

METODO RAPIDO PARA LA IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*.



Londoño Orozco A*, Cruz Sánchez T.A. y Ciprián Carrasco

Coordinación General de Estudios de Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Primero de mayo s/n, Col. Atlanta, Cuautitlán, ~calli, Edo. de Méx. Apdo. Postal. 222 C.P. 54700.

Tel y Fax 8730834.

Cátedra: Microbiología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo.

INTRODUCCION

El aislamiento e identificación de micoplasmas porcinos resulta difícil y tedioso. Para la identificación de los micoplasmas se emplean pruebas bioquímicas e inmunológicas. Dentro de las pruebas bioquímicas se emplean la digitonina, producción de peróxido de hidrógeno, fermentación de la glucosa, hidrólisis de la urea y arginina entre otras. Entre las pruebas inmunológicas están las pruebas de inhibición de crecimiento, inhibición metabólica y técnicas de epifluorescencia. Sin embargo, estas pruebas requieren de gran cantidad de material, tiempo de realización y largos periodos de incubación y es por eso, que desde la década de los setentas se había propuesto una técnica de inmunofluorescencia en papel filtro para la identificación rápida de *M. hyopneumoniae* (Armstrong, 1977). Recientemente se han introducido las técnicas inmunoenzimáticas en papel de nitrocelulosa como lo demuestran Domenech y cols. (1993) con la misma eficiencia de las pruebas bioquímicas e inmunológicas.

Basándonos en el método utilizado por Armstrong (1994) y empleando el conjugado de inmunoperoxidasa desarrollado en la FES Cuautitlán, el objetivo del presente trabajo es implementar una técnica para la identificación rápida de cultivos de *M. hyopneumoniae*.

MATERIAL Y METODOS

Cepas de micoplasmas: Se trabajó con las siguientes cepas de referencia: *Mycoplasma hyopneumoniae* cepa 194 (proporcionada por el Dr. Ross, Universidad de Iowa), *Mycoplasma flocculare* cepa Ms42 (proporcionada por el Dr. Pijoan, Universidad de Minnesota) y *Mycoplasma hyorhinis* (proporcionada por el National Veterinary Services Laboratories (NVLSL, Ames, Iowa). Conjugado de Peroxidasas: Se empleó un antisuero porcino conjugado con peroxidasa contra

Mycoplasma hyopneumoniae, elaborado en los laboratorios de la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán denominado CHAK-EK, en la dilución óptima de trabajo. (Cruz y cols., 1994). Para el revelado se utilizó ABTS (2,2 -azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6sulfonic acid, KPL, London).

Medio de cultivo: Se empleó medio de Friis de acuerdo a Friis (1975).

Controles negativos: Se emplearon como controles negativos suero normal de cerdo y medio de Friis sin inocular.

El procedimiento tomado y modificado de Armstrong (1994) seguido para la identificación se ilustra a continuación:

RESULTADOS Y DISCUSION

Al realizar la técnica se observó que la reacción de color solo se observó en el papel impregnado con la cepa *M. hyopneumoniae* 194 y no se detectó en los otros papeles impregnados con *M. hyorhinis* y *M. flocculare*. La reacción apareció inmediatamente al adicionar la solución reveladora. En el caso de los controles negativos, estos quedaron incoloros.

En la forma rutinaria de aislamiento se realiza un macerado del pulmón y se inocula en medio líquido de Friis en donde se realizan diluciones logarítmicas y se incuba aproximadamente 10 días. Posteriormente se siembra en medio sólido y se incuba otros 7 días. De aquí se buscan colonias sospechosas de micoplasma por su morfología y se vuelve a realizar una siembra en medio líquido para posteriormente hacer una última resiembra en medio sólido, y es hasta este momento es que se inicia la identificación bioquímica o inmunológica, tardando todo este proceso un promedio de 20 a 30 días.

Con el procedimiento descrito acortamos el tiempo hasta la mitad, ya que del paso de la resiembra del medio sólido del primo aislamiento al medio líquido son aproximadamente 15 días mas dos horas que lleva realizar la prueba. Otra ventaja es que podemos descartar el uso del microscopio de fluorescencia y ver la reacción a simple vista. Esta prueba puede hacerse mas versátil por el método indirecto, como lo marca la técnica original, al contar con antisueros de conejos para los otros micoplasmas porcinos, ya que nos puede identificar con especificidad el tipo de micoplasma porcino involucrado en una muestra como lo han demostrado varios autores.

Es por ello que se considera este método de gran utilidad para la identificación de *M. hyopneumoniae*

BIBLIOGRAFIA

Armstrong C.H.: A diagnostically practical method of isolating and identifying *Mycoplasma hyopneumoniae*. Memorias del I Simposium Internacional de Laboratorios de Diagnóstico. Tomo III.

Guanajuato, México. enero 15 a 22 . p.754-771. 1977.

Armstrong C.H.: Porcine Mycoplasmas in Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis. Edited by Whitford, Rosenbusch and Laureman. Iowa State University Press /AMES. Cap.6 p.68 -83. First Edition.1994.

Cruz, S T. Mendoza E S , Colmenares.V.G., ~ernández B.E., Ciprián C.A. Desarrollo de las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en tejido pulmonar. En Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco. México, Octubre. p. 145. 1994

Domenech, J , Poveda, J b , Fernández, A , Valera, N ,Porteo, J.M , Villalba, E.J y Martín de Mulas, J: Aislamiento e identificación