

DIAGNOSTICO DE Mycoplasma hyopneumoniae POR EL METODO DE INMUNOFUORESCENCIA DIRECTA .

CRUZ S. T.*¹, COLMENARES V. G.², HERNANDEZ B.E.¹, CIPRIAN C.A.¹
¹ COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN. U.N.A.M.
² CENID MICROBIOLOGIA. INIFAP. S.A.R.H.

COORDINACION GENERAL DE POSGRADO. FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN. UNAM. APDO. POSTAL 222. C.P. 54700. CUAUTITLAN, IZCALLI, EDO. DE MEXICO. TEL. 913-8730834.

AREA: SANIDAD ANIMAL.
CATEDRA: AFECCIONES VIRALES Y BACTERIANAS DEL CERDO. *BECARIO D.G.P.A. UNAM.

A) INTRODUCCION. La neumonia enzoótica es una enfermedad crónica respiratoria producida por Mycoplasma hyopneumoniae. En México se ha encontrado una incidencia por esta enfermedad, determinada por lesiones neumónicas de un 20 a un 50% (5). Aunque el agente comunmente aislado es Pasteurella multocida, se ha demostrado que M. hyopneumoniae es el propicia la entrada a las pateurelas (3). Se ha demostrado la presencia de M. hyopneumoniae por medio de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, encontrándose en un 23 % de fluorescencia específica en pulmones de abasto (2). Asi mismo se ha logrado el aislamiento e identificación de M. hyopneumoniae y M. flocculare de casos típicos de neumonia enzoótica (7). El aislamiento de estos micoplasmas resulta muy difícil, por lo que se ha recurrido a la utilización de procedimientos inmunológicos para su diagnóstico. Dentro de las pruebas inmunológicas están las de fijación de complemento y ELISA Tween 20 y recientemente se ha empleado el uso de sondas génicas (8). En muchos laboratorios de Estados Unidos y Europa utilizan la prueba de inmunofluorescencia (IF) en forma rutinaria para el diagnóstico. Esta prueba es rápida, relativamente facil de desarrollar, económica y específica (1, 6). La alta correlación entre aislamiento e IF específica la hacen ideal para el diagnóstico en México, ya que el aislamiento lo realizan pocos laboratorios.

B) OBJETIVO: Producción de suero hiperinmune y elaboración de un conjugado fluorescente para el diagnóstico de la Mycoplasma hyopneumoniae, mediante el método de inmunofluorescencia directa.

C) MATERIAL Y METODOS: Se produjo un suero hiperinmune, vacunando dos cerdos S.P.F. con una bacterina a base de la cepa de M. hyopneumoniae MHXP-5 donada amablemente por el Dr. Dayalu (Smith Kline Becchman Animal Healt), incluida en adyuvante oleoso, de acuerdo al protocolo de vacunación sugerido por el Dr. Ross (Universidad del Estado de Iowa). Al término de la inmunización se hizo el sangrado total de los cerdos, obteniéndose al día siguiente el suero. Este suero fue mantenido en viales estériles a -20 C, de este suero se tomaron 200 ml para la purificación parcial de IgG de cerdo y la conjugación con isotiocianato de fluoresceína de acuerdo a las técnicas descritas por Sánchez Vizcaino (1990). Para la titulación se procedió realizando diluciones dobles del conjugado de 1:1 a 1:128 y se prepararon frotis con la cepa 194 de M. hyopneumoniae donada amablemente por el Dr.

Ross (Universidad del Estado de Iowa) para cada dilución del conjugado. A cada frotis se le colocó una gota del conjugado de la dilución correspondiente, se incubaron los frotis en cámara húmeda a 37 C por 20 minutos. Después se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Posteriormente se observaron en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss, utilizando la combinación de filtros BG 12 y G 50. Posteriormente se empleó el conjugado utilizando cortes al microtomo criostato de tejido pulmonar. Para ello se utilizaron como controles negativos un pulmón fetal y un pulmón sin lesiones de un cerdo de 6 meses de edad. Como control positivo se empleó un pulmón el cual procedía de un caso clínico con lesiones características de neumonía enzoótica. Estos pulmones fueron trabajados para intentar el aislamiento del micoplasma de acuerdo a la metodología descrita por Cruz y cols (1992). Las muestras fueron congeladas a -70 C y se tomó aproximadamente 1 cm. cúbico, de los lobullos apicales, procurando incluir bronquios y bronquiolos. Se realizaron cortes en criostato -20 C, de 8 micras de grueso, que se colocaron en portaobjetos. Después fueron fijadas en etanol absoluto durante 10 minutos. Se tñieron y se observaron al microscopio de fluorescencia utilizando las técnicas antes descritas.

