41-5.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Merial, Inc., Lawrence, Paulraj, Bey, Russell, Stoll, Mike, Bumgardner, Eric, Stine, Douglas
- <120> Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de IgG anti-*Mycoplasma hyorhinis* en suero porcino
- <130> MER 14-250
- <160> 7
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador directo de p37
- <400> 1
gggattgaag tggttgtctg atttaag

ES 2 754 374 T3

<210> 2
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso de p37
 10
 <400> 2
 caatgaacca gatgcagaac aatc 24

 15 <210> 3
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Cebador directo de p37

 <400> 3
 25 gacgacgaca agatgcaggc ctctgcagtc gac 33

 <210> 4
 <211> 36
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso de p37

 35 <400> 4
 gaggagaagc ccggttattt aatcgccttt tcgtag 36

 <210> 5
 40 <211> 460
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium hyorhinis

 <400> 5
 45 Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser
 1 5 10 15

 50 Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Lys Arg Gln His Met Asp
 20 25 30

 Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Met Lys Ala Ser Ala
 55 35 40 45

 Val Asp Gly Pro Gly Ile Arg Ser Asn Met Leu Lys Lys Leu Lys Asn
 60 50 55 60

 Phe Ile Leu Phe Ser Ser Ile Phe Ser Pro Ile Ala Phe Ala Ile Ser
 65 70 75 80

 65 Cys Ser Asn Thr Gly Val Val Lys Gln Glu Asp Val Ser Val Ser Gln
 85 90 95

ES 2 754 374 T3

Gly Gln Trp Asp Lys Ser Ile Thr Phe Gly Val Ser Glu Ala Trp Leu
 100 105 110
 5 Asn Lys Lys Lys Gly Gly Glu Lys Val Asn Lys Glu Val Ile Asn Thr
 115 120 125
 10 Phe Leu Glu Asn Phe Lys Lys Glu Phe Asn Lys Leu Lys Asn Ala Asn
 130 135 140
 15 Asp Lys Thr Lys Asn Phe Asp Asp Val Asp Phe Lys Val Thr Pro Ile
 145 150 155 160
 20 Gln Asp Phe Thr Val Leu Leu Asn Asn Leu Ser Thr Asp Asn Pro Glu
 165 170 175
 Leu Asp Phe Gly Ile Asn Ala Ser Gly Lys Leu Val Glu Phe Leu Lys
 180 185 190
 25 Asn Asn Pro Gly Ile Ile Thr Pro Ala Leu Glu Thr Thr Thr Asn Ser
 195 200 205
 30 Phe Val Phe Asp Lys Glu Lys Asp Lys Phe Tyr Val Asp Gly Thr Asp
 210 215 220
 35 Ser Asp Pro Leu Val Lys Ile Ala Lys Glu Ile Asn Lys Ile Phe Val
 225 230 235 240
 40 Glu Thr Pro Tyr Ala Ser Trp Thr Asp Glu Asn His Lys Trp Asn Gly
 245 250 255
 Asn Val Tyr Gln Ser Val Tyr Asp Pro Thr Val Gln Ala Asn Phe Tyr
 260 265 270
 45 Arg Gly Met Ile Trp Ile Lys Gly Asn Asp Glu Thr Leu Ala Lys Ile
 275 280 285
 50 Lys Lys Ala Trp Asn Asp Lys Asp Trp Asn Thr Phe Arg Asn Phe Gly
 290 295 300
 55 Ile Leu His Gly Lys Asp Asn Ser Phe Ser Lys Phe Lys Leu Glu Glu
 305 310 315 320
 60 Thr Ile Leu Lys Asn His Phe Gln Asn Lys Phe Thr Thr Leu Asn Glu
 325 330 335
 Asp Arg Ser Ala His Pro Asn Ala Tyr Lys Gln Lys Ser Ala Asp Thr
 340 345 350
 65 Leu Gly Thr Leu Asp Asp Phe His Ile Ala Phe Ser Glu Glu Gly Ser
 355 360 365

