

EVALUACION DE UN CONJUGADO DE INMUNOFLUORESCENCIA (BEEN-EK) DESARROLLADO EN FES- CUAUTITLAN PARA EL DIAGNOSTICO DE LA NEUMONIA ENZOOTICA.

Lara Puente ~ .', Cruz Sánchez T.A.I, Mendoza E. S.', Colmenares,V.G.2 y Ciprián Carrasco A.'
'Coordinación General de Estudios de Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Primero de Mayo s/n. Col Atlanta. Cuautitlán, I[zcalli, Edo, Mex.,C.P. 54700, Tel y Fax 8730834.
Proyecto apoyado por PADEP: 100302 UNAM.
Cátedra: Microbiología de las Afecciones Respiratorias del Cerdo. 2 CENID-Microbiología, INIFAP.

INTRODUCCION

La Neumonía Enzoótica es una enfermedad que afecta a las producciones porcícolas del país hasta con un 80 % de incidencia. Para su diagnóstico se emplean diversas pruebas, desde el aislamiento, la cual es la mas confiable, hasta las serologicas, en donde se encuentra la prueba de Inmunofluorescencia, la cual ha sido probada satisfactoriamente por varios autores, teniendo varias ventajas para su empleo como son la alta correlación entre resultados positivos y el aislamiento, así como su facilidad de realización, lo cual la hace la prueba de elección en los lugares donde el aislamiento es poco probable de realizar. En la Republica Mexicana desde el año de 1982 fue utilizada la prueba de Inmunofluorescencia indirecta, la cual demostro un 23 % de casos positivos en cerdos de abasto hacia *M. hyopneumoniae*. El presente trabajo tiene la finalidad de hacer una evaluación entre el conjugado producido en la F.E.S. Cuautitlán denominado "BEEN-EK" y uno de referencia elaborado en Ames, Iowa, bajo un experimento de doble ciego.

MATERIAL Y METODOS

Muestras pulmonares:

Controles: Se tomo como control positivo una muestra de campo procedente del valle de Texcoco, a la cual se le realizo el aislamiento positivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* y que resulto positiva a la prueba de Fluorescencia. Como control negativo se empleo un pulmón de un cerdo de aproximadamente 2 meses de edad proveniente de una granja libre de enfermedades respiratorias ubicada en el municipio de Zumpango, Edo. de México, el cual era SCPA y negativo al aislamiento y a la prueba de fluorescencia.

Muestras para la prueba:

Se utilizaron 8 muestras de casos sospechosos de Neumonía Enzoótica, los cuales presentaban lesiones sugerentes de la misma, provenientes de diferentes municipios del Estado de México, los cuales fueron conservados con un crioprotector (Tissue-Tek) y congeladas a -20 C.

Conjugados:

Se empleo el conjugado de referencia proporcionado por el National Veterinary Services Laboratories (NVLSL, Ames, Iowa) con número de catálogo 9020DBL8903 en una dilución de 1:49, así mismo se empleo el conjugado elaborado en la F.E.S. Cuautitlan, denominado BEEN-EK, a las diluciones de 1:16, 1:32 y 1:64.

Preparación de las muestras:

Todas las muestras pulmonares se les realizaron cortes en el criostato (American Optical) con un grosor de 8 micras, posteriormente se fijaron en acetona a -4 C. por 10 minutos y congeladas a -20 C. hasta el momento de su utilización.

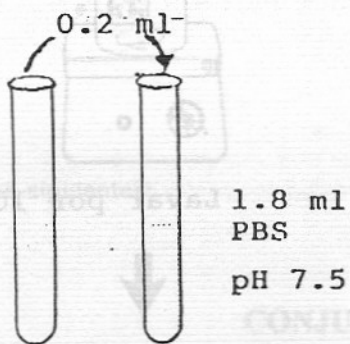
Tecnica de Inmunofluorescencia:

Se tomaron cortes pareados de las muestras pulmonares, incluyendo a los grupos controles, para emplearse con los conjugados de fluorescencia por el método directo. Se les aplico el conjugado y se incubaron 30 minutos a 37 C. en una camara húmeda, posteriormente se lavaron por 15 minutos en una solución de agua desionizada. Se secaron las muestras a temperatura ambiente y a cada una de ellas se les aplico una gota de Glicerol y un cubreobjetos. Se realizo la lectura en un Microscopio de Inmunofluorescencia Carl-Zeiss.

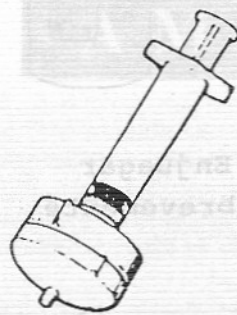
Para la lectura de las laminillas se utilizo la técnica de doble ciego y se hizo la lectura por 3 diferentes técnicos especializados, con el fin de evitar una influencia en el resultado por parte de los autores así como reducir el posible error inherente.