D) RESULTADOS. De cada uno de los cerdos inmunizados se obtuvo aproximadamente 2 lts. de suero hiperinmune. De los 200 mls. que se tomaron para la conjugación, se obtuvieron aproximadamente 50 ml de conjugado, los cuales se depositaron en alícuotas de 1 ml y después se liofilizaron y mantuvieron a -70 C. Los resultados de la titulación con improntas de la cepa 194 de M. hyopneumoniae mostro un título de 1:32, el óptimo para ser utilizado. Con este título fueron teñidos los cortes pulmonares. De los pulmones trabajados solo se aisló micoplasma de aquel que presentaba lesiones características, tipificándose como M. hyopneumoniae y también solo en este pulmón se observó fluorescencia específica. Tanto en la cepa como en el corte pulmonar positivo al aislamiento se observaron focos fluorescentes de forma granular, verde amarillentos brillantes.

E) DISCUSION. Como pudo apreciarse la producción por cerdo fue de aproximadamente 2 lts., cantidad mas que suficiente para producir un buen lote de conjugado. Considerando que el título obtenido fue de 1:32, es posible que por cada mililitro diluido a esta concentración podamos realizar aproximadamente 500 pruebas. Sin embargo es necesario corroborar este título con muestras de tejido pulmonar. Con el conjugado elaborado fue posible observar inmunofluorescencia específica tanto en el cultivo como en el epitelio bronquiolar del pulmón con lesiones neumónicas, del cual fue aislado el micoplasma. Sin embargo la observación del micoplasma en el epitelio bronquiolar fue difícil dado que este se encontraba desprendido. Por lo tanto para la realización del diagnóstico de la neumonía enzoótica, mediante la técnica de IF se deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones: la muestra de tejido pulmonar debe proceder principalmente de animales al destete con signos clínicos respiratorios. Esta muestra debe ser congelada con un crioprotector a base de polietilenglicol, el cual tiene como finalidad proteger el epitelio bronquiolar, manteniendo la integridad de los cilios, lugar donde colonizan los micoplasmas (Ross, 1993 Comunicación personal). Otra ventaja de la

utilización de este conjugado es su posible empleo en la identificación de colonias de M. hyopneumoniae por epifluorescencia, la cual es mas rápida comparada con el uso de pruebas bioquímicas e inhibición de crecimiento. La técnica de inmunofluorescencia viene a ser de gran utilidad en en nuestro país por las dificultades de realizar el aislamiento, abatiendo con ello el complicado diagnóstico mediante el aislamiento de M. hyopneumoniae.

BIBLIOGRAFIA

1. Amanfu et al. (1980): Direct immunofluorescence technique for detection of Mycoplasma hyopneumoniae in swine lungs. Int.Pig. Vet. Soc. congress Copenhage Denmark. p.223.
2. Ciprián C.A. Cruz T. and Pijoan C.(1982): Specific fluorescence against Mycoplasma hyopneumoniae in pneumonic lungs of pig in México. Proceeding of the International Pig Veterinary Congress. Mexico City. p.90
3. Ciprián, C.A. Pijoan, A.C., Cruz, T., Camacho, J., Tòrtora, J., Colmenares, G., Lòpez R.R. y De la Garza M.(1989): Mycoplasma hyopneumoniae increases the suceptibility of pigs to experimental Pasteurella multocida pneumonia. Can.J. Vet. Res. 52 : 434-458.
4. Cruz S.T.A., Ciprián C.A., Torres A.O., Mendoza E.S. y De la Garza M. (1992): Evaluación Experimental de dos inmunògenos de Mycoplasma hyopneumoniae en cerdos convencionales. Prem. Canif. Ind. Far. Vet. 91 Vol. 1 Noviembre.p 77-90.
5. Maqueda, J (1977): Incidencia de Neumonìa Enzoòtica en varios estados productores de cerdos en la Repùblica Mexicana (estudio preliminar). Memorias del I Congreso Latinoamericano de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Mèxico D.F. p. 27
6. Piffer I.A. and Ross R.F. (1982): Comparison of direct and indirect fluorescent antibody technique for detection of Mycoplasma hyopneumoniae in swine lungs. Int. Pig Vet. Soc. Congress Mèxico. p.89
7. Ponce H.C., Cruz S.T., Torres A.O. y Ciprián A.(1986): Cultivo, Aislamiento y Caracterización de Mycoplasma hyopneumoniae de pulmones neumònicos de cerdo. Memorias del XXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especiales en Cerdos . Puebla Tlaxcala, Mèxico.p 172.
8. Ross R.F. (1990): Use of conventional and molecular biological methods in diagnosis and prevention of swine micoplasmosis. En : Compendio de las Enfermedades del Cerdo y su relación con la Biología Molecular. Editado por Ciprián, C.A. y Mendoza, E.S. Programa Universitario de Alimentos (PUAL). UNAM. Mèxico D.F. p. 46-54

- 9. Sanchez-Vizcaino.(1990): Manual de Laboratorio de Inmunología. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias de Sanidad Animal. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Departamento de Sanidad Animal. Madrid, España.