ES 2 754 374 T3

Phe Ala Trp Thr His Asn Lys Ser Ala Thr Lys Pro Phe Glu Thr Lys
 370 375 380
 5
 Ala Asn Glu Lys Met Glu Ala Leu Ile Val Thr Asn Pro Ile Pro Tyr
 385 390 395 400
 10 Asp Val Gly Val Phe Arg Lys Ser Val Asn Gln Leu Glu Gln Asn Leu
 405 410 415
 15 Ile Val Gln Thr Phe Ile Asn Leu Ala Lys Asn Lys Gln Asp Thr Tyr
 420 425 430
 20 Gly Pro Leu Leu Gly Tyr Asn Gly Tyr Lys Lys Ile Asp Asn Phe Gln
 435 440 445
 Lys Glu Ile Val Glu Val Tyr Glu Lys Ala Ile Lys
 450 455 460
 25
 <210> 6
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium hyorhinis
 30
 <400> 6
 Leu Leu Lys Lys Phe Lys Asn Phe Ile Leu Phe Ser Ser Ile Phe Ser
 1 5 10 15
 35 Pro Ile Ala Phe Ala Ile Ser Cys Ser Asn Thr Gly Val Val Lys Gln
 20 25 30
 40 Glu Asp Val Ser Val Ser Gln Gly Gln Trp Asp Lys Ser Ile Thr Phe
 35 40 45
 45 Gly Val Ser Glu Ala Trp Leu Asn Lys Lys Lys Gly Asp Lys Glu Val
 50 55 60
 50 Asn Lys Glu Val Ile Asn Thr Phe Leu Glu Asn Phe Lys Lys Glu Phe
 65 70 75 80
 55 Asn Lys Leu Lys Asn Ala Asn Asp Lys Thr Lys Asn Phe Asp Asp Val
 85 90 95
 Asp Phe Lys Val Thr Pro Ile Gln Asp Ser Thr Val Leu Leu Asn Asn
 100 105 110
 60 Leu Ser Thr Asp Asn Pro Glu Leu Asp Phe Gly Ile Asn Ala Ser Gly
 115 120 125
 65 Lys Leu Val Glu Phe Leu Lys Asn Asn Pro Gly Ile Ile Thr Pro Ala
 130 135 140

ES 2 754 374 T3

Leu Glu Thr Thr Thr Asn Ser Phe Val Phe Asp Lys Glu Lys Asp Lys
 145 150 155 160
 5 Phe Tyr Val Asp Gly Thr Asp Ser Asp Pro Leu Val Lys Ile Ala Lys
 165 170 175
 10 Glu Ile Asn Lys Ile Phe Val Glu Thr Pro Tyr Ala Ser Trp Thr Asp
 180 185 190
 15 Glu Asn His Lys Trp Asn Gly Asn Val Tyr Gln Ser Val Tyr Asp Pro
 195 200 205
 Thr Val Gln Ala Asn Phe Tyr Arg Gly Met Ile Trp Ile Lys Gly Asn
 210 215 220
 20 Asp Glu Thr Leu Ala Lys Ile Lys Lys Ala Trp Asn Asp Lys Asp Trp
 225 230 235 240
 25 Asn Thr Phe Arg Asn Phe Gly Ile Leu His Gly Lys Asp Asn Ser Ser
 245 250 255
 30 Ser Lys Phe Lys Leu Glu Glu Thr Ile Leu Lys Asn His Phe Gln Asn
 260 265 270
 35 Lys Phe Thr Thr Leu Asn Glu Asp Arg Ser Ala His Pro Asn Ala Tyr
 275 280 285
 Lys Gln Lys Ser Ala Asp Thr Leu Gly Thr Leu Asp Asp Phe His Ile
 290 295 300
 40 Ala Phe Ser Glu Glu Gly Ser Phe Ala Trp Thr His Asn Lys Ser Ala
 305 310 315 320
 45 Thr Lys Pro Phe Glu Thr Lys Ala Asn Glu Lys Met Glu Ala Leu Ile
 325 330 335
 50 Val Thr Asn Pro Ile Pro Tyr Asp Val Gly Val Phe Arg Lys Ser Val
 340 345 350
 55 Asn Gln Leu Glu Gln Asn Leu Ile Val Gln Thr Phe Ile Asn Leu Ala
 355 360 365
 Lys Asn Lys Gln Asp Thr Tyr Gly Pro Leu Leu Gly Tyr Asn Gly Tyr
 370 375 380
 60 Lys Lys Ile Asp Asn Phe Gln Lys Glu Ile Val Glu Val Tyr Glu Lys
 385 390 395 400
 65 Ala Ile Lys

ES 2 754 374 T3

<210> 7
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium hyorhinitis

5 <400> 7

Leu Leu Lys Lys Phe Lys Asn Phe Ile Leu Phe Ser Ser Ile Phe Ser
 1 5 10 15

Pro Ile Ala Phe Ala Ile Ser Cys Ser Asn Thr Gly Val Val Lys Gln
 20 25 30

15 Glu Asp Val Ser Val Ser Gln Gly Gln Trp Asp Lys Ser Ile Thr Phe
 35 40 45

20 Gly Val Ser Glu Ala Trp Leu Asn Lys Lys Lys Gly Asp Lys Glu Val
 50 55 60

25 Asn Lys Glu Val Ile Asn Thr Phe Leu Glu Asn Phe Lys Lys Glu Phe
 65 70 75 80

30 Asn Lys Leu Lys Asn Ala Asn Asp Lys Thr Lys Asn Phe Asp Asp Val
 85 90 95

Asp Phe Lys Val Thr Pro Ile Gln Asp Ser Thr Val Leu Leu Asn Asn
 100 105 110

35 Leu Ser Thr Asp Asn Pro Glu Leu Asp Phe Gly Ile Asn Ala Ser Gly
 115 120 125

40 Lys Leu Val Glu Phe Leu Lys Asn Asn Pro Gly Ile Ile Thr Pro Ala
 130 135 140

45 Leu Glu Thr Thr Thr Asn Ser Phe Val Phe Asp Lys Glu Lys Asp Lys
 145 150 155 160

50 Phe Tyr Val Asp Gly Lys Asp Ser Asp Pro Leu Val Lys Ile Ala Lys
 165 170 175

Glu Ile Asn Lys Ile Phe Val Glu Thr Pro Tyr Ala Ser Trp Thr Asp
 180 185 190

55 Glu Asn His Lys Trp Asn Gly Asn Val Tyr Gln Ser Val Tyr Asp Pro
 195 200 205

60 Thr Val Gln Ala Asn Phe Tyr Arg Gly Met Ile Trp Ile Lys Gly Asn
 210 215 220

65 Asp Glu Thr Leu Ala Lys Ile Lys Lys Ala Trp Asn Asp Lys Asp Trp
 225 230 235 240

Asn Thr Phe Arg Asn Phe Gly Ile Leu His Gly Lys Asp Asn Ser Ser

ES 2 754 374 T3

				245					250					255		
5	Ser	Lys	Phe	Lys 260	Leu	Glu	Glu	Thr	Ile 265	Leu	Lys	Asn	His	Phe 270	Gln	Asn
10	Lys	Phe	Thr 275	Thr	Leu	Asn	Glu	Asp 280	Arg	Ser	Ala	His	Pro 285	Asn	Ala	Tyr
15	Lys	Gln 290	Lys	Ser	Ala	Asp	Thr 295	Leu	Gly	Thr	Leu	Asp 300	Asp	Phe	His	Ile
20	Ala 305	Phe	Ser	Glu	Glu	Gly 310	Ser	Phe	Ala	Trp	Thr 315	His	Asn	Lys	Ser	Ala 320
25	Thr	Lys	Pro	Phe	Glu 325	Thr	Lys	Ala	Asn	Glu 330	Lys	Met	Glu	Ala	Leu 335	Ile
30	Val	Thr	Asn	Pro 340	Ile	Pro	Tyr	Asp	Val 345	Gly	Val	Phe	Arg	Lys 350	Ser	Val
35	Asn	Gln	Leu 355	Glu	Gln	Asn	Leu	Ile 360	Val	Gln	Thr	Phe	Ile 365	Asn	Leu	Ala
40	Lys	Asn 370	Lys	Gln	Asp	Thr	Tyr 375	Gly	Pro	Leu	Leu	Gly 380	Tyr	Asn	Gly	Tyr
45	Lys 385	Lys	Ile	Asp	Asn	Phe 390	Gln	Lys	Glu	Ile	Val 395	Glu	Val	Tyr	Glu	Lys 400
50	Ala	Ile	Lys													

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido p37 de *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*) purificado, recombinante, de origen no natural, no modificado post-traducción, que tiene una secuencia con una identidad de al menos el 98% con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5; en el que el polipéptido es útil para la detección selectiva de anticuerpos contra *M. hyorhinis*.
2. Polipéptido, según la reivindicación 1, en el que el polipéptido tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 5.
3. Kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas que comprende el polipéptido según la reivindicación 1 o 2.
4. Procedimiento para fabricar una placa de ELISA, para usar como un componente del kit, según la reivindicación 3, que comprende las siguientes etapas:
- a) suspender el polipéptido, según la reivindicación 1 o 2, en tampón de carbonato/bicarbonato hasta una concentración de aproximadamente 80 µg/ml a aproximadamente 120 µg/ml, para producir una solución de recubrimiento;
 - b) añadir de aproximadamente 80 µl a aproximadamente 120 µl de la solución de recubrimiento a cada pocillo;
 - c) incubar la placa durante al menos aproximadamente 12 horas a aproximadamente 4 °C;
 - d) extraer la solución de recubrimiento;
 - e) bloquear la placa;
 - f) lavar la placa; preparando de este modo la placa de ensayo ELISA.
5. Procedimiento *in vitro* para detectar selectivamente la presencia de *M. hyorhinis* en una muestra que comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar la placa de ELISA, según la reivindicación 4;
 - b) proporcionar al menos una muestra experimental, al menos una muestra de control negativo y al menos una muestra que contiene anticuerpos específicos para al menos una especie de *Mycoplasma* distinta de *M. hyorhinis*;
 - c) diluir la muestra o muestras en tampón de bloqueo;
 - d) añadir una cantidad de muestra o muestras diluidas en los pocillos de la placa;
 - e) incubar las placas;
 - f) lavar los pocillos de las placas para extraer la muestra o muestras diluidas;
 - g) revelar las placas usando un cromógeno;
 - h) detener la reacción de cromógeno;
 - i) leer la placa a una longitud de onda apropiada para el cromógeno utilizado;
 - j) recoger y registrar los datos de absorbancia para los pocillos;
 - k) determinar que *M. hyorhinis* está presente cuando la muestra tiene significativamente más absorbancia que las muestras de control negativo; detectando de este modo selectivamente la presencia de *M. hyorhinis* en la muestra o muestras.
6. Procedimiento *in vitro* para detectar selectivamente la presencia de anticuerpos contra P37 de *M. hyorhinis* en una muestra de ensayo, que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una muestra de ensayo sospechosa de contener anticuerpos contra P37;
 - b) añadir una cantidad del polipéptido, según la reivindicación 1 o 2, a la muestra de ensayo, siendo la cantidad suficiente para producir un nivel detectable de actividad de unión por los anticuerpos anti-P37 en la muestra de ensayo; y
 - c) detectar la presencia de anticuerpos contra P37 unidos a dicho polipéptido en la muestra de ensayo.
7. Kit de diagnóstico para el diagnóstico selectivo de la presencia en una muestra biológica de anticuerpos contra P37 de *M. hyorhinis* que comprende el polipéptido, según la reivindicación 1 o 2; en el que incluso si la muestra biológica contiene anticuerpos contra *M. hyosynoviae* y *M. hyopneumoniae* contra P37 ortólogo, homólogo o parálogo, el kit no producirá un resultado positivo a menos que los anticuerpos contra *M. hyorhinis* estén presentes.

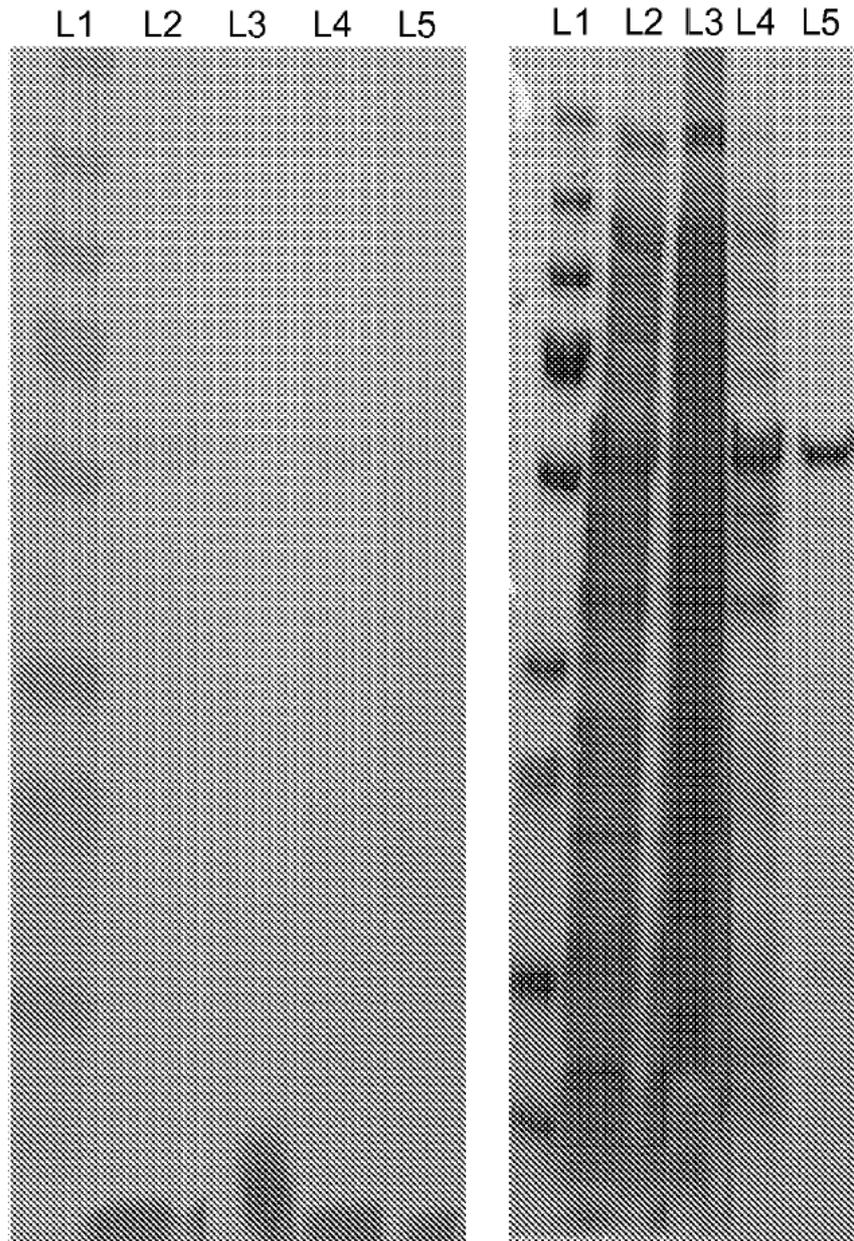


FIG. 1

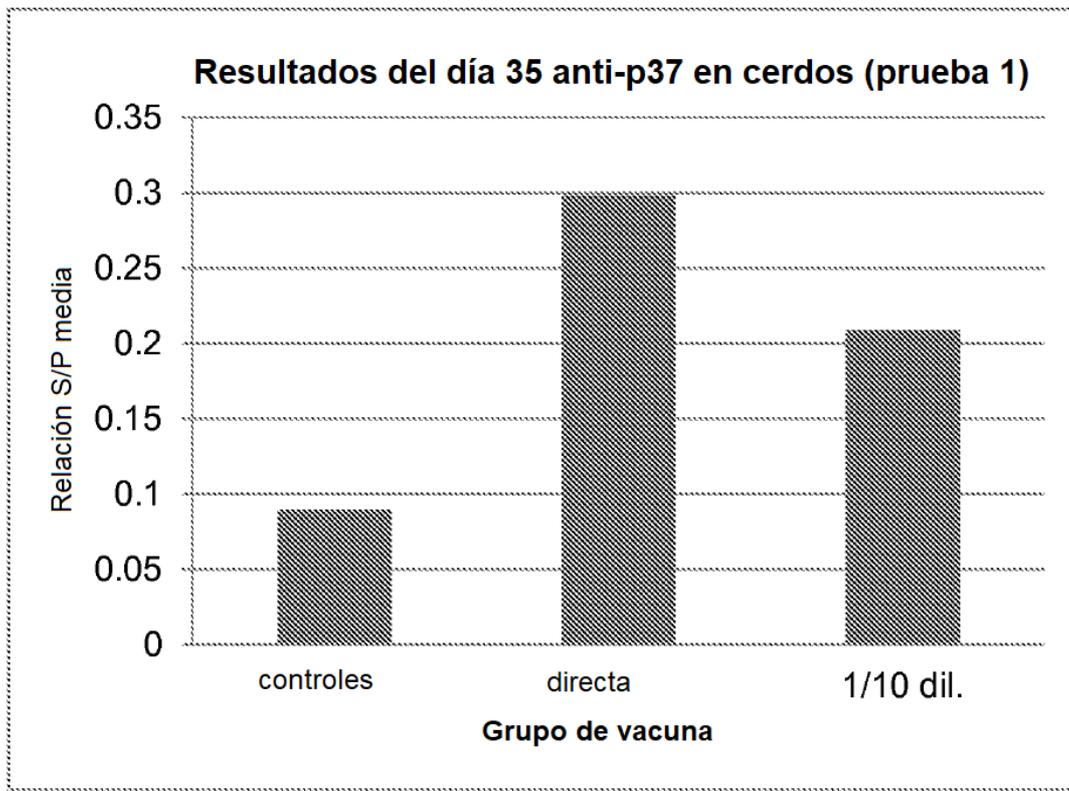


FIG. 2

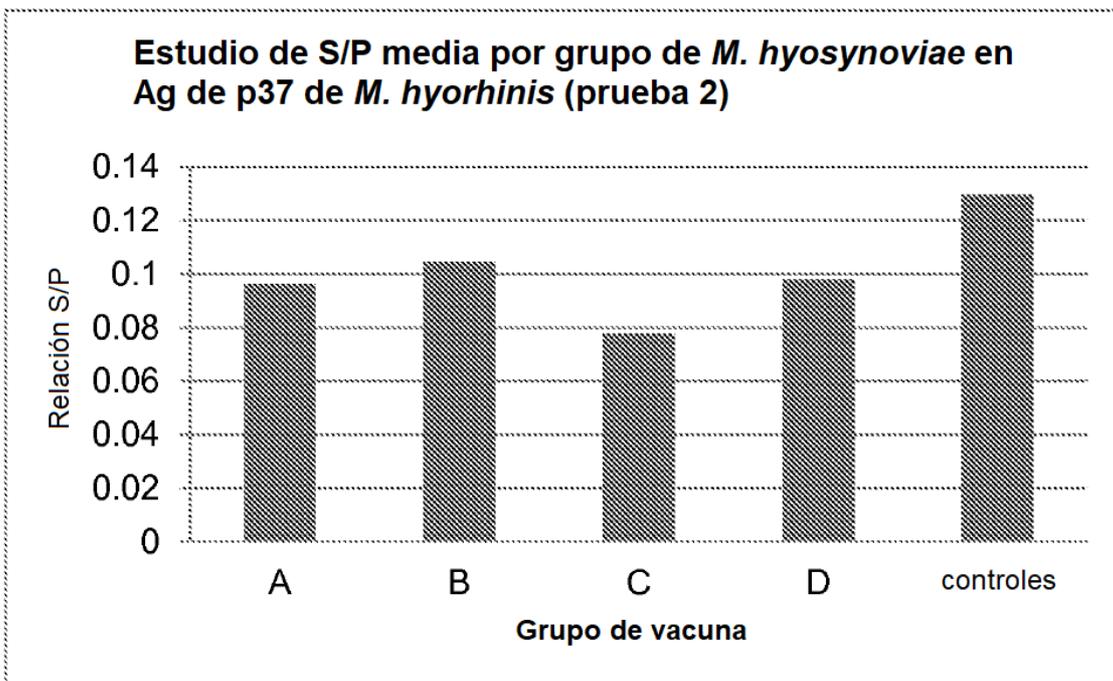


FIG. 3

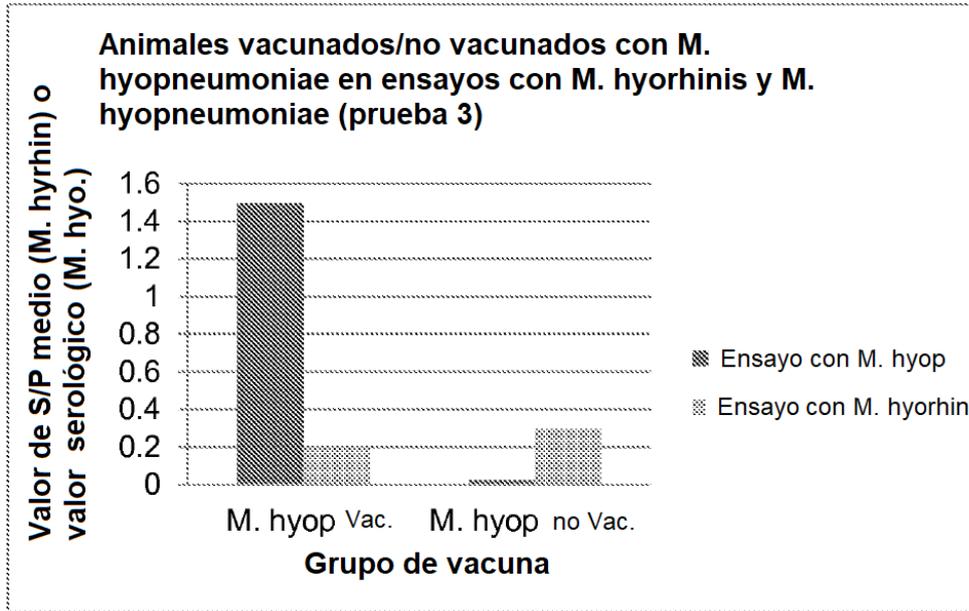


FIG. 4

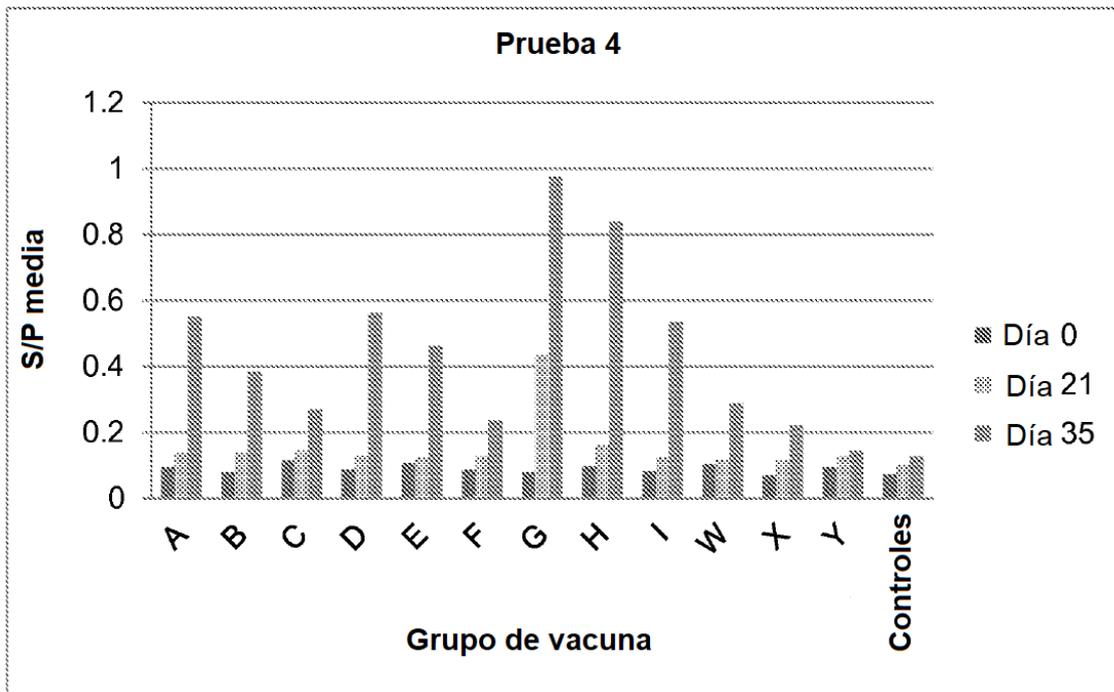


FIG. 5

ES 2 754 374 T3

P37rec = SEQ ID NO:5

10-3162-1 -----LLK
11-3945-1 -----LLK
11-0731-1 -----LLK
10-1118-4 -----LLK
09-4107-1 -----LLK
10-2286-1 -----LLK
10-1625-1 -----LLK
12-4130-1 -----LLK
12-3129-1 -----LLK
13-00490 -----LLK
12-4153-1 -----LLK
12-1416-1 -----LLK
12-2665-1 -----LLK
12-1973-2 -----LLK
11-4503-1 -----LLK
12-1276-1 -----LLK
p37rec MHHHHHSSGLVPRGSGMKETA~~AAKFKRQH~~MDS~~PDLGT~~DDDDKMKASAVDGPGRSN~~MLK~~

10-3162-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
11-3945-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
11-0731-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
10-1118-4 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
09-4107-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
10-2286-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
10-1625-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
12-4130-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
12-3129-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
13-00490 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
12-4153-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
12-1416-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
12-2665-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
12-1973-2 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
11-4503-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
12-1276-1 KFKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKGDKKEVNKEVI
p37rec ~~K~~LKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGQWDKSI~~T~~FGVSEAWLNKKKG~~GEK~~VNKEVI

FIG. 6

10-3162-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 11-3945-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 11-0731-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 10-1118-4 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 09-4107-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 10-2286-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 10-1625-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 12-4130-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 12-3129-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 13-00490 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 12-4153-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 12-1416-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 12-2665-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 12-1973-2 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 11-4503-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 12-1276-1 NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL
 p37rec NTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTPIQDSTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFL

10-3162-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 11-3945-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 11-0731-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 10-1118-4 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 09-4107-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 10-2286-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 10-1625-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 12-4130-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 12-3129-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 13-00490 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 12-4153-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 12-1416-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 12-2665-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 12-1973-2 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 11-4503-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 12-1276-1 KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG
 p37rec KNNPGIITPALETTTNSFVFDKEKDKFYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNG

10-3162-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 11-3945-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 11-0731-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 10-1118-4 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 09-4107-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 10-2286-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 10-1625-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 12-4130-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 12-3129-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 13-00490 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 12-4153-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 12-1416-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 12-2665-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 12-1973-2 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 11-4503-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 12-1276-1 NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL
 p37rec NVYQSVYDPTVQANFYRGMIIWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSSSKFKL

FIG. 6 (continuación)

ES 2 754 374 T3

10-3162-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
11-3945-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
11-0731-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
10-1118-4 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
09-4107-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
10-2286-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
10-1625-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
12-4130-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
12-3129-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
13-00490 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
12-4153-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
12-1416-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
12-2665-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
12-1973-2 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
11-4503-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
12-1276-1 EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET
p37rec EETILKNHFQNKFTTLNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFET

10-3162-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
11-3945-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
11-0731-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
10-1118-4 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
09-4107-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
10-2286-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
10-1625-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
12-4130-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
12-3129-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
13-00490 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
12-4153-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
12-1416-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
12-2665-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
12-1973-2 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
11-4503-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
12-1276-1 KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ
p37rec KANEKMEALIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIIVQTFINLAKNKQDITYGPLLGYNGYKKIDNFQ

10-3162-1 KEIVEVYEKAIAK
11-3945-1 KEIVEVYEKAIAK
11-0731-1 KEIVEVYEKAIAK
10-1118-4 KEIVEVYEKAIAK
09-4107-1 KEIVEVYEKAIAK
10-2286-1 KEIVEVYEKAIAK
10-1625-1 KEIVEVYEKAIAK
12-4130-1 KEIVEVYEKAIAK
12-3129-1 KEIVEVYEKAIAK
13-00490 KEIVEVYEKAIAK
12-4153-1 KEIVEVYEKAIAK
12-1416-1 KEIVEVYEKAIAK
12-2665-1 KEIVEVYEKAIAK
12-1973-2 KEIVEVYEKAIAK
11-4503-1 KEIVEVYEKAIAK
12-1276-1 KEIVEVYEKAIAK
p37rec KEIVEVYEKAIAK

FIG. 6 (continuación)