Técnica de inmunoperoxidasa directa para la identificación de cultivos de *M. hyopneumoniae* (Tomada y modificada de [illegible] y [illegible], 1994)

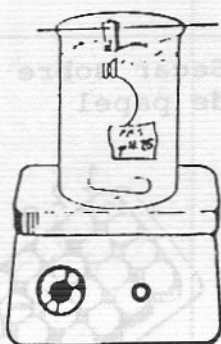
Cultivo primario



Dilución del cultivo 1: 10



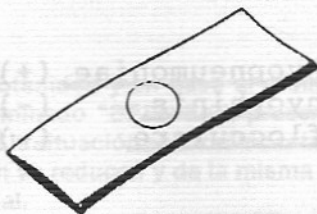
Pasar 2 ml. a través de un filtro de .22 micras.



Lavar durante 10 minutos



Enjuagar brevemente



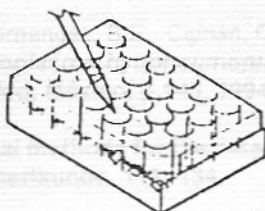
Secar la membrana sobre una toalla de papel



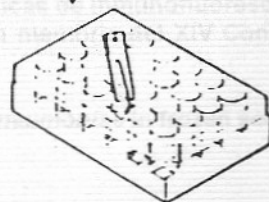
Cortar rectángulos de la membrana



Incubar a 37 C
1 hora en cámara húmeda



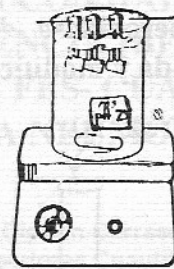
Adicionar conjugado de peroxidasa anti *M. hyopneumoniae*



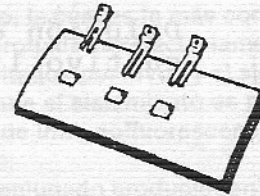
Colocar cada rectángulo en un pozo de la placa



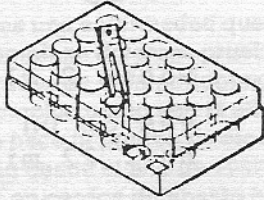
Enjuagar brevemente



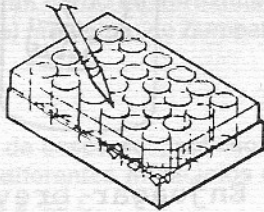
Lavar por 10 minutos



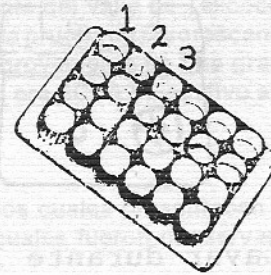
Secar sobre toalla de papel



Colocar cada rectángulo en pozo limpio

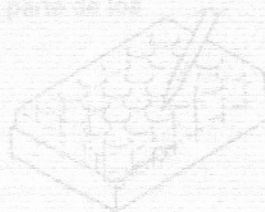


Adicionar 0.1 ml de solución reveladora de ABTS



Se observa reacción de color verde :

1. M. hyopneumoniae (+)
2. M. hyorhinis (-)
3. M. flocculare (-)



Colocar cada rectángulo en pozo limpio

Adicionar solución reveladora de peroxidasa anti

Incluir a 37 C 1 hora en cámara



RESULTADOS:

La lectura mostro los resultados siguientes:

	CONJUGADOS			
	IOWA	BEEN-EK		
	1:49	1:16	1:32	1:64
Control Positivo	+	+	+	+
Control negativo	-	-	-	-
MUESTRAS DE CAMPO				
A	+	+	+	+
B	+	+	+	+
C	-	-	-	-
D	-	-	-	-
E	-	-	-	-
F	-	+	+	+/-
G	-	-	-	-
H	+	+	+	+

Los datos obtenidos fueron analizados según el método de Tukey, con un 95 % de confianza encontrándose que ambos conjugados son homogéneos.

DISCUSION

Por los datos obtenidos y en base al resultado estadístico empleado, decidimos que el conjugado producido en la F.E.S. Cuautitlán denominado "BEEN-EK", presenta un índice de confiabilidad similar al conjugado de referencia, cuestión muy importante, dada la situación económica actual del país, ya que con el conjugado BEEN-EK, los costos de producción y de posible comercialización se reducen y de la misma forma no es necesario llenar tramites especiales para poder adquirirlo dentro del territorio nacional.

BIBLIOGRAFIA

- Ciprián, C.A., Cruz, S.T. and Pijoan. **Specific fluorescence against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pneumonic lungs of pig in México. Proceedings of the International Pig Veterinary Congress. México City. p. 90. 1982.**
- Cruz, S.T., Mendoza, E.S., Colmenares, V.G., Hernandez, B.E., Ciprián, C.A. **Desarrollo de las técnicas de Inmunofluorescencia e Inmunoperoxidasa para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en tejido pulmonar. En memoria del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, México. p.145. 1994.**
- Giger, T., Bruggman, S., Nicolet, J. **Immunological methods for the detection of *Mycoplasma suis pneumoniae* in frozen sections and bronchial smers. Schweizer Archiv fur tiernerlkunde. 119: 134